

P-Glycoprotein과 Multidrug Resistance Associated Protein을 발현하는 암세포와 종양에서 Tc-99m Sestamibi와 Tc-99m Tetrofosmin의 섭취율 비교

경북대학교 의과대학 핵의학교실, 내과학교실¹, 약리학교실²

조정아 · 이재태 · 유정아 · 서지형 · 배진호 · 정신영 · 안병철 · 손상균¹ · 하정희² · 이규보

Comparative Uptake of Tc-99m Sestamibi and Tc-99m Tetrofosmin in Cancer Cells and Tissue Expressing P-Glycoprotein or Multidrug Resistance Associated Protein

Jung-Ah Cho, M.D., Jaetae Lee, M.D., Jung Ah Yoo, Ph.D., Ji Hyoung Seo, M.D., Jin Ho Bae, M.D., Shin Young Jeong, M.D., Byeong Cheol Ahn, M.D., Sang Gyun Sohn, M.D.¹, Jeoung-Hee Ha, M.D.², and Kyubo Lee, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Internal Medicine¹, and Pharmacology², School of Medicine, Kyungpook National University, Daegu, Korea

Purpose: ^{99m}Tc-sestamibi(MIBI) and ^{99m}Tc-tetrofosmin have been used as substrates for P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance associated protein (MRP), which are closely associated with multidrug resistance of the tumors. To understand different handling of radiotracers in cancer cell lines expressing Pgp and MRP, we compared cellular uptakes of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin. The effects of cyclosporin A (CsA), well-known multidrug resistant reversing agent, on the uptake of both tracers were also compared. **Materials and Methods:** HCT15/CL02 human colorectal cancer cells for Pgp expressing cells, and human non-small cell lung cancer A549 cells for MRP expressing cells, were used for in vitro and in vivo studies. RT-PCR, western blot analysis and immunohistochemistry were used for detection of Pgp and MRP. MDR-reversal effect with CsA was evaluated at different drug concentrations after incubation with MIBI or tetrofosmin. Radioactivities of supernatant and pellet were measured with gamma well counter. Tumoral uptake of the tracers were measured from tumor bearing nude mice treated with or without CsA. **Results:** RT-PCR, western blot analysis of the cells and immunochemical staining revealed selective expression of Pgp and MRP for HCT15/CL02 and A549 cells, respectively. There were no significant difference in cellular uptakes of both tracers in HCT15/CL02 cells, but MIBI uptake was slightly higher than that of tetrofosmin in A549 cells. Co-incubation with CsA resulted in a increase in cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin. Uptake of MIBI or tetrofosmin in HCT15/CL02 cells was increased by 10- and 2.4-fold, and by 7.5 and 6.3-fold in A549 cells, respectively. Percentage increase of MIBI was higher than that of tetrofosmin with CsA for both cells ($p < 0.05$). In vivo biodistribution study showed that 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 increased by the time, up to 240 min with CsA. But increases in tumoral uptake were not significantly different between MIBI and tetrofosmin for both tumors. **Conclusion:** MIBI seems to be a better tracer than tetrofosmin for evaluating MDR reversal effect of the modulators in vitro, but these differences were not evident in vivo tumoral uptake. Both MIBI and tetrofosmin seem to be suitable tracers for imaging Pgp- and MRP-mediated drug resistance in tumors. (Korean J Nucl Med 39(1):34-43, 2005)

Key Words : ^{99m}Tc-sestamibi, ^{99m}Tc-tetrofosmin, Cancer cell, Multidrug resistance, P-glycoprotein, Multidrug resistance associated protein.

• Received: 2005. 1. 17. • Accepted: 2005. 2. 12.

• Address for reprints: Jaetae Lee, M.D., Department of Nuclear Medicine, School of Medicine, Kyungpook National University, #50 Samduk-dong, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea
Tel: 82-53-420-5586, Fax: 82-53-422-0864

E-mail: jaetae@knu.ac.kr

* 본 연구는 과학기술부 원자력중장기 연구사업 다약제내성관련 분야 핵의학기술 개발 M2-0243-01-0003 과제의 지원으로 이루어 졌음.

서 론

악성종양의 항암제 치료 실패의 가장 중요한 원인은 암세포가 여러 종류의 항암제에 대한 교차내성이 동시에 나타나는 다약제내성(multidrug resistance, MDR)의 발생이며, 다약제내성은 P-glycoprotein (Pgp)이나 multidrug resistance

associated protein (MRP)과 같은 단백질이 암세포의 세포막에 과도하게 생성되는 것이 가장 중요한 원인이다.¹⁻³⁾ Pgp는 *mdr1* 유전자의 발현에 의해 조절되는 세포막의 170 kDa 당단백질로 ATP를 이용하는 ATP-binding cassette transporter군에 속하며 anthracyclines, vinca alkaloids, topoisomerase II inhibitor 등과 같은 항암 치료약물을 세포로부터 제거시킬 뿐만 아니라 세포내 약물 축적을 감소시켜, 결과적으로 암세포 내부의 약제농도를 감소시킴으로서 약제에 대한 내성을 유발시키는 대표적인 단백질이다.⁴⁻⁷⁾ 항암 약제의 배출펌프 기능과 관련된 또 다른 단백질인 MRP는 190 kDa의 크기를 가지며, Cole 등⁸⁾에 의해 항암제 내성을 가진 소세포 폐암 H69AR세포에서 처음 확인되었다.

