

## 항암제 내성 유방암 MCF7/adR 세포주에 대한 보정방암탕과 홍삼산성다당체의 세포고사 유도효과

안귀인\* · 박철환\* · 이은옥\* · 이효정\* · 이재호\* · 김관현\* · 이연희\* · 장유성\* · 김상태\*\* · 김성훈\*\*\*\*#

\*경희대학교 동서의학대학원, \*\*이화여자대학교 나노과학부 나노바이오연구소, \*\*\*경희대학교 한의과대학

(Received July 26, 2006; Revised August 23, 2006)

### Apoptotic Effect of Ethanol Extracts of Bojungbangamtang and Acidic Polysaccharide of Korea Red Ginseng in a MCF7/adR Multidrug-resistance Breast Cancer Cells

Gyu-In Ahn\*, Cheol-Hwan Park\*, Eun-Ok Lee\*, Hyo-Jung Lee\*, Jae-Ho Lee\*, Kwan-Hyun Kim\*, Yun-Hee Rhee\*, Yu-Sung Jang\*, Sang-Tae Kim\*\* and Sung-Hoon Kim\*\*\*\*#

\*Graduate School of East-West Medical Science, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea

\*\*Nano-Bio of Research Institute, Division of Nanoscience, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

\*\*\*College of Oriental Medicine, Kyunghee University, Seoul 131-701, Korea

**Abstract** — This study was undertaken to determine whether the 9 herbal complex induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells and adriamycin-resistant MCF7/adR cells. Ethanol extracts of Bojungbangamtang (BBTE) and acidic polysaccharide of Red Ginseng (GIN) induced cell death in both MCF-7 and MCF7/adR cells. Ethanol extracts of Bojungbangamtang and acidic polysaccharide of Red Ginseng also induced G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and increased TUNEL positive cells in MCF7/adR cells. In addition, flow cytometric analysis revealed the decreased expression of P-glycoprotein (P-gp) in ethanol extracts of Bojungbangamtang and acidic polysaccharide of Red Ginseng treated MCF7/adR cells. Similarly, decreased protein levels of P-glycoprotein and multidrug resistance associated proteins-1 were also determined by immunocytochemistry in ethanol extracts of Bojungbangamtang treated MCF7/adR cells. Taken together, these data indicate that ethanol extracts of Bojungbangamtang and acidic polysaccharide of Red Ginseng inhibit the function of ABC transporters such as multidrug resistance associated proteins (MRPs) and P-glycoprotein as well as induce apoptosis in MCF7/adR cells. Thus, these data suggest that ethanol extracts of Bojungbangamtang and polysaccharide of Red Ginseng can be candidates for the treatment of multidrug-resistant MCF7/adR cells.

**Keywords** □ BBTE, GIN, multidrug-resistance, P-gp, MRP-1, MCF7/adR, apoptosis

암세포에 대한 다약제 내성(MDR)은 화학요법 치료의 실패원인으로 항암치료의 주된 걸림돌이다.<sup>1)</sup> 암환자의 50% 정도가 화학요법에 내성을 나타내며 암으로 인한 사망원인 중에 90% 이상이 다약제 내성에 의한 것이다.<sup>2)</sup> 다약제 내성이란 암세포가 서로 다른 항암제에 대해 구조적, 기능적으로 내성을 갖는 현상으로 약물배출을 담당하는 P-당단백질<sup>3)</sup>과 multidrug resistance associated proteins(MRPs)<sup>4)</sup>에 기인한다고 보고되었다. P-당단백질은 1280개의 아미노산으로 이뤄진 170 kDa의 세포막 단백질

로 *mdr1*에 의해 발현되며, 약제배출에 의해 저항성을 매개하는데 아직 그 기전이 자세하게 알려져 있지 않다.<sup>5)</sup> MRP는 1531개의 아미노산으로 이뤄진 190 kDa의 세포막 단백질로 비 P-당단백질 매개 다약제 내성의 주된 기전으로 알려져 있으나, 실제로 이의 정확한 기전은 알려져 있지 않다.<sup>6)</sup> P-당단백질과 MRP는 모두 ATP-binding site를 갖고 있으며, 구조적으로 15% 정도 유사하지만 최근의 보고에 의하면 다약제 내성의 기전이 서로 다른 것으로 보고되고 있다.<sup>7,8)</sup> 다약제 내성관련 단백질은 정상세포 및 여러 가지 암세포에서 다양하게 발현되고 있어, P-당단백질과 MRP-1은 transporter의 저해제 개발의 마커로 종양세포의 지표적이다.<sup>9-12)</sup> Vincristine과 etoposide는 MRP-1과 P-당단백질의 기질인데 반해 paclitaxel은 P-당단백질에만 해당된다.<sup>13)</sup> 한편

