

백혈병 세포에서 Multidrug Resistance Gene-1 (*mdr1*)의 과발현이 ^{99m}Tc-sestaMIBI 섭취에 미치는 영향

경북대학교 의과대학 핵의학교실,¹ 내과학교실,² 의학연구소,³ 서울대학교 의과대학 핵의학교실⁴
천경아¹ · 이재태^{1,3} · 이상우¹ · 강도영¹ · 손상균^{2,3} · 이종기³ · 정준기⁴ · 전수한³ · 이규보^{1,3}

Effect of Multidrug Resistance Gene-1 (*mdr1*) Overexpression on In-Vitro
Uptake of ^{99m}Tc-sestaMIBI in Murine L1210 Leukemia Cells

Kyung Ah Chun, M.D.,¹ Jaetae Lee, M.D.,^{1,3} Sang Woo Lee, M.D.,¹ Do Young Kang, M.D.,¹
Sang Kyun Sohn, M.D.,^{2,3} Jong Kee Lee, Ph.D.,³ June-Key Chung, M.D.,⁴
Soo Han Jun, M.D.³ and Kyu Bo Lee, M.D.^{1,3}

Departments of Nuclear Medicine¹ and Internal Medicine,² Medical Research Institute,³
Kyungpook National University Hospital, Taegu, Korea, Department of Nuclear Medicine,
Seoul National University College of Medicine⁴, Seoul, Korea

Abstract

Purpose: To determine whether ^{99m}Tc-MIBI is recognized by the multidrug resistant P-glycoprotein (Pgp), we have measured quantitatively ^{99m}Tc-MIBI uptake in cancer cells. The effects of various Pgp reversing agents on cellular ^{99m}Tc-MIBI uptake were also investigated in the presence of multidrug resistance gene-1 (*mdr1* gene) overexpression. **Materials and Methods:** We measured percentage uptake of ^{99m}Tc-MIBI at different incubation temperatures both in *mdr1* positive and negative cells. The effects of verapamil, cyclosporin, and dipyrindamole on cellular uptake of ^{99m}Tc-MIBI were also evaluated with or without overexpression of *mdr1* gene in cultured murine leukemia L1210 cells. **Results:** The *mdr1* gene expressing cell lines were effectively induced in *in vitro* with continuous application of low-dose adriamycin or vincristine. Cellular uptake of ^{99m}Tc-MIBI was higher in *mdr1* negative L1210 cells than those of *mdr1* positive cells, and higher when incubated in 37°C than 4°C. In the presence of verapamil, cyclosporin or dipyrindamole, ^{99m}Tc-MIBI uptake was increased upto 604% in *mdr1* positive cells. **Conclusion:** Cellular uptake of ^{99m}Tc-MIBI is lower in leukemia cells over-expressing *mdr1* gene, and MDR-reversing agents increase cellular uptake. These results suggest that ^{99m}Tc-MIBI can be used for characterizing Pgp expression and developing MDR-reversing agents *in vitro*. (Korean J Nucl Med 1999;33:152-62)

Key Words: Multidrug resistance, ^{99m}Tc-MIBI, MDR-reversing agent

Received Nov. 7, 1998; revision accepted Mar. 23, 1999

Corresponding Author: Jaetae Lee, M.D., Department of
Nuclear Medicine, Kyungpook National University Hospital,
Samduck 2-Ga 50, 700-412, Taegu, Korea

Tel: (82)-53-420-5586, Fax: (82)-53-426-3206

E-mail: jaetae@kyungpook.ac.kr

* 본 연구는 1996년 경북대학교병원 의학연구소 대단위
과제 연구비의 지원으로 이루어졌음.

서 론

항암 치료 실패의 주 원인 중의 하나는 암세포의
다약제내성(multidrug resistance, MDR) 발생에 기
인한다. 다약제내성은 암세포가 구조적으로 무관한

여러 약물에 대하여 내성을 갖는 상황을 말하며,^{1,4)} 이런 현상은 anthracycline계 항생물질이나 vinca alkaloids 같은 자연계에서 얻은 항암제에서 특히 잘 나타난다.⁵⁻⁸⁾ 다약제내성을 나타내는 암세포들의 항암제에 대한 약제내성의 중요한 기전 중의 하나는 암세포에서 다약제내성 유전자(multidrug resistance gene, *mdr1*)의 과발현이다.⁹⁻¹³⁾ *mdr1* 유전자는 P-당단백(P-glycoprotein)이라고 하는 170-kDa의 세포막 단백을 생성하며 이 P-당단백은 에너지 의존성 배출 펌프(energy-dependent efflux pump)로서 다약제내성 기전에 핵심적인 역할을 한다.¹⁴⁻¹⁸⁾ P-당단백은 간이나 신장 등의 정상 세포에도 많이 분포하고 있으나 정상 세포에서의 작용은 숙주 방어와 자연독소의 배출 등에 의한 항상성의 유지에 관련되어 있다.^{19,20)} 다약제내성과 관련된 P-당단백을 발현하는 사람의 유전자는 *mdr1* 유전자이고, *mdr1* 유전자가 세포막 P-당단백을 합성하며 mRNA의 크기는 4.5 Kb이다.