지용성 방사성의약품인 ^{99m}Tc-sestamibi (MIBI)와 ^{99m}Tc-tetrofosmin은 심근관류를 추적하는 방사성 의약품으로 개발되었으나, 암의 진단 및 치료방법의 선택, 치료 후의 추적 관찰 등에 널리 이용되어 왔다.^{9,10)} 그러나 MIBI와 tetrofosmin의 종양 내 축적은 항암제들의 세포내 섭취기전과 유사하므로 Pgp나 MRP의 발현 정도에 의해 영향을 받는다. Piwnicka-Worms 등^{11,12)}이 Pgp가 MIBI를 세포외로 배출시킴으로서 약제내성이 발현된 암세포에서는 MIBI저류가 감소된다고 보고한 이후, MIBI는 Pgp와 MRP의 운반기질로 인정되어 암세포의 다약제내성 연구와 악성종양 환자의 다약제내성 발현의 예측과 예후 평가에 널리 이용되고 있다. Diphosphine 계열의 Tc-99m tetrofosmin도 지용성 양이온 화합물로서 MIBI와 유사한 기전으로 악성종양의 다약제내성 발현 평가에 사용되고 있다.^{13,14)} 따라서, 핵의학영상에서 암조직의 MIBI와 tetrofosmin섭취를 정량적으로 측정하면 다약제내성 유전자의 과발현에 의한 Pgp와 MRP의 과발현을 예측하여 항암 치료에 직접 도움을 줄 수 있다고 보고된 바 있다.¹⁵⁾

MIBI와 tetrofosmin은 악성종양의 평가에 이용되고 있으나 두 약제를 직접 비교한 연구는 적고, 세포 실험에서 MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취정도를 비교한 연구들은 실험에 사용한 세포의 종류에 따라 서로 상이한 결과들을 보여주었다.¹⁶⁾ 또한 대부분의 실험들은 약제내성이 없는 림프종세포, 유방암세포, 연조직 육종세포들을 이용한 연구였으며,^{17,18)} 약제내성을 평가하기 위하여 MIBI와 tetrofosmin섭취에 대한 비교연구는 드물다.

저자들은 약제내성 극복제의 효능평가에서 MIBI와 tetrofosmin의 유용성을 비교하고자, Pgp와 MRP가 각각 발현된 두 종류의 암세포를 이용한 시험관 실험과 종양이식 생쥐에서의 체외분포 실험으로 다약제내성 암세포에서의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 비교하였다. Pgp와 MRP

에 의한 다약제내성을 극복하는 cyclosporin A (CsA) 처치 시 악성종양세포내에서 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취의 변화를 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

다약제내성 암세포로는 doxorubicin에 의해 약제내성이 유발된 인체 대장암 HCT15/CL02¹⁹⁾세포주를 한국화학연구소에서 분주받았고, MRP를 발현한다고 알려진 인체 비소세포 폐암 A549세포주는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다. RPMI-1640, fetal bovine serum, penicillin-streptomycin 등의 세포 배양용 시약들은 GIBCO BRL (Grand Island, USA)에서, CsA는 Sandoz (Basel, Switzerland)에서 구입하여 0.9% 생리식염수로 0.1, 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 실험할 때마다 희석하여 사용하였다. RNA분리용 TRI-Reagent는 MRC (Cincinnati, OH), RT-PCR Kit는 Perkin Elmer (New Jersey, USA), *mdr1* primer는 Bioneer (대전, Korea)에서 구입하여 사용하였다. P-170-glycoprotein (clone JSB-1)과 MRP항체 (clone MRPr1)는 Monosan회사 (Netherlands)에서 구입하였다.

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

동물실험은 생후 8~14주, 체중 20 gm 암컷 누드마우스 (BALB/c-nu/nu nude mouse, 한국 화학연구원, 대전)를 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 첨가하여 방사성 의약품의 최종농도는 0.1 MBq (50 nmol/ml)이 되었다.

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. 세포는 수확하여 새로운 배지로 세척한 후 1.0×10⁶ cells/ml의 농도로 부유시킨 상태에서 사용하였으며, 약제내성을 나타내는 암세포를 항암제가 없는 상태로 계속 계대배양하여 다시 내성이 없어지는 경우를 방지하기 위하여 실험하기 일주일 전에 doxorubicin과 vincristine을 각각 0.1 mg/ml이 되도록 처리하고 4주정도 추가배양 한 후 사용하였다.

3) 역전사 중합효소 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 50200 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 243 bp에서 나타났다. RT-PCR에 이용한 *mdr1* primer 의 핵산배열은 아래와 같다.

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

4) MRP 단백질에 대한 western blot 분석

Western blot 분석을 하기 위해 A549세포와 MRP가 발현되지 않는 HCT15/CL02세포들은 얼음물로 세 번 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 µl씩 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 µg)을 sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, nitrocellulose membrane (NC)에 옮겼다. 이어 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 1시간씩 반응시켰다. 각 반응사이에 TBS-T로 10분씩 3회 수세하였다. 이어서 항체에 대한 대응 단백질 밴드는 enhanced chemiluminescence (Amersham/Pharmacia Biotech, USA) 검사법으로 확인하였다.

5) 면역조직화학 염색

파라핀에 포매된 조직은 3~4 µm 두께로 절단하여 슬라이드에 부착시켜 60°C 항온기에서 2시간 방치한 후, 탈파라핀과 함유과정을 거쳐 증류수로 세척하고 3% 과산화수소용액에 30분간 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) 방사성 의약품의 세포내 섭취율 측정

배양한 세포의 현탁액 5 ml를 10분 동안 37°C 항온수조에서 두고 실험하였고, CsA는 MIBI와 tetrofosmin을 처리하기 전 10분 동안 농도별로 처리하였다. 여기에 100 µl의 MIBI 혹은 tetrofosmin을 첨가하여 30분과 60분 동안 반응시킨

후, 각각 300 μ l의 용액을 4°C의 생리식염수 1 ml이 든 튜브로 옮겼다. 14,000 rpm에서 2분간 원심분리 한 후 상층액과 침전물을 분리하고 침전물들은 충분히 말린 후, 1분 동안 감마 계수기로 140 keV에너지에서 각각의 방사능 치를 측정하여 투여한 방사능 치에 대한 섭취 백분율로 표시하였다. 세포 섭취율의 측정은 독립된 3회 이상의 실험결과를 평균하여 구하였다.