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 031-201-2199 (팩스) 031-204-2730  
(E-mail) sungkim7@khu.ac.kr

ATP의존성 transporter는 vinca alkaloid, etoposide, taxenes 그리고 anthracycline 같은 구조적으로 무관한 화합물에서도 관계하고 있다.<sup>14,15)</sup> Verapamil, dihydropyridine 유도체, quinidine 그리고 cyclosporin A는 transporter 활성도를 억제하는데 기인하여 P-당단백질을 매개로 한 항암제내성을 감소시킨다. 몇몇의 약제가 P-당단백질과 MRP-1에 대한 저해효과를 나타내지만 새로운 심각한 독성을 야기한다.<sup>16-24)</sup> 따라서 화학요법시 항암제 내성을 갖는 암세포에서 다약제 내성을 유도하는 P-당단백질과 MRP의 발현을 저해하고 동시에 암세포의 사멸을 유도하면서 독성을 나타내지 않는 새로운 항암제의 개발이 절실히 요구된다.

이에 본 실험에서 보정방암탕 에탄올추출물(BBTE)과 홍삼산성다당체(GIN)는 유방암 세포주인 MCF-7과 P-당단백질이 강하게 발현되는 MCF7/adR 세포주로부터 P-당단백질과 MRP-1에 대한 저해효과와 세포고사유도효과를 탐색하여 유의한 결과를 도출하였기에 보고하는 바이다.

**실험 방법**

**재료**

보정방암탕은 Table I과 같이 아카리쿠스, 백출, 인삼, 지령, 진피, 황기, 산약, 당귀, 감초 9가지의 한약재로 구성된 처방으로 약재는 모두 경희의료원에서 구입하였다. 이 처방을 물 2l로 2회 끓여 추출 후 분말화한 것은 BBTW라 명하고, 에탄올 3l에 3일간 3회 추출 후 분말화한 것은 BBTE라 명하였다. 또한 처방의 구성분인 지령에서 분리한 다당체를 POLY, 홍삼에서 분리한 홍삼산성다당체를 GIN이라 명하였다. BBTE는 DMSO에 녹인 후 배지에 희석하여 사용하였고, 나머지는 PBS에 녹여 사용하였다.

**세포배양**

사람 유방암주인 MCF-7과 이에 다약제 내성유전자가 발현되어진 MCF7/adR 세포주(S. H. Kim, Henry Ford Hospital, Detroit, MI)를 5% FBS(fetal bovine serum: HyClone, Logan, UT)와 penicilin/streptomycin이 함유된 RPMI 1640(Gibco Invitrogen Corp.) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다.

**세포 형태학적 관찰**

MCF-7과 MCF7/adR을 5×10<sup>4</sup> 세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 상기 세포주의 세포사를 조절하는지 조사하기 위해 5% FBS가 함유된 RPMI 1640에 BBTE, BBTW, POLY, GIN 약물군을 50 µg/ml 농도로 처리하여 37°C에서 24시간 배양하여 반응을 관찰하였고 대조군인 vincristine를 50 ng/ml이 되게 하여 첨가하였다. 세포사 관찰은 현미경의 ×100 배율에서 200개 정도 세포수를 촬영하여 세포사가 억제되는 정도를 조사하였다.

**유세포 분석(Flow cytometry analysis)**

상기 세포를 6 well에 5×10<sup>4</sup> 세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 vincristine(50 ng/ml), BBTE(50 µg/ml), POLY(50 µg/ml)와 GIN(50 µg/ml)을 24시간 처리하고, 세포주기를 분석하기 위해 세포를 Trypsin으로 처리하여 모은 다음 4°C의 100% EtOH로 30분간 고정하고 5 µg/ml propidium iodide과 RNase를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 FACS 분석하였으며 GIN은 0, 10, 25, 50 µg/ml 농도별로 각각 72시간 동안 처리한 후 상기 방법에 의거하여 세포주기를 분석하였다. 또한 다약제 내성의 발현을 알아보기 위해 vincristine(50 ng/ml), BBTE(50 µg/ml)와 GIN(50 µg/ml)을 24시간 처리한 세포에 P-당단백질 일차항체를 각각 표지하여 1시간 반응을 시키고 2차 항체인 anti-goat FITC로 표지하여 1시간 반응을 시킨 다음 이를 laser FACS 440 flow-cytometer(Becton Dickinson, Mountainview, CA)로 분석하기 전까지 4°C의 암소에 보관하고 측정시 WINLIST software package (Verity Software House Inc., Topsham, ME)로 분석하였다.