심근관류 추적자로 이용되어온 유기테크네슘 화합물인 ^{99m}Tc -MIBI (methoxyisobutylisonitrile)는 P-당단백의 운반기질로 사용될 수 있어 다약제내성의 연구에 이용되어왔다.^{5,9)} MIBI의 세포 내 축적은 음성세포막전위차에 의해 이루어지나 P-당단백이 과도 발현된 세포에서는 항암제와 같이 세포 밖으로 배출되어 세포 내 축적이 감소하며, P-당단백의 발현 정도와 MIBI의 섭취 정도가 역상관 관계에 있다는 보고들이 있다.^{14,15)} 한편 내성세포 내 Ca^{++} 농도가 정상보다 높다는 사실에 착안하여 세포막의 Ca^{++} 통로를 막는 verapamil을 사용하면 내성이 억제된다는 보고들²¹⁻²⁴⁾이 있어 항암치료시 약제내성의 극복에 verapamil을 이용한 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.²⁵⁻²⁸⁾

본 연구는 *mdr1* 유전자를 과발현시킨 백혈병세포에서 *mdr1* 유전자의 과발현이 세포 내 ^{99m}Tc -MIBI 섭취에 미치는 영향을 알아보고, P-당단백의 작용에 길항하는 약제인 verapamil, cyclosporin 및 dipyridamole이 *mdr1* 유전자 과발현 세포에서의

^{99m}Tc -MIBI 섭취에 미치는 영향을 규명하여 ^{99m}Tc -MIBI를 암세포에서 다약제내성 발생 여부를 평가하고 다약제내성 극복제제의 개발과 전임상 응용에 사용될 수 있는가를 연구하기 위하여 시행하였다.

대상 및 방법

1. 재 료

Murine leukemia cell line인 L1210 cell (American Type Culture Collection, Rockville USA)를 실험에 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서, 배양조는 Corning (Rochester, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 시약 중 adriamycin은 보령제약, vincristine은 대웅릴리제약, verapamil은 Sigma (St. Louis, USA), cyclosporin은 Sandoz (Basel, Switzerland), 그리고 dipyridamole은 Boehringer Ingelheim(서울, KOREA)에서 구입하여 사용하였다.

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

2. 방 법

1) ^{99m}Tc -sestamibi의 준비

Hexakis (2-methoxyisobutylisonitrile) technetium (I)(Tc-MIBI)는 cardiolite[®] (Du Pont, Massachusetts, USA) cold vial에 ^{99m}Tc 를 표지하여 사용하였고, 세포배양 실험에서 ^{99m}Tc -sestamibi 용액의 농도는 100 μl 의 용량에 0.2~0.4 nM의 농도로 첨가하였다.

2) 세포배양 및 내성주 확립

L1210 세포는 RPMI 1640 배지에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% 항생제-항진균제 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 하에서 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 개/ml의 밀도로 유지하며 배양하였다. L1210 세포에서 *mdr1* 유전자의 과발현을 유도하여 다약제내성 세포주를 확립하기 위해 10% FBS를 함유한 RPMI

1640 배지에 10 μ M의 adriamycin 이나 1 μ M의 vincristine을 각각 처리하여 계대배양하였고 역전사 중합효소반응법(RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction)으로 *mdr1* 유전자 발현을 확인하였다.

3) 세포 내 ^{99m}Tc -sestamibi 섭취율 측정

세포가 밀생되면 수확하여 4°C의 RPMI 1640 배지로 2회 세척한 다음, serum-free RPMI 배지로 세포수가 $2\sim 3 \times 10^7$ 개/ml가 되도록 현탁하여 10% FBS를 함유한 phosphate buffered saline (PBS)으로 1시간 동안 포화시킨 튜브(Fisher, USA)에 200 μ l 씩 분주하였다. 여기에 cyclosporin은 0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μ M, verapamil은 0, 1, 10, 50, 100, 200 μ M 그리고 dipyridamole은 0, 10, 50, 100, 200, 500 μ M의 농도가 되도록 만든 PBS 용액으로 처리하여 4°C 또는 37°C에서 10분 동안 배양한 다음 200 μ Ci의 ^{99m}Tc -MIBI (0.2~0.4 nM in 100 μ l volume)를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 포화시킨 후 세포는 15,000 \times g에서 1분간 원심 분리하여 상층액과 침전물로 분리하였고, 감마계수기(Cobra II, Packard, USA)로 방사능 양을 측정하여 투여한 방사능의 섭취 백분율로 표시하였다. 세포 내 섭취율검사는 독립된 3회 이상의 검사한 성적을 평균하여 결과를 구하였다.

4) *mdr1* 유전자의 동정: RNA 분리 및 역전사 중합효소반응법(RT-PCR)

배양 시기 별로 수확한 세포를 1,000 \times g에서 5분간 원심 분리한 다음 4°C PBS로 2회 세척하였다. 침전된 세포에 TRI-용액 1 ml을 넣어 세포균질액을 만든 다음, 상온에서 10분간 두었다가 200 μ 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 10분간 건조시켜 50~200 μ l의 물에 녹인 후 55~60°C에서

완전히 용해시켰다.

분리한 RNA는 RT-PCR kit (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 RT-PCR을 실시하였다. 먼저 1 μ g의 RNA에 10 \times PCR buffer, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), RNase inhibitor (1 U), 2.5 μ M 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 \times PCR buffer, 2 mM MgCl₂, Taq DNA polymerase (2.5 U), *mdr1* primer (Bioneer, 대전)를 첨가하여 95°C에서 2분동안 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.

결과는 평균과 표준 편차로 표시하였고, 통계 처리는 SPSS 프로그램을 이용하였다. 통계분석은 T-검정, 단일변량 분산분석(ANOVA)를 실시하여 P 값이 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. *mdr1* 유전자 과발현 세포주의 확인

Adriamycin을 처리한 세포(이하 Adr 세포)를 RT-PCR한 결과 *mdr1* RNA의 발현 위치와 일치하는 곳에 강한 선형의 밴드를 보였고 vincristine을 처리한 세포(이하 Vcr 세포)에서는 adriamycin을 처리한 세포보다는 약하지만 뚜렷한 선형의 밴드를 보였다. 그리고 대조군으로 사용한 L1210 세포에서는 *mdr1* 유전자에 해당하는 밴드가 관찰되지 않았다 (Fig. 1).