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

7) 누드마우스에 이종이식된 종양 내 섭취율의 측정

10^5 - 10^6 개/200 μ l의 HCT15/CL02 세포와 A549 세포를 누드마우스의 양쪽 체간에 각각 피하접종하고 3~4주간 사육하여, 종양의 크기가 1 gm 정도로 자란 뒤 3~4마리를 한 군으로 하여 각 세포별로 20마리씩, 합계 40마리로 체내분포 측정 실험을 하였다. CsA에 의한 종양조직 내의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취변화를 비교하기 위하여 MIBI 대조군과 CsA 처리한 MIBI 군, tetrofosmin 대조군과 CsA 처리한 tetrofosmin 군 등 4군으로 나누어 실험하였다. 대조군은 생리식염수를, CsA 처리군은 CsA 70 mg/kg을 생리식염수에 녹여 복강에 주사하였으며, 1시간 후에 MIBI 또는 tetrofosmin 370 KBq을 각각 꼬리정맥으로 주사하였다. 방사성의약품 주사 후 10분, 60분, 240분에 enflurane 마취를 시행하였고, 실험로서 동물들을 희생시켜 종양과 장기들을 적출하였으며, 혈액을 닦은 후 무게를 측정하였다. 장기와 종양조직은 감마계수기로 방사능을 측정하였고 주사량에 대한 무게별 장기섭취율(% injected dose/gm of organ, %ID/gm)을 계산하였다.

결 과

1. 세포에서 Pgp와 MRP 발현의 측정

HCT15/CL02세포에서 Pgp에 대한 *mdr1* 유전자의 과발현을 RT-PCR로 증명할 수 있었으나, A-549세포의 RT-PCR에서는 *mdr1* 유전자의 밴드를 관찰할 수 없었다(Fig. 1). A549세포는 MRP의 아형중 MRP1에 대한 MRPr1 항체(clone MRPr1)를 이용한 western blot analysis에서 약 190 kDa에 해당하는 MRPr1 밴드를 나타내는 반면, HCT15/CL02세포에서는 MRPr1에 해당하는 밴드가 관찰되지 않았다(Fig. 2).

2. 종양조직의 면역화학 염색

종양 세포를 누드마우스에 피하주사 후 평균 4주정도 지

난 후, 각각 1 gm 정도의 종양이 양쪽 체간에 형성되었으며, 종양조직을 Hematoxylin-eosin 염색과 P-170-glycoprotein 및 MRPr1 항체를 이용한 면역조직화학 염색의 결과는 시행한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. HCT15/CL02 종양의 세포막에는 Pgp에 대한 항체로 갈색 염색되었으며, A549 종양조직은 MRP항체에 대하여 염색되었다. HCT15/CL02 종양과 A549세포는 각각 MRP항체와 Pgp항체로 염색되지 않았다.

3. HCT/CL02 세포와 A549세포에서의 MIBI 와 tetrofosmin 섭취율 비교

HCT15/CL02 대장암세포와 MIBI를 30분, 60분 배양하였을 때의 MIBI 섭취율은 각각 $0.47 \pm 0.04\%$, $0.48 \pm 0.08\%$ 였고, tetrofosmin의 30분, 60분 섭취율은 $0.42 \pm 0.11\%$, $0.49 \pm$

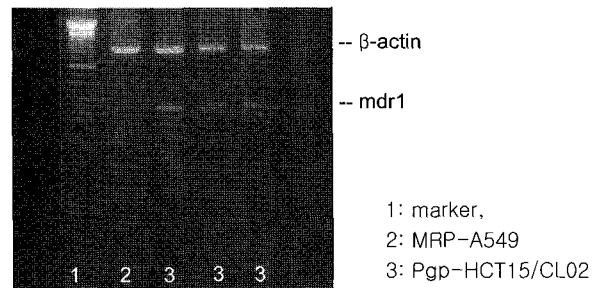


Fig. 1. RT-PCR products demonstrated *mdr1* gene expression in cancer cell lines. HCT15/CL02 cell (lane 3) demonstrated *mdr1* gene expression in RNA samples, whereas *mdr1* gene expression was not detected in A549 cell (lane 2).