**형광현미경 및 공초점 형광현미경 측정**

MCF7/adR 세포주 10<sup>3</sup>을 poly-L-lysine-coated sliib cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 BBTE와 GIN을 50 µg/ml 농도로 처리하여 24시간 배양 후 메탄올로 세포를 고정하였다. 1차항체로 P-당단백질과 MRP-1 antibody를 1시간 동안 표지하고 2차항체로 anti-rabbit FITC 또는 anti-rabbit Alexa Flour594를 표지하였다. 또한 세포사를 확인하기 위해 terminal deoxy-nucleotidtransferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling

**Table I** – The botanical origins and ratio of crude drugs of Bojung-bangamtang

Crude drug	Botanical origin	Place	weight (g)	Specimen no.
Agaricus mushroom	<i>Agaricus blazei</i> Murill	Korea	40	GSM011
Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	<i>Atractylodes macrocephala</i> Koidz	China	12	GSM012
Ginseng Radix	<i>Panax ginseng</i> C.A. Meyer	Korea	20	GSM013
Polyporus	<i>Polypours umbellatus</i> (PERS) Fries	China	12	GSM014
Citri Pericarpium	<i>Citrus unshiu</i> Markovich	Korea	8	GSM015
Astragali Radix	<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	Korea	8	GSM016
Dioscoreae Rhizoma	<i>Dioscorea japonica</i> Thunb	Korea	8	GSM017
Angelicae giantis Radix	<i>Angelica gigas</i> Nakai	Korea	8	GSM018
Glycyrrhizae Radix	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch	China	4	GSM019

(TUNEL assay)(Tunel apoptosis detection kit from upstae Biotechnology Inc. USA)을 통해 확인하였는데 일반적으로 세포사가 일어나면 핵내효소(nuclease)에 의해 일정 크기의 절편을 절단하면서 DNA의 염기서열중에 가장 화학적으로 약한 부분인 AT 염기가 절단되면서 말단부위인 T가 cohesive-end 상태로 되는데 이를 인지하는 probe 부분에 FITC가 conjugated된 2차 항체를 통해 세포사의 현상을 파악할 수 있는 세포핵내의 DNA 분절을 분석하는 방법으로 형광현미경하에서 관찰하여 약물의 효과를 검증하였다. 반응을 종결한 후 세포를 PBS로 2회 세척 후 p-formaldehyde로 10분간 고정한 다음 mount solution으로 embedding 후 Carl Zeiss의 LSM510모델인 Laser scanning Microscope 형광현미경으로 구별하여 100개의 세포에서 공초점 현미경(Olympus)의 excitation 405, 488 nm, emission 568 nm하에서 관찰하여 대조군과 상호 비교하여 P-단백질과 MRP-1 단백질 발현, Tunal assay 반응 유무를 관찰하였다.