2. *mdr1* 유전자 과발현이 ^{99m}Tc -MIBI 섭취에 미치는 영향

L1210 세포에서는 4°C와 37°C에서 각각 $18.5 \pm 4\%$ 와 $24 \pm 6\%$, Adr 세포에서는 $8.5 \pm 2.5\%$ 와 $12.5 \pm 5\%$, Vcr 세포에서는 $4.4 \pm 2.5\%$ 와 $11.5 \pm 3\%$ 로

37°C에서 배양한 경우에 모든 세포에서 세포 내 섭취

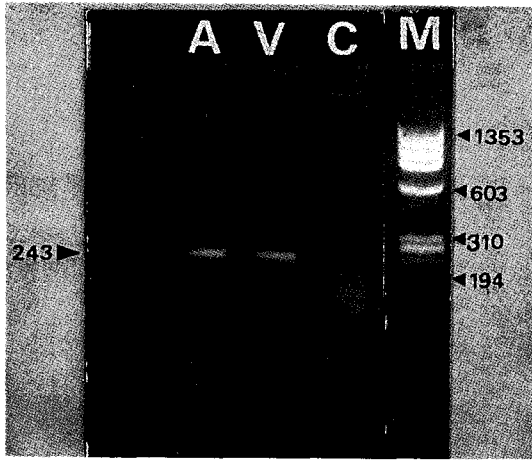


Fig. 1. Amplification of *mdr1* gene in adriamycin(A) and vincristine(V)-treated cell lines (A, V) identified by RT-PCR of *mdr1* gene. Control L1210 cell line(C) did not revealed a band compatible to *mdr1* gene (243 base pair) in electrophoresis gel plate. Adriamycin treated cell: A, Vincristine treated cell: V, L1210 cell: C, Molecular size marker: M. Numbers in the photo are base pair of the band.

취가 높았고, *mdr1*(-)인 L1210 세포에서 *mdr1*(+)인 Adr 세포와 Vcr 세포에서보다 4°C와 37°C 모두에서 유의하게 섭취가 높았다($p < 0.01$)(Fig. 2).

3. 다약제내성 극복제가 ^{99m}Tc-MIBI 섭취에 미치는 영향

1) Verapamil의 효과

Verapamil의 농도가 0, 1, 10, 50, 100, 200 μ M 일 때 L1210 세포에서는 각각 9.2%, 13.7%, 25.1%, 26.5%, 25.7%, 23.3%였고, Adr 세포에서는 각각 3.1%, 3%, 3.6%, 4.7%, 6.1%, 9.3%였다. 그리고 Vcr 세포에서는 각각 3.3%, 3.5%, 3.7%, 4.8%, 5.8%, 8.7%로 각 세포에서 verapamil 농도에 따라서 MIBI 섭취에 유의한 차이가 있었다($p < 0.001$, each)(Table 1).

Verapamil의 농도가 0일 때의 섭취를 기준으로 하였을 때 L1210 세포에서는 50 μ M일 때 288%로 최대 증가를 보였으나 Adr 세포와 Vcr 세포에서는 가장 고농도인 200 μ M에서 각각 300%, 255%로 최대의 증가를 보였다.

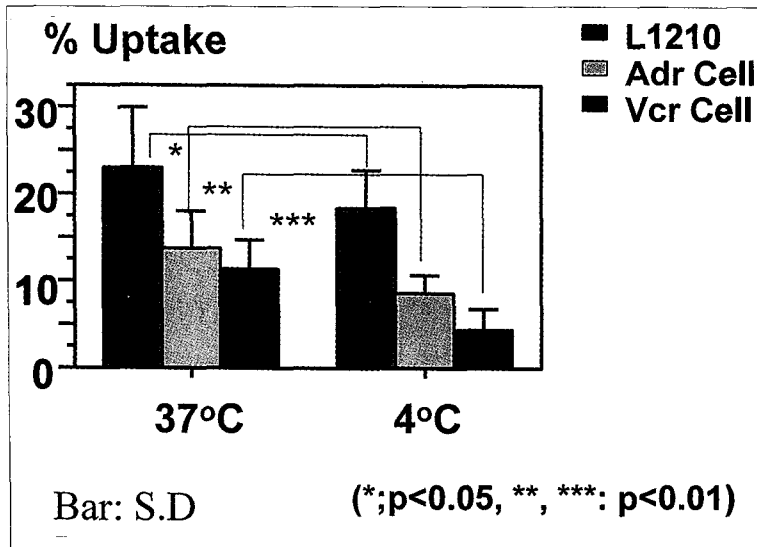


Fig. 2. Effect of incubation temperature on ^{99m}Tc-MIBI uptake in cells with and without *mdr1* gene expression. Cellular uptakes of ^{99m}Tc-MIBI were higher in *mdr1* (-) L1210 cells than those of *mdr1* (+) cells (Adr cell: adriamycin treated cell, Vcr cell: vincristine treated cell), and higher when incubated in 37°C than 4°C. Each bar represents the mean \pm s.d.

2) Cyclosporin의 효과

Cyclosporin의 농도가 0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μM 일 때 L1210 세포에서는 각각 11.5%, 16.3%, 26%, 25.0%, 19.4%, 16.8%였고, Adr 세포에서는 각각 2.1%, 3.5%, 2.9%, 10.5%, 12.7%, 10.8%였다. 그리고 Vcr 세포에서는 각각 3.7%, 1.9%, 2.2%, 6.9%, 8.7%, 8.6%로 각 세포에서 cyclosporin 농도에 따라서 MIBI 섭취에 유의한 차이가 있었다(p<0.001, each)(Table 2).

Cyclosporin의 농도가 0일 때의 섭취를 기준으로 하였을 때 L1210 세포에서는 1 μM에서 224%로 최대 증가를 보였고, Adr 세포와 Vcr 세포에서는 50 μM일 때 각각 604%, 235%로 최대의 증가를 보였다.