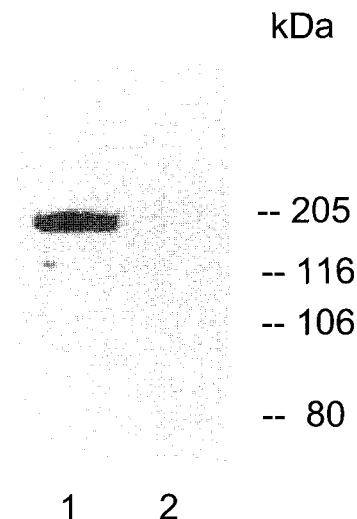
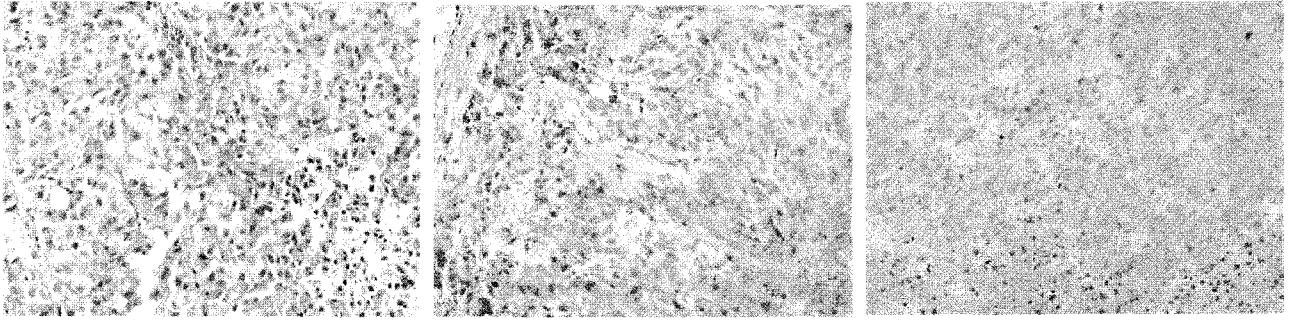
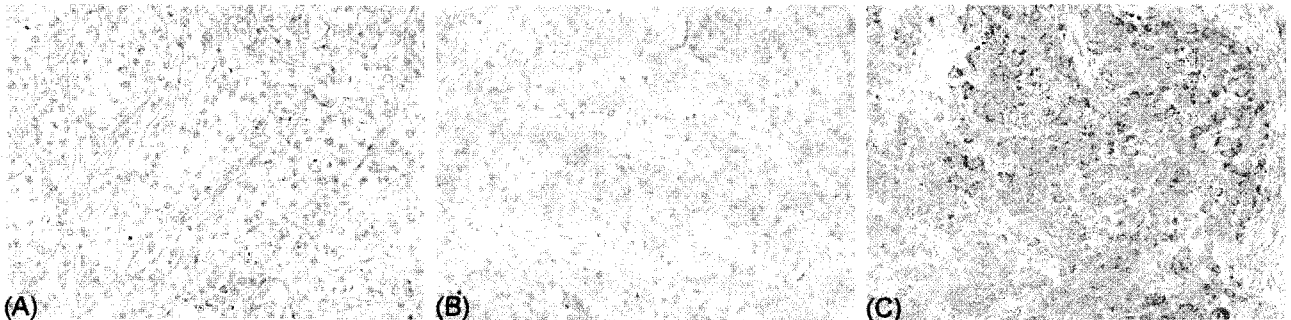


Fig. 2. MRP was demonstrated by western blot analysis of cancer cell lines. Protein (30 μ g) was fractionated in a 7.5% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. MRP was visualized with monoclonal antibody against MRPr1 (190kDa). 1: A549 cell, 2: HCT15/CL02 cell.

MRP-A549



Pgp-HCT15/CL02



(A) Hematoxylin-eosin staining

(B) Immunochemical staining with anti-MRP r1

(C) Immunochemical staining with anti-Pgp antibody

Fig. 3. A549 tumor was only stained brownish with anti-MRP1 antibody and HCT15/CLO2 tumor was only stained with anti-P-170-glycoprotein antibody. Hematoxylin-eosin staining is demonstrated to show histology.

Table 1. Comparison of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin uptake in Pgp-positive HCT15/CLO2 tumor cells with and without cyclosporin A(CsA) treatment.

		30 min	60 min
MIBI	control	0.47±0.04*	0.48±0.08
	CsA	3.08±0.14**	5.29±0.18**
Tetrofosmin	control	0.42±0.11	0.49±0.10
	CsA	0.79±0.18**	1.26±0.08**

* Cellular uptakes of MIBI were similar to those of tetrofosmin (p=0.09)
 ** CsA increased cellular uptakes of both MIBI and tetrofosmin (p<0.05)

0.1%로 MIBI와 tetrofosmin 섭취율은 유의한 차이가 없었다. CsA를 0.1, 1, 10, 50, 100 μM의 농도로 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 시간이 지남에 따라 기저치보다 증가하였으므로, 50 μM일 때 최고 섭취율로 비교하였다. 50 μM 농도의 CsA 로 30분간 배양했을 때의 두 추적자의 섭취정도를 비교해 보면 MIBI는 10배 증가하나 tetrofosmin은 2.4배 증가하여, CsA에 의한 MIBI 섭취율의 증가가 tetrofosmin보다 4배 이상 높았다(p<0.05)(Table 1).

A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin 섭취율은 30분, 60분간 배양하였고 30분 배양시 MIBI섭취는 1.73±0.01%,

tetrofosmin은 1.37±0.12%였으며, 60분 배양시 MIBI섭취는 1.89±0.02%였고, tetrofosmin은 1.43±0.03%로 MIBI의 섭취정도가 tetrofosmin보다 높았다(p<0.05). CsA (50 μM)로 30분 처리했을 때 MIBI섭취는 10.54±0.39%로 증가하였고, tetrofosmin은 5.52±0.08%로 증가하였다. 60분 처리했을 때의 MIBI섭취는 14.42±0.66%였고, tetrofosmin 섭취는 9.00±0.14%로 증가하여 두 방사성의약품의 세포내 섭취율은 모두 유의하게 증가하였다(p<0.05). 60분 기저치를 기준으로 각각의 억제제에 의한 섭취율의 증가정도는 CsA (50 μM)에 의해서 MIBI는 763%, tetrofosmin은 629% 증가하여

Table 2. Comparison of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin uptake in MRP-positive A549 tumor cells with and without cyclosporin A(CsA) treatment.

		30 min	60 min
MIBI	control	1.73±0.01*	1.89±0.02*
	CsA	10.54±0.39**	14.42±0.03**
Tetrofosmin	control	1.37±0.12	1.43±0.03
	CsA	5.52±0.08**	9.00±0.14**

* Cellular uptakes of MIBI were higher than those of tetrofosmin (p<0.05)
 **CsA increased cellular uptakes of MIBI and tetrofosmin (p<0.05)

Table 3. Comparison of uptake of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin in Pgp-positive HCT15/CLO2 tumor tissue with and without cyclosporin A (CsA) treatment.