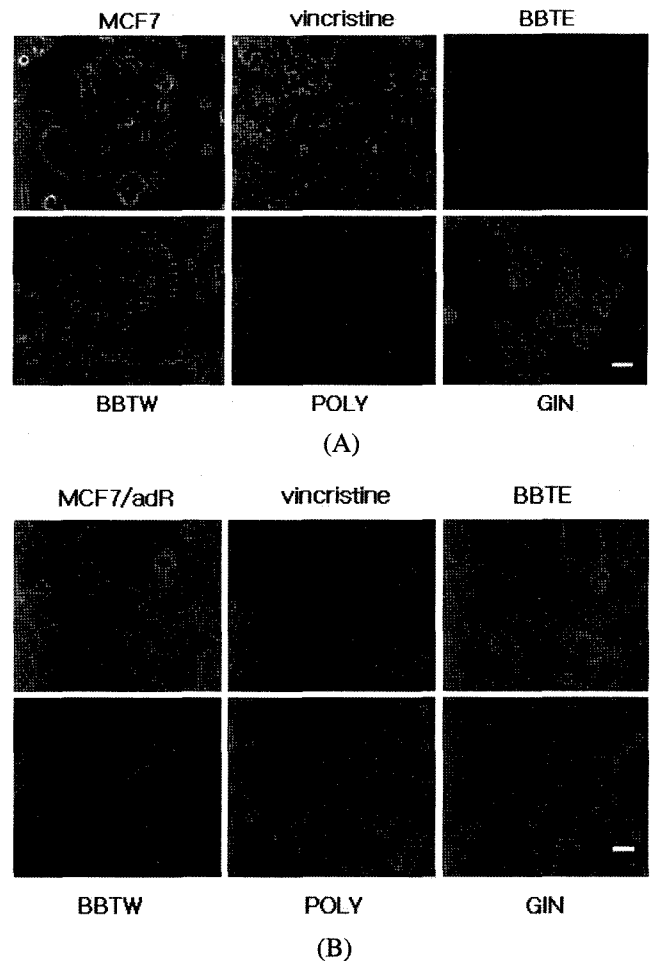
## 결과 및 고찰

### 세포형태학적으로 세포사의 영향

본 실험에 사용한 보정방암탕에 대한 항암제 효능을 검증하기 위해 여성 유방암 세포주인 MCF-7과 이에 P-당단백질과 MRP-1이 발현되어 다약제 내성단백질이 유도되는 MCF7/adR를  $5 \times 10^4$  세포수로 6-well에 분주하고 하룻밤 배양한 다음  $50 \mu\text{g/ml}$  농도로 보정방암탕 및 구성성분을 처리한 결과 Fig. 1(A)에서처럼 MCF-7 세포주에서는 상기 대조군과 vincristine 처리군에서 약간의 세포사 형태를 보인 반면 BBTE 처리군에서는 강하게 세포사를 유도하였다. 또한 Fig. 1(B)에서처럼 MCF7/adR 세포주에서도 대조군과 vincristine 경우는 유사하게 세포사가 일어나지 않는 반면 BBTE 처리군에서는 강하게 형태학적으로 세포사를 유도하는 양상을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과는 POLY와 GIN 그리고 이외의 약물들이 단독보다 복합병용하므로 그 이상의 효과를 나타내는 시너지 효과가 있어 BBTE에서 잘 유도되어진 것을 알 수 있었다. 또한 항암제 내성세포주에 대한 세포사 효과를 나타내는 것을 보아 아마도 ATP 막 전달체인 P-당단백질에 대하여 상당히 내성회피 내지 극복할 수 있는 가능성을 제시해주고 있다고 사료된다.