3) Dipyridamole의 효과

Dipyridamole의 농도가 0, 10, 50, 100, 200, 500 μM일 때 L1210 세포에서는 각각 10.1%, 18.0%, 22.5%, 23.9%, 25.5%, 26.4%였고, Adr 세포에서는

각각 3.8%, 3.1%, 2.8%, 5.9%, 5.6%, 6.8% 였다. 그리고 Vcr 세포에서는 각각 2.5%, 3.9%, 3.6%, 3.8%, 6.5%, 7.7%로 각 세포에서 dipyridamole 농도에 따라서 MIBI 섭취에 유의한 차이가 있었다 (p<0.001 in L1210 and Vcr cells, p<0.01 in Adr cell)(Table 3).

Dipyridamole의 농도가 0 μM일 때의 섭취를 기준으로 하였을 때 L1210 세포에서는 500 μM에서 261%로 최대의 증가를 보였고, Adr 세포와 Vcr 세포에서는 500 μM에서 각각 178%, 308%로 최대의 증가를 보였다. Fig. 3에 verapamil, cyclosporin, dipyridamole 투여 시의 ^{99m}Tc-MIBI 섭취 정도를 막대그래프로 나타내었다.

고 찰

1. 다약제내성의 탐색

백혈병과 여러 고형암의 항암제 치료에서 약제내성의 발생은 치료 실패의 가장 중요한 원인 중의 하나이다. 약제내성은 암 세포에 약제 치료 전에 존재

Table 1. Effect of Verapamil on ^{99m}Tc-MIBI Uptake in L1210 Cells with or without *mdr1* Overexpression

	0 μM	1 μM (%)	10 μM (%)	50 μM (%)	100 μM (%)	200 μM (%)
L1210	9.2±0.4	13.7±0.7 (148) [†]	25.1±0.7 (272)	26.5±0.3 (288)	25.7±2.8 (279)	23.4±0.4 (254)
Adr*	3.1±0.5	3±0.7 (96)	3.6±0.2 (116)	4.8±0.2 (154)	6.1±0.4 (196)	9.3±0.9 (300)
Vcr [†]	3.4±0.7	3.6±0.4 (105)	3.7±0.2 (108)	4.8±0.7 (141)	5.9±1.3 (173)	8.7±1.6 (255)

* Adr, adriamycin treated cell; [†] Vcr, vincristine treated cell

$$^{\dagger} \text{ relative MIBI uptake \%} = \frac{\text{MIBI uptake at each concentration of verapamil}}{\text{MIBI uptake at 0 } \mu\text{M of verapamil}} \times 100$$

Table 2. Effect of Cyclosporin on ^{99m}Tc-MIBI Uptake in L1210 Cells with or without *mdr1* Overexpression

	0 μM	0.1 μM (%)	1 μM (%)	10 μM (%)	50 μM (%)	100 μM (%)
L1210	11.6±2.1	16.3±1.6 (140) [†]	26±1 (224)	25.1±0.8 (216)	19.4±2.9 (167)	16.8±0.2 (144)
Adr*	2.1±0.3	3.6±1.2 (171)	2.9±0.3 (138)	10.5±1.8 (500)	12.7±3.0 (604)	10.8±0.8 (514)
Vcr [†]	3.7±3.1	1.9±0.6 (51)	2.2±0.3 (59)	6.9±0.4 (186)	8.7±0.9 (235)	8.6±1.0 (232)

* Adr, adriamycin treated cell; [†] Vcr, vincristine treated cell

$$^{\dagger} \text{ relative MIBI uptake \%} = \frac{\text{MIBI uptake at each concentration of verapamil}}{\text{MIBI uptake at 0 } \mu\text{M of verapamil}} \times 100$$

Table 3. Effect of Dipyridamole on ^{99m}Tc-MIBI Uptake in L1210 Cells with or without *mdr1* Overexpression

	0 μM	10 μM (%)	50 μM (%)	100 μM (%)	200 μM (%)	500 μM (%)
L1210	10.1±2.1	18.0±1.2 (178) [†]	22.5±2.6 (222)	23.9±2.2 (236)	25.5±0.5 (252)	26.4±1.3 (261)
Adr*	3.8±2.0	3.1±0.2 (81)	2.8±0.1 (73)	5.9±1.1 (155)	5.6±1.0 (147)	6.8±0.6 (178)
Vcr [†]	2.5±0.4	3.9±0.3 (156)	3.6±0.3 (144)	3.8±0.1 (152)	6.5±1.1 (260)	7.7±1.2 (308)

* Adr, adriamycin treated cell; [†] Vcr, vincristine treated cell

$$^{\dagger} \text{ relative MIBI uptake \%} = \frac{\text{MIBI uptake at each concentration of verapamil}}{\text{MIBI uptake at 0 } \mu\text{M of verapamil}} \times 100$$