		10 min	60 min	240 min
MIBI	control	0.27±0.02	0.18±0.03	0.11±0.05
	CsA	0.43±0.08	0.58±0.05	0.32±0.02
Tetrofosmin	control	0.27±0.04	0.18±0.08	0.13±0.05
	CsA	0.41±0.08	0.34±0.06	0.27±0.04

* No significant differences in both tracer uptakes except at 60 minute. CsA increased tumoral uptakes of MIBI and tetrofosmin (p<0.05). Numbers are represented as percentage injected dose per gram of tissue (%ID/gm)

Table 4. Comparison of uptake of ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin uptake in MRP-positive A549 tumor tissue with and without cyclosporin A (CsA) treatment.

		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±0.25	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±0.10

* No significant differences between two tracers. CsA increased tumoral uptakes of MIBI and tetrofosmin (p<0.05) Numbers are represented as percentage injected dose per gram of tissue (%ID/gm)

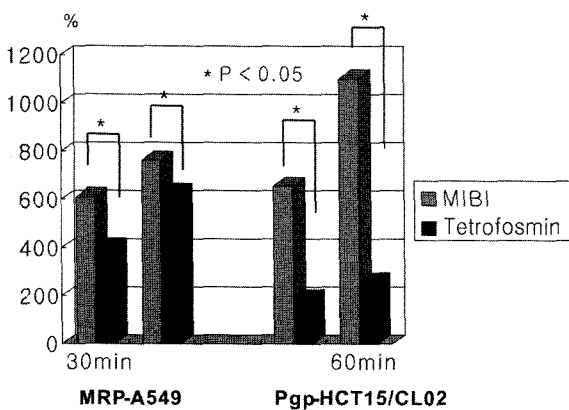


Fig. 4. In comparison of percentage increases between MIBI and tetrofosmin (Tf) in vitro by cyclosporin A, percentage increases in MIBI uptake were higher than Tf uptake in both cancer cells.

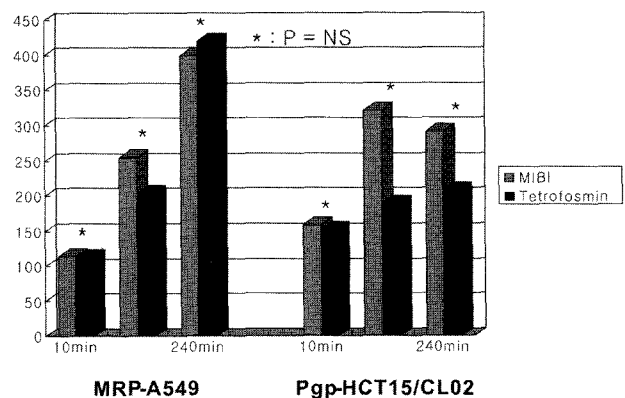


Fig. 5. In comparison of percentage increases in tumor uptakes between MIBI and tetrofosmin (Tf) in Pgp or MRP tumors xenografted in nude mice, there were no significant differences in percentage increases of uptake between MIBI and Tf for both HCT15/CLO2 and A549 tumors.

A549세포에서 MRP억제제들에 의한 세포내 섭취증가 정도는 MIBI가 tetrofosmin보다 모두 높았다($p<0.05$) (Table 2) (Fig. 4).

4. CsA가 장기 및 종양조직에서 MIBI와 tetrofosmin 섭취에 미치는 영향

MIBI와 tetrofosmin의 정맥주사 10분 후에 혈액 1 gm당 섭취율이 1%이하로 빠르게 혈중에서 소실되어 체내장기에 분포하였으며, 장기의 무게당 섭취율은 신장이 가장 높았고, 간과 장의 섭취도 높았다. 시간이 경과함에 따라 간과 신장의 섭취는 감소하였으나 장의 섭취는 증가하였다. CsA 주사 후 간과 신장에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 두 가지 모두 증가 되었다. MIBI와 tetrofosmin의 주사 후 10분에서 CsA에 의한 간과 신장의 섭취를 증가정도를 10분 기저치와 비교하였을 때, 간은 각각 186%와 111%로, 신장에서는 각각 177%와 162%로 유의하게 증가하였다.

HCT15/CL02 종양의 MIBI와 tetrofosmin 섭취율은 A549 종양보다 낮았으나, HCT15/CL02 및 A549종양 모두에서 MIBI와 tetrofosmin 섭취정도는 유의한 차이가 없었다 (Table 3, 4). CsA처리 후 종양조직의 MIBI와 tetrofosmin 섭취는 증가하였다. HCT/CL02세포에서는 MIBI섭취가 10분에 150%, 60분에 318%, 240분에 287%로 증가하였고, tetrofosmin섭취는 10분에 147%, 60분에 179%, 240분에 202%로 증가하여 MIBI섭취의 증가가 높았으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다. A549세포에서 MIBI섭취는 10분에 114%, 60분에 257%, 240분에 396%로 증가하였고, tetrofosmin섭취는 10분에 110%, 60분에 205%, 240분에 410%로 증가하였다. CsA 주사 후 MIBI섭취는 60분과 240분에서 유의하게 증가하였고(각각 $p<0.05$), tetrofosmin 섭취도 60분과 240분에서 유의하게 증가하였으나(각각 $p<0.05$), MIBI와 tetrofosmin 섭취율의 증가정도는 두 방사성의약품 간에 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