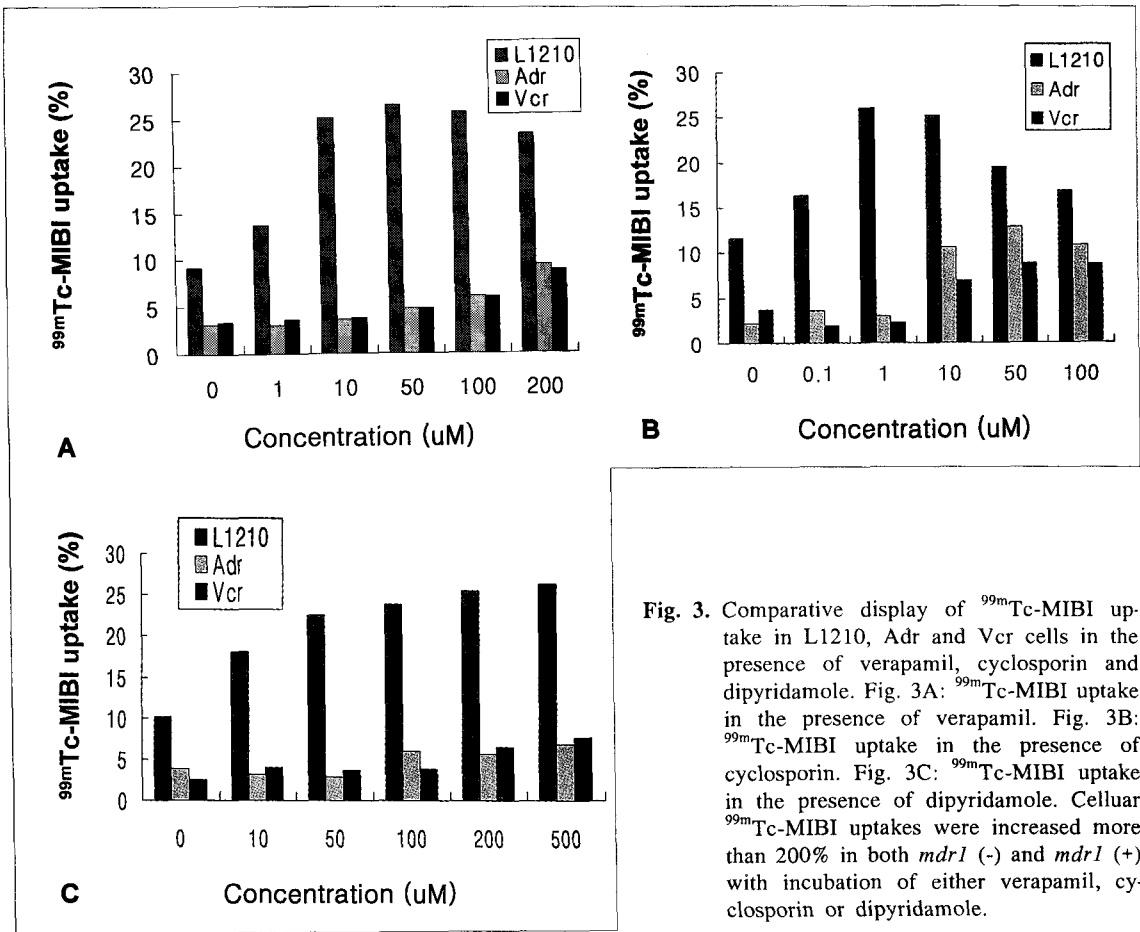


Fig. 3. Comparative display of ^{99m}Tc-MIBI uptake in L1210, Adr and Vcr cells in the presence of verapamil, cyclosporin and dipyridamole. Fig. 3A: ^{99m}Tc-MIBI uptake in the presence of verapamil. Fig. 3B: ^{99m}Tc-MIBI uptake in the presence of cyclosporin. Fig. 3C: ^{99m}Tc-MIBI uptake in the presence of dipyridamole. Cellular ^{99m}Tc-MIBI uptakes were increased more than 200% in both *mdr1* (-) and *mdr1* (+) with incubation of either verapamil, cyclosporin or dipyridamole.

하는 선천성 내성이 있고 항암제 치료 중에 발생하는 내성도 있다.²⁹⁾ 한 종류의 약제에 내성이 생긴 암세포는 그 작용기전이 전혀 다른 약제에 대해서도 내성이 발생하게 되는데 이를 다약제내성(multidrug resistance, MDR)이라 한다. 암세포에서 다약제내성

이 발생하는 기전으로는 세포막에 P-당단백이 생성되어 세포 내로 들어온 항암제를 세포 밖으로 배출(pumping)시켜 약효를 감소시키는 작용,³⁰⁾ 세포 독성 물질을 해독시키는 데 관여하는 glutathione의 농도 증가,³¹⁾ glutathione S-transferase (GST) 효소의

증가와 glutathione S-transferase (GST) 효소의 활성도 증가에 기인하는 것^{8,32)} DNA topoisomerase II의 억제로 약제의 작용 기관의 양상이 변화하거나 protein kinase C의 효소 활성화의 변화 등^{8,20)}이 알려진 바 있다. 지금까지 가장 널리 연구되어 왔던 기전은 *mdr1* 유전자에 의해 발현되는 P-당단백으로서 P-당단백은 1,280개의 아미노산으로 구성되고 세포막에 위치하며 ATP를 분해하여 세포 내로 들어온 항암제를 능동적으로 배출시키는 작용을 한다. 칼슘통로 차단제인 verapamil과 그 외의 몇 종류의 약제들은 세포막 P-당단백과 결합하여 P-당단백의 작용을 길항시킨다는 것이 밝혀져 있다. 다약제내성을 역전시킬 수 있는 약제들로는 칼슘통로 차단제, calmodulin 길항제, vinca alkaloid 유사체, steroid 제제, 면역억제제 등이 알려져 있고^{8,9)} 이 중 칼슘통로 차단제인 verapamil이 가장 많이 연구되어진 약제로 임상에서 처음으로 사용되어진 약제이다. 다약제내성 길항제들은 다양한 화학적 특성을 지니고 있으나, 소수성이고 양전하를 띤다.^{8,9)} 길항제들의 작용 기전으로는 MDR efflux transporter에 관여하는 공통적인 결합 부위에 대한 경쟁적 결합 또는 단백질 내의 인식 도메인(recognition domain)과의 친화성 변화 등이 제시되고 있다.⁶⁾

체외에서 mRNA 혹은 P-당단백의 발현을 측정하는 방법으로는 RT-PCR 외에 면역조직화학적염색(immunohistochemistry), 유세포분석기(flow cytometry) 등의 체외 검사법이 있는데, 지금까지의 고식적인 방법으로는 소량의 유전자를 찾기는 어려웠다.⁴⁾ 실제로 아주 적은 정도의 *mdr1* 유전자도 다약제내성을 유발할 수 있어 적은 양의 *mdr1* 유전자도 찾을 수 있는 방법이 필요한데 RT-PCR 같은 민감한 방법으로는 적은 양의 mRNA도 찾을 수 있다.^{7,9)}

심근관류스캔에 사용되는 ^{99m}Tc-MIBI가 P-당단백의 운반기질로 사용될 수 있다는 것이 알려지면서 ^{99m}Tc-MIBI를 이용하여 P-당단백의 발현을 체외영상으로 증명하고자 하는 연구들이 진행되었고, 연구자들은 P-당단백의 발현 정도와 MIBI의 섭취 정도 사이에 반비례 관계가 있음을 보고한 바 있다.^{14,15,34)}

이러한 연구들은 MIBI를 이용한 체외영상술의 가능성을 제안하여 P-당단백의 발현을 실제 세포를

추출하여 검사하는 기존의 방법보다 간편하고 항암제 치료전, 후의 비교검사, 추적검사 등에 유용하게 이용될 수 있다. 본 연구에서도 *mdr1*(-)인 L1210 세포에서 *mdr1*(+)인 Adr 세포나 Vcr 세포보다 MIBI 섭취가 높아 기존의 성적과 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 2). ^{99m}Tc-MIBI의 섭취는 음성 세포막전위에 의해서 섭취되고,³⁵⁾ MIBI의 세포 내 표적이 미토콘드리아 내부의 기질이므로⁹⁾ 섭취된 방사능의 90%가 미토콘드리아에 존재하며 에너지 의존적으로 섭취가 이루어진다고 알려져 있다.^{19,36,37)} 그리고 본 연구에서 저온(4℃)에서보다 고온(37℃)에서 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취가 높은 것은 Tsuruo 등^{22,36)}의 연구에서도 동일한 결과를 나타내었다. 이렇게 저온에서 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취가 낮은 것은 세포막 전위차의 감소로 인한 것이며, 섭취 정도가 아마도 대사활동의 정도를 반영하는 것이라고 생각된다. 한편, RT-PCR에서 *mdr1* 위치에 Adr 세포에서 Vcr 세포보다 더 강한 선형 밴드가 관찰되었고, MIBI 섭취는 Adr 세포에서 더 높았는데, 비록 이번 연구에서 정량적인 RT-PCR은 시행하지 못하였으나, *mdr1* mRNA의 발현 정도가 후전자 과정이 있는 후 결과로 만들어지는 최종산물인 P-당단백의 생성 정도와는 반드시 일치하지는 않는다는 것을 시사해 주는 소견이라 하겠다.

2. ^{99m}Tc-MIBI의 섭취에 대한 verapamil과 Cyclosporin 그리고 Dipyridamole의 영향

P-당단백에 길항작용을 하는 것으로 알려진 후 가장 많이 연구되어온 verapamil의 작용기전은 chemosensitizer로서의 작용과 P-당단백에 대한 경쟁적 억제(competitive inhibition) 등이 알려져 있다.¹¹⁾ Verapamil은 관상동맥 확장제로서 지용성 side chain을 갖고 있으며 Ca⁺⁺의 운반을 억제하며 신경 뇌하수체(neurohypophysis)에서 oxytocin과 vasopressin의 분비를 억제하고 췌장의 β -cell에서의 insulin 분비도 억제한다.¹²⁾ Verapamil의 경우 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취가 Adr 세포와 Vcr 세포에서만 기저치보다 증가(각각 300%, 255%)한 것뿐만 아니고 L1210 세포에서도 기저치 보다 증가(288%)하였다.

면역억제제로 널리 알려진 cyclosporin을 처리한 L1210 세포에서도 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취가 기저치 보다 증가(224%)하였으나 P-당단백이 발현된 Adr 세포와 Vcr 세포에서 각각 604%와 235%로 섭취증가의 정도가 더 컸다.

Dipyridamole은 관상동맥 확장 효과와 항혈소판 작용을 가지고 있어 심장판막 수술 후의 환자의 치료와 심장판막류스캔에 부하제로 사용되는 약제로서 dipyridamole도 다약제 내성을 극복할 수 있는 약제로 알려져 있다. Dipyridamole의 세포 작용기전은 phosphodiesterase 효소에 길항작용하여 cyclic-AMP의 세포 내 농도를 증가시키는 데 있으나, 다약제내성의 극복기전은 명확하게 규명되지 않았고 cyclosporin과 비슷하게 P-당단백을 직접 길항하는 것으로 추측된다. 본 연구의 결과에서는 dipyridamole도 *mdr1* gene이 발현된 경우는 물론이고 내성이 없는 군에서도 MIBI의 섭취를 증가시켰다. L1210 세포에서는 기저치 보다 261%, Adr과 Vcr 세포에서는 각각 178%와 308%로 역시 다약제 내성이 발현되지 않은 세포에서도 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취가 기저치 보다 증가하나 그 증가 정도는 차이가 없었다.

*mdr1*이 과다 발현된 Adr, Vcr 세포와 발현되지 않은 L1210 세포 모두에서 다약제내성 극복약제를 투여한 경우 세포 내의 ^{99m}Tc-MIBI 섭취가 증가되는 것은 Piwnica-Worms⁵⁾이나 Rao 등⁷⁾의 연구 결과와도 유사하였다. 이러한 현상은 다약제내성 극복제의 투여가 P-당단백이 발현된 정도와 무관하게 체내에서 항암제 감수성을 증가시킬 수 있다는 추론을 가능케하나, 그 의의에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다. 그 기전에 관해서는 칼슘의 축적이 세포 투과성에 영향을 미쳐서 일어난다는 설과, 약제내성에 있어서 *mdr1* 유전자와 관련된 P-당단백 외에 다른 기전의 존재, P-당단백의 변이형태 혹은 P-당단백 집단의 존재, verapamil의 부적절한 농도 등이 제시된 바 있다.^{21,38,39)} 또한 세포의 종류에 따라서 포화 농도가 다르게 나타났는데, 아마도 이것은 verapamil에 의한 칼슘 유입 억제에 대한 감수성이 각 세포 종류에 따라 달라서 관찰된 현상으로 추측된다.¹⁵⁾ 그리고 cyclosporin을 처리한 경우는 L1210 세포에서 Adr과 Vcr 세포에서 보다 섭취 증가의 정도