고 찰

^{99m}Tc-MIBI와 ^{99m}Tc-tetrofosmin은 다약제내성과 연관된 Pgp나 MRP의 운반기질로 사용될 수 있는 지용성 양이온 화합물으로서 암세포의 다약제내성 발현을 예측하기 위하여 영상진단에 사용되어 왔다.^{15,20,21)}

Pgp나 MRP가 발현된 암세포와 종양조직에서 MIBI와 tetrofosmin의 성능을 비교한 본 연구는 다약제내성 *mdr1* 유전자와 Pgp단백질이 발현된 대장암 HCT15/CL02 세포와 MRP가 발현된 인체 비소세포폐암 A549 세포주 및 종양조

직에 대한 약제내성 발현의 평가 시 MIBI와 tetrofosmin 모두가 유용하게 이용될 수 있을 것이라는 사실을 확인시켜 주었다. 약제내성 극복제의 효능을 평가하기 위하여, 세포내 방사성의약품의 섭취증가 정도를 정량화하는 목적으로 사용할 경우에는 MIBI가 다소 유리할 것으로 생각할 수 있었다. HCT15/CL02 세포는 다약제내성을 소량 발현하는 대장암 HCT15 세포를 모세포로 하여 약제내성의 발현을 더욱 증가시켜서 생성한 세포로서 본 연구에서 RT-PCR과 면역조직화학염색으로 Pgp 만이 발현된 것을 알 수 있었다. A549세포는 세포막에 MRP를 발현하는 세포로 다른 연구자들도 다약제내성 역전제에 의해 MIBI의 섭취증가가 관찰된다고 보고된 바 있었다.^{22,23)} *Mdr1* 유전자를 측정하는 RT-PCR방법으로도 A549세포는 *mdr1* mRNA가 발현되지 않음을 관찰할 수 있었다. 그러므로 본 연구에 사용된 HCT/CL02세포와 A549세포를 누드마우스의 체간에 각각 이식한 본 연구의 결과로 단일 개체에 이식한 Pgp 및 MRP 발현 종양에서의 MIBI, tetrofosmin의 섭취를 평가할 수 있는 장점이 있어 서로 비교할 수 있다.

본 연구에서는 암세포들을 37°C에서 1시간동안 배양하였을 때, MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도는 시간이 경과함에 따라 점차 증가하였고, 각각의 배양시간에 따른 MIBI와 tetrofosmin의 세포내 섭취정도는 HCT15/CL02세포와 A549세포 모두에서 MIBI와 tetrofosmin 섭취 사이에 유의한 차이가 없었다. 다약제내성이 발현된 암세포를 CsA를 처리하였을 때, MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 배양 15분부터 1시간까지 측정된 값이 모두 기저치보다 증가하였다. CsA로 처리 후 30분 배양시 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율도 HCT15/CL02세포(50 μM)에서는 각각 약 10배와 2.5배 증가하였고, A549세포에서는 MIBI가 7.6배, tetrofosmin이 6.3배 증가하였으므로 CsA 처리 시 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin의 섭취율 증가에 비하여 1.2배에서 4배 정도 현저하여 높았으므로 다약제내성 극복제의 효능평가 목적으로는 MIBI가 tetrofosmin보다 유리할 것으로 판단할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 두 약제의 농도가 실제 임상에서 환자의 항암치료 시 사용할 수 있는 농도보다는 높은 농도이므로 이를 직접 임상에 이용할 수는 없을 것이나, 유 등²⁴⁾은 또 다른 다약제내성 극복제인 verapamil의 경우에는 임상적으로 유용성이 있다고 알려진 verapamil의 농도 10 μM 이하에서도 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin보다는 뚜렷하였다고 보고한 바 있다. 그러나 Utsunomia 등²⁵⁾은 본 연구의 결과와는 상이한 결과를 보고한 바 있었는데, 이들은 MRP를 발현하는 비인후암세포인 CNE-1세포주에서는 MIBI의 섭취율이 tetrofosmin의 섭취율보다 2배 정도 높았

고, Pgp나 MRP를 억제하는 GG918, PSC833, verapamil, cyclosporin A, buthionine sulfoximine 등에 의한 방사성의약품의 배출억제 효과는 tetrofosmin이 2배가량 높았다고 보고하였다. 이들의 연구결과와 저자들의 결과는 상이한 것으로서, 이러한 차이를 설명하는 이유로는 MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취율의 차이가 세포주에 따라 다를 수 있을 추측할 수 있고, 특히 세포내의 glutathione S-transferases (GSTs) detoxification system과 연관이 있을 것이라고 제시된 바가 있다.²⁶⁾ Cordobes 등²⁷⁾은 다약제내성 극복제의 MIBI섭취에 미치는 영향은 세포에 따라 2-12 배나 차이가 날 수 있고, 사용한 약제내성 극복제의 농도에 따라 서로 다른 영향을 나타낸다고 보고 한 바 있다.

CsA는 강력한 다약제 내성 억제제로 알려져 있으며, 천 등²⁸⁾은 다약제내성을 유발시킨 L1210 생쥐백혈병 세포주에서 verapamil, CsA과 dipyridamole은 MIBI의 섭취율을 증가시켰다고 보고한 바 있다. Piwnica-Worms 등²⁹⁾은 MIBI의 세포내 저류를 증가시키는 효능을 나타내는 다약제내성 극복 약제의 평균유효농도(EC50 in μM)의 차이가 약 3배정도로 CsA가 보다 강력하다고 보고한 바 있다.