가 낮았고 특히 Adr 세포에서 섭취 증가의 정도가 컸다. 반면 verapamil이나 dipyridamole을 처리한 경우에 있어서는 L1210 세포에 비해 Adr 세포나 Vcr 세포에서 ^{99m}Tc-MIBI의 섭취 증가 정도가 크게 높지 않고 오히려 낮은 경우도 있었다. 이는 cyclosporin을 처리한 경우는 포화농도에 도달한 것으로 생각되나 verapamil이나 dipyridamole을 사용한 경우에는 포화농도에 도달하지 못하였기 때문으로 생각된다. Cyclosporin을 처리한 경우 처음 다약제 내성을 유도할 때 Adr 세포에서 Vcr 세포에서보다 RT-PCR에서 밴드가 더 강하게 나왔으므로 Adr 세포에서 다약제내성 유전자가 더 많이 발현되었다고 가정한다면, 길항제 사용시 이러한 유전자가 더 많이 발현된 곳에서 더 효과가 있을 것이라고 추측할 수 있을 것이다. 한 가지 고려해야 할 점은 앞에서 언급한 바와 같이 Adr 세포에서 Vcr 세포보다 밴드가 강하게 나왔으나, MIBI 섭취는 Vcr 세포보다 높아서 *mdr1* gene의 발현정도가 반드시 다약제 내성의 발현정도와 일치하지는 않는다는 점을 고려하여야 한다. 약제내성의 발현에 있어서 유전자의 증폭보다 유전자 활성화가 더 중요하다는 사실은 이미 보고된 바 있다.¹⁹⁾ 즉, 세포의 기능적인 약제배출 능력이 P-당단백의 발현과 일치하지 않을 수도 있다는 것인데, 이것은 이러한 다약제 내성이 MDR뿐만 아니라 MRP (multidrug resistance related protein), CD34같은 여러 다른 인자와도 관련이 있다는 보고로 보아 약제내성 원인의 다양성을 다시 한번 유추하게 하는 이유가 된다.²⁵⁾ 지금까지 연구되어온 verapamil은 다약제 내성인자를 역전시킬 수 있는 혈중 농도에서 저혈압, 심차단 같은 심독성을 초래할 수 있기 때문에 실제 임상에서 고용량으로 사용하기 어렵고, cyclosporin도 고용량으로 사용 시 신독성, 고혈압, 백혈구 감소증 등을 유발할 수 있으며 dipyridamole 역시 고용량으로 사용 시 저혈압, 심차단 등의 부작용을 유발할 수 있다.^{11,12)} 따라서 최근에는 좀더 특이적이고 독성이 약한 약들에 대한 개발의 필요성이 거론되어 왔다.²⁸⁾ 심독성이 적으면서 효과는 유사한 제2세대 약제로서, cyclosporin 유사체인 SDZ PSC 833과 verapamil 유사체인 KR-30035 등¹¹⁾이 연구되고 있어 앞으로 이러한 제2세대 che-

mosensitizer들에 대한 연구가 필요하겠다.

본 연구에서 다약제내성이 발현된 백혈병 세포에서는 약제내성이 없는 세포에 비하여 ^{99m}Tc -MIBI의 세포 내 섭취가 감소되고, 다약제내성 극복제로 알려진 verapamil, cyclosporin과 dipyridamole은 세포 내 ^{99m}Tc -MIBI 섭취를 증가시킨다는 사실을 보여주었다. 이러한 사실로 보아 ^{99m}Tc -MIBI는 P-당단백에 의해 인지되어지는 물질임을 확인할 수 있었고, ^{99m}Tc -MIBI는 암세포에서 P-당단백의 발현을 밝히고, P-당단백 길항제들의 작용을 규명하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

목적: 다약제내성인자가 과발현된 백혈병세포에서 ^{99m}Tc -MIBI가 인지되는 지를 알아보기 위하여 다약제내성 유전자가 발현된 세포와 발현되지 않은 세포에서의 ^{99m}Tc -MIBI의 섭취 정도를 측정하고, P-당단백의 길항제로 알려진 verapamil, cyclosporin 그리고 dipyridamole을 첨가하였을 경우 ^{99m}Tc -MIBI의 세포 내 섭취에 어떤 영향을 주는지 알아보고자 하였다. **대상 및 방법:** 다약제내성 인자가 발현되지 않은 대조군 세포로 murine leukemia cell인 L1210 세포를 사용하였고, 다약제내성 세포는 L1210 세포에 adriamycin과 vincristine을 첨가하여 유도하였다. 다약제내성의 발현은 RT-PCR로 증명하였고 verapamil은 0, 1, 10, 50, 100, 200 μM 의 농도로, cyclosporin은 0, 0.1, 1, 10, 50, 100 μM 의 농도로, 그리고 dipyridamole은 0, 10, 50, 100, 200, 500 μM 의 농도로 각각 사용하여 각각의 농도에서의 ^{99m}Tc -MIBI의 섭취를 감마 카운터로 측정하였다. **결과:** 1) 저용량의 adriamycin 혹은 vincristine을 *in-vitro*에서 처리하여 *mdr1* 유전자를 성공적으로 유도할 수 있었다. 2) *mdr1* 유전자가 발현된 세포에서 보다 발현되지 않은 세포인 L1210 세포에서 ^{99m}Tc -MIBI의 섭취가 더 높았고, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서보다 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 섭취가 더 높았다. 3) P-당단백의 작용을 길항시키는 약제로 알려진 verapamil 과 cyclosporin 그리고 dipyridamole을 첨가한 경우 *mdr1* 이 발현된 세포에서 ^{99m}Tc -MIBI 섭취의 증가정도가 더 컸다. 또한 다약