동일한 세포에서의 MIBI와 tetrofosmin의 섭취가 차이나는 것은 암세포의 대사정도와 세포와 미토콘드리아 막의 전기생리화학적 특성의 차이 및 세포 내에서 두 종류의 방사성의약품의 분포에 따른 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 즉 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도는 두 방사성의약품의 화학적 구조와 물리적 특성의 차이뿐만 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.^{30,31)} 본 연구에서 세포내 섭취는 HCT15/CL02세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취가 유사하였으나, 유 등²⁴⁾은 다른 Pgp 발현 암세포인 백혈병 K562(Vcr)세포에서는 MIBI의 섭취가 더 높았다고 보고한 바 있다. A549세포에서 BSO처리에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 60분 기저치와 비교해 보면 MIBI는 219%, tetrofosmin은 140%로 MIBI의 섭취율 증가가 tetrofosmin보다 높았다. MIBI와 tetrofosmin의 암세포내 섭취율의 증가는 세포주에 따라 차이가 있을 것으로 추측되며, A549세포에서 MRP발현을 평가하는 데는 MIBI가 tetrofosmin보다 더 효과적이라고 판단할 수 있었다. 그러나 MRP를 발현하는 신경교세포에서는 BSO에 의한 tetrofosmin의 섭취증가는 MIBI보다 높았다는 보고²⁵⁾가 있었으므로, 세포조류의 차이에 따른 차이인지에 대한 구명이 있어야 할 것이다.

온도와 종양조직의 산소분압들도 방사성의약품의 세포내 섭취에 영향을 미친다고 알려져 있어, 암세포를 4°C와 22°C에서 MIBI와 배양하였을 때의 섭취율은 37°C에서 보다 낮았으며,^{27,28)} 연조직 암세포에서 온도의 차이에 따른 섭취율을 조사한 연구에서도 MIBI, tetrofosmin 및 furifosmin의 섭취는 37°C에서 가장 높았다고 보고¹⁶⁾된 바 있다. 또한 종양조직의 산소분압의 차이는 방사성의약품의 섭취에 영향을 미친다.³²⁾ 이러한 외부인자에 의한 섭취율의 차이는 MRP나 Pgp의 존재와는 독립적으로 나타나므로 연구결과나 영상의 분석시 주의를 기울여야 할 것이다.

체의실험에서 뚜렷하게 관찰되는 MIBI와 tetrofosmin의 섭취의 차이가 동물에 이종이식한 종양의 섭취율 측정에서는 관찰되지 않고, CsA 처리에 의한 방사성의약품의 섭취 증가정도도 현저하지 않은 것은 여러 기전으로 설명될 수 있을 것이다. 몇 종의 방사성추적자의 종양 내 섭취를 평가한 BN-472 유방암이식 흰쥐연구는 실험과내 측정으로는 MIBI, tetrofosmin, Q12순서로 섭취율이 낮았으나, 동물실험에서는 MIBI, Q12, tetrofosmin순서로 섭취율이 낮는데 이는 방사성의약품의 혈액에서의 제거 정도와 종양에 대한 정상조직의 섭취비율의 차이 때문이라고 보고하였다.³³⁾ 유방암 진단에 사용하는 MIBI의 섭취율은 종양의 크기나 종양의 조직학적 형태에 따라 차이가 난다는 보고도 있었다.³⁴⁻³⁶⁾ 이러한 결과는 CsA의 작용시간이나 생체 내에서의 대사 등과 연관이 있을 것으로 추측하였다.

본 연구의 결과로 보아 MIBI와 tetrofosmin 모두가 Pgp를 발현하는 HCT15/CL02 암세포와 MRP를 발현하는 A549세포에서 다약제내성 발현을 평가하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료되고, 다약제내성 극복제의 효능을 평가하는 경우에는 MIBI가 tetrofosmin보다 유리할 것으로 생각한다. 그러나 각각 한 종류의 세포주에서 실험한 결과이며, 체외실험에서 관찰된 이러한 차이는 체내분포의 차이로는 뚜렷하지가 않았으므로, 여러 종류의 다약제내성 암세포에서도 조사가 되어야 할 것이다 또한 실제 체내실험에서 MIBI와 tetrofosmin의 장기내 분포의 차이를 직접 비교할 수 있는 영상 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

목적: 인체대상암 HCT15/CL02 암세포와 인체 비소세포 폐암 A549세포를 대상으로 Pgp와 MRP발현을 조사하고, 세포와 이종이식된 종양조직에서 ^{99m}Tc-MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 비교하여 이들 방사성의약품의 Pgp와 MRP 추적자로서의 성능을 알아보려고 하였다. 또한 다약제내성

극복제인 CsA 처리에 의한 두 방사성 의약품의 암세포 내 섭취정도를 비교해 보았다. **재료 및 방법:** Pgp의 발현은 RT-PCR과 면역조직화학 염색으로, MRP발현은 MRPr1 항체에 대한 western blot analysis와 면역조직화학 염색으로 확인하였다. 세포 섭취는 37°C에서 1×10^6 개/ml 농도에서 MIBI와 tetrofosmin을 30분과 60분 동안 반응시킨 후 상층액과 침전물로 분리하여 각각의 방사능을 감마계수기로 측정하여, 50 μ M의 cyclosporin A (CsA)를 처리한 성적과 비교하였다. 체내실험은 HCT15/CLO2세포와 A549세포를 이중이식 한 누드마우스를 4군으로 구분하여, MIBI와 tetrofosmin 만을 주사한 군과, CsA를 70 mg/kg으로 1시간 전에 주사한 후 체내분포를 측정한 군으로 구분하였다. MIBI와 tetrofosmin은 각각 370 KBq을 정맥주사하고 10분, 60분, 240분 후에 동물들을 희생시켜 중앙조직내의 두 방사성 의약품의 장기섭취율(%ID/gm)로 계산하여 비교하였다. **결과:** HCT15/CL02세포와 A549세포에서 MIBI와 tetrofosmin의 섭취는 배양시간이 지남에 따라 증가하였으며 그 섭취정도는 MIBI가 tetrofosmin보다 높았다. CsA 50 μ M에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취정도를 각각의 60분 대조군과 비교하면 각각 763%와 629% 증가하여 MIBI의 섭취증가 정도가 tetrofosmin보다 높았다. 체내에서 두 방사성 의약품의 섭취정도는 유사하였다. CsA 처리군의 섭취정도는 각각의 대조군에 비교하여 MIBI는 10분에 114%, 60분에 257%, 240분에 396%로 증가하였으며, tetrofosmin은 10분에 110%, 60분에 205%, 240분에 410%로 증가하였다. HCT15/ CL02 세포실험에서도 두 방사성 의약품의 섭취정도에 유의한 차이가 없었으나, CsA를 처리하였을 때 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 기저치보다 모두 증가하였다. CsA에 의한 MIBI와 tetrofosmin의 섭취율은 기저치보다 각각 10배와 2.4배 증가하여, MIBI의 섭취율이 tetrofosmin보다 1.2배에서 4배정도 높았다. HCT15/CL02 중앙조직내의 섭취는 CsA 처리시 증가하였으나 MIBI와 tetrofosmin 간에 유의한 차이는 없었다. **결론:** Pgp와 MRP를 발현하여 다약제내성을 나타내는 암세포에서 MIBI와 tetrofosmin 섭취율은 유사하였으나, Pgp와 MRP를 억제하는 CsA에 의한 섭취증가정도는 MIBI가 더 높았다. 그러나 두 약제 섭취율 증가의 차이는 동물실험에서는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 보아 MIBI와 tetrofosmin은 Pgp와 MRP에 의한 다약제내성의 발현을 평가할 수 있는 방사성 의약품으로 판단되며, 다약제내성 극복제의 시험관내 효능평가에는 MIBI가 tetrofosmin보다 더 우수할 것으로 사료되었다.

References

- Bradley G, Juranka PF, Ling V. Mechanism of multidrug-resistance. *Biochim Biophys Acta* 1988;948:87-128.
- Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug-resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem* 1993;62:385-427.
- 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.
- 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.
- 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.
- Dole LA, Ross DD. Multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein BCRP(ABCG2). *Oncogene* 2003;20:7340-58.
- Webb M, Brun M, McNiven M, Le-Couteur D, Craft P. MDR1 and MRP expression in chronic B-cell lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 1998;102:710-7.
- 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.
- 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;50:2198-201.
- 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.
- Piwnica-Worms D, Holman BL. Noncardiac applications of hexakis (alkylisonitrile) technetium-99m complexes. *J Nucl Med* 1990;31:1166-7.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sharma V. Radiopharmaceuticals for assessment of multidrug resistance p-glycoprotein-mediated drug transport activity. *Bioconjug Chem* 2004;15:1464-74.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
20. Lee J, Ahn BC. Detection of multidrug resistance using molecular nuclear technique. *Korean J Nucl Med* 2004;38:180-9.
 21. Hendrikse NH, Franssen EJ, van-der-Graaf WT, Vaalsburg W, de-Vries EG. Visualization of multidrug resistance in vivo. *Eur J Nucl Med* 1999;26:283-93.
 22. 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.
 23. Yoo JA, Jeong SY, Seo MR, Bae JH, Ahn BC, Lee KB, et al. Comparison of the uptake of Tc-99m MIBI and Tc-99m tetrofosmin in A549, and MRP-expressing cancer cells, in vitro and in vivo. *Korean J Nucl Med* 2003;37:382-92.
 24. Yoo JA, Chung SY, Seo MR, Kwak DS, Ahn BC, Lee KB et al. Comparison of the uptake in ^{99m}Tc-sestamibi and ^{99m}Tc-tetrofosmin in cancer cell lines expressing multidrug resistance. *Korean J Nucl Med* 2003;37:178-89.
 25. 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.
 26. 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 Tc-99m-tetrofosmin and Tc-99m-sestamibi uptake in glioma cell lines. *Nucl Med Biol* 2000;27:299-307.
 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. 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.
 29. Piwnica-Worms D, Rao VV, Krounag JF, Croop JM. Characterization of multidrug resistance transport function with an organotechnetium cation. *Biochemistry* 1995;34:12210-20.
 30. 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.
 31. 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.
 32. Kinuya S, Yokoyama K, Li XF, Bai J, Watanabe N, Shuke N, et al. Hypoxia-induced alteration of tracer accumulation in cultured cancer cells and xenografts in mice: implication for pre-therapeutic prediction of treatment outcomes with ^{99m}Tc-sestamibi. ²⁰¹Tl chloride and ^{99m}Tc-HL91. *Eur J Nucl Med* 2002;29:1006-11.
 33. Bernard BF, Krenning EP, Breeman WA, Ensing G, Benjamins H, Bakker WH, et al. ^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-Tetrofosmin and ^{99m}Tc-Q12 in vitro and in vivo. *Nucl Med Biol* 1998;25:233-40.
 34. 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.
 35. Papanthiou V, Christodoulidou J, Papadaki E, Valotassiou V, Souvatzoglou M, Louvrou A, et al. Uptake and washout of ^{99m}Tc(V)-dimercaptosuccinic acid and ^{99m}Tc-sestamibi in the assessment of histological type and grade in breast cancer. *Nucl Med Commun* 2002;23:461-7.
 36. Kao CH, Tsai SC, Wang JJ, Ho YJ, Ho ST, Changlai SP. Technetium-99m-sestamethoxyisobutylisonitrile scan as a predictor of chemotherapy response in malignant lymphoma compared with P-glycoprotein expression, multidrug resistance-related protein expression and other factors. *Br J Hematol* 2001;113:369-74.