제 내성이 발현되지 않은 세포인 L1210 세포에서도 적은 정도이기는 하나 ^{99m}Tc -MIBI의 섭취가 증가하였다. **결론:** 다약제내성이 발현된 백혈병 세포에서는 ^{99m}Tc -MIBI의 세포 내 섭취가 감소되었고, 다약제내성 극복제로 알려진 verapamil, cyclosporin과 dipyridamole은 세포 내 ^{99m}Tc -MIBI 섭취를 증가시켰다. 본 연구의 결과로 보아 P-당단백에 의해 인지되는 ^{99m}Tc -MIBI는 암세포에서 P-당단백의 발현을 밝히고, P-당단백 길항제들의 작용을 규명하는 데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Lee KY, Park JG, Gazdar AF, Goldstein LJ, Hwang ES, Kim JP. Correlation between *MDR1* gene expression and *in vitro* drug sensitivity testing (DST) of human cancer cell lines. *Korean J Cancer Assoc* 1990;22:37-47.
- 2) 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.
- 3) Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* 1992;267:4854-8.
- 4) Clifford SC, Thomas DJ, Neal DE, Lunec J. Increased *mdr1* gene transcript levels in high-grade carcinoma of the bladder determined by quantitative PCR-based assay. *Br J Cancer* 1994;69:680-6.
- 5) 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.
- 6) Volm M, Mattern J, Pommerenke EW. Time course of MDR gene amplification during *in vivo* selection for Doxorubicin-resistance and during reversal in murine leukemia L1210. *Anticancer Res* 1991;11:579-86.
- 7) 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-sesta-

- mibi. *J Nucl Med* 1994;35:510-5.
- 8) Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 1988;263:12163-6.
 - 9) Piwnica-Worms D, Rao VV, Kronauge JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance P-glycoprotein transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
 - 10) Noonan KE, Beck C, Holzmayer TA, Chin JE, Wunder JS, Andrulis IL, et al. Quantitative analysis of *MDR1* (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7160-4.
 - 11) 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.
 - 12) Luker GD, Fracasso PM, Dobkin J, Piwnica-Worms D. Modulation of the multidrug resistance P-glycoprotein: Detection with technetium-99m-sestamibi *in vivo*. *J Nucl Med* 1997;38:369-72.
 - 13) 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;39:228-34.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) Cayre A, Moins N, Finat-Duclos F, Verrelle P, Maublant J. Comparison between technetium-99m-sestamibi and hydrogen-3-daunomycin myocardial cellular retention *in vitro*. *J Nucl Med* 1997;38:1674-7.
 - 19) Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:265-9.
 - 20) Kaye SB. P glycoprotein (P-gp) and drug resistance-time for reappraisal? *Br J Cancer* 1993;67:641-3.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) Cairo MS, Siegel S, Anas N, Sender L. Clinical trial of continuous infusion verapamil, bolus vincristine, and continuous infusion VP-16 in drug-resistant pediatric tumors. *Cancer Res* 1989;49:1063-6.
 - 24) Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Eng J Med* 1987;316:1388-93.
 - 25) Leith CP, Chen I-M, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Godwin JE, et al. Correlation of multidrug resistance (*MDR1*) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: Identification of discordant *MDR1*⁺/*Efflux*⁻ and *MDR1*⁺/*Efflux*⁺ cases. *Blood* 1995;86:2329-42.
 - 26) Parce HL, Safa AR, Bach NJ, Winter MA, Cirtain MC, Beck WT. Essential features of the P-glycoprotein pharmacophore as defined by a series of reserpine analogs that modulate multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:5128-32.
 - 27) Germann UA, Willingham MC, Pastan I, Gottesman MM. Expression of the human multidrug transporter in insect cells by a recombinant Baculovirus. *Biochemistry* 1990;29:2295-303.
 - 28) Ford JM, Bruggemann EP, Pastan I, Gottesman MM, Hait WN. Cellular and biochemical characterization of thioxanthenes for reversal of multidrug resistance in human and murine cell lines. *Cancer Res* 1990;50:1748-56.
 - 29) Fojo A, Hamilton TC, Young RC, Ozols RF.

- Multidrug resistance in ovarian cancer. *Cancer* 1987;60:2075-80.
- 30) Skovsgaard T. Mechanism of cross resistance between vincristine and daunorubicin in Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 1978;38:4722-7.
- 31) Moretti J-L, 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.
- 32) Relle-Somfai S, Suzukake K, Vistica BP, Vistica DT. Reduction in cellular glutathione by buthionine sulfoximine and sensitization of murine tumor cells resistant to L-phenylalanine mustard. *Biochem Pharmacol* 1984;33:485-99.
- 33) Kostakoglu L, Gucc D, Capinar H, Kars A, Alper E, Kirath P, et al. P-glycoprotein expression by technetium-99m-MIBI scintigraphy in hematologic malignancy. *J Nucl Med* 1998;39:1191-7.
- 34) Kostakoglu L, Ruacan S, Ergun EL, Sayek I, Elahi N, Bekdik CF. Influence of the heterogeneity of P-glycoprotein expression on technetium-99m-MIBI uptake in breast cancer. *J Nucl Med* 1998;39:1021-6.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) Endicott JA, Ling V. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Review Chem* 1989;58:137-71.
- 38) Mirski SEL, Gerlach JH, Cole SPC. Multidrug resistance in a human small cell lung cancer cell line selected in adriamycin. *Cancer Res* 1987;47:2594-8.
- 39) Dalton WS, Cress AE, Alberts DS, Trent JM. Cytogenetic and phenotypic analysis of a human colon carcinoma cell line resistant to mitoxant-rone. *Cancer Res* 1988;48:1882-8.