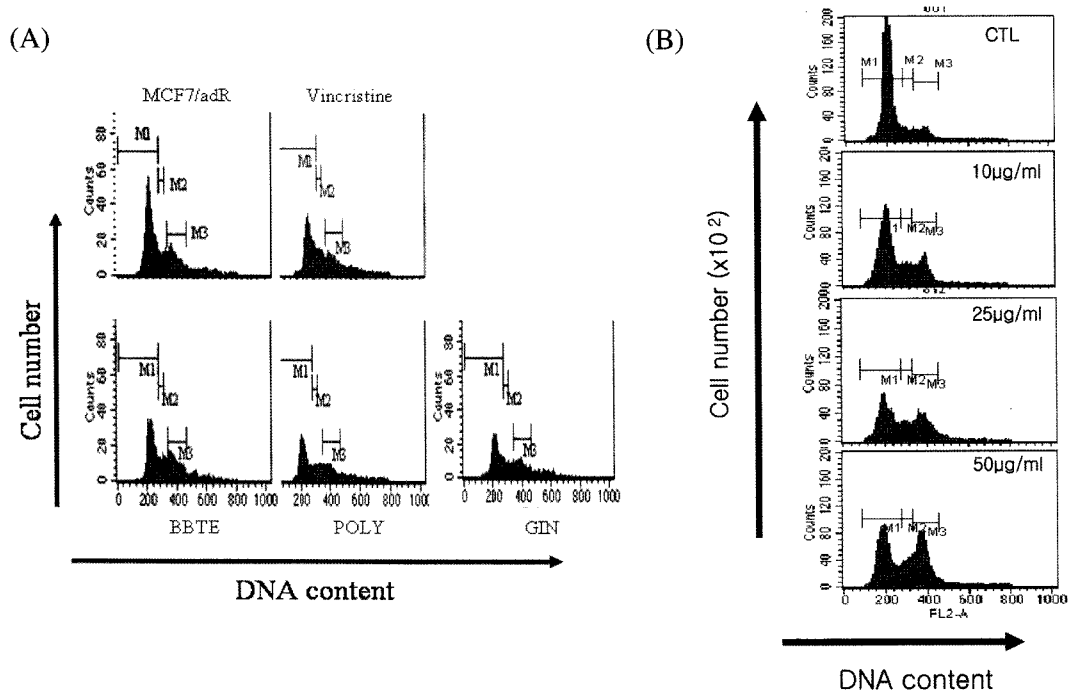
### 세포주기 관찰 및 caspase-3 단백질 발현정도

상기의 결과에서처럼 세포의 형태학적 변화와 비례하여 세포사가 유도시 세포주기 변화가 예측되는데 Fig. 2(A)에서처럼 MCF7/adR 세포주에 24시간 물질을 처리한 결과 대조군에서  $G_0/G_1$ 단계는 60%, S단계는 8%,  $G_2/M$ 단계는 21% 정도를 나타내었고 vincristine 처리군은  $G_0/G_1$ 단계는 55%, S단계는 10%,  $G_2/M$ 단계는 20% 정도를 나타낸 반면 BBTE는  $G_0/G_1$ 단계는 46%, S단계는 9%,  $G_2/M$ 단계는 28% 정도이고, POLY 처리군경우  $G_0/G_1$ 단계는 52%, S단계는 8%,  $G_2/M$ 단계는 23% 정도를 나타내었고 GIN 처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 50%, S단계는 8%,  $G_2/M$ 단계는 25%로  $G_2/M$ 단계를 저지하는 경향을 보였다. 특히 GIN을 농도별로 72시간 처리한 결과  $10 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 62.5%, S단계는 13.2%,  $G_2/M$ 단계는 23.1%이고  $25 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 54.8%, S단계는 12.4%,  $G_2/M$ 단계는 29.4%이었고  $50 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 52.3%, S단계는 13.4%,  $G_2/M$ 단계는 31.6%으로  $G_2/M$ 단계를 정지시키는 양상을 보였다(Fig. 2B). 그렇다면 세포주기가  $G_2/M$ 단계에서 정지된 이유가 BBTE와 GIN를 대상으로 세포고사 유도와 관계있는지 조사한 결과 Fig. 3에서처럼 MCF7/adR 세포주에서 약물을 처리하지 않은 대조군과 달리 BBTE와 GIN 처리군 모두에서 세포고사가 유도된 TUNEL positive cells이 강하게 발현되는 것을 관찰하였고, POLY 처리군에서는 세포고사가 유도된 TUNEL positive cells의 발현이 약하게 유도되었다.

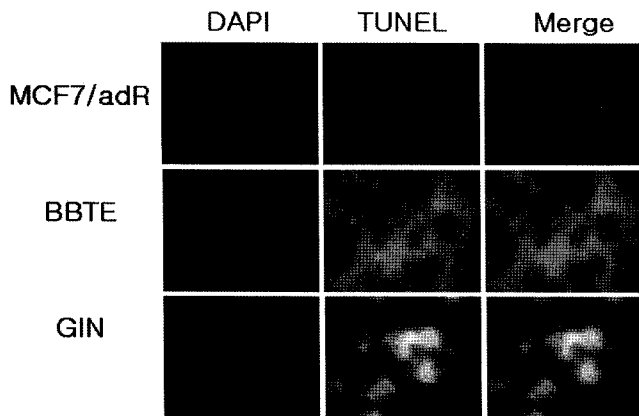


**Fig. 1** - Morphological change of MCF-7 and MCF7/adR cells. MCF-7 (A) and MCF7/adR cells (B) were treated with vincristine ( $50 \text{ ng/ml}$ ),  $50 \mu\text{g/ml}$  of BBTE, BBTW, POLY and GIN for 24 h. The morphology was observed by phase contrast microscopy. Bar,  $25 \mu\text{m}$ .

$G_1$ 단계는 52%, S단계는 8%,  $G_2/M$ 단계는 23% 정도를 나타내었고 GIN 처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 50%, S단계는 8%,  $G_2/M$ 단계는 25%로  $G_2/M$ 단계를 저지하는 경향을 보였다. 특히 GIN을 농도별로 72시간 처리한 결과  $10 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 62.5%, S단계는 13.2%,  $G_2/M$ 단계는 23.1%이고  $25 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 54.8%, S단계는 12.4%,  $G_2/M$ 단계는 29.4%이었고  $50 \mu\text{g/ml}$  처리군에서는  $G_0/G_1$ 단계는 52.3%, S단계는 13.4%,  $G_2/M$ 단계는 31.6%으로  $G_2/M$ 단계를 정지시키는 양상을 보였다(Fig. 2B). 그렇다면 세포주기가  $G_2/M$ 단계에서 정지된 이유가 BBTE와 GIN를 대상으로 세포고사 유도와 관계있는지 조사한 결과 Fig. 3에서처럼 MCF7/adR 세포주에서 약물을 처리하지 않은 대조군과 달리 BBTE와 GIN 처리군 모두에서 세포고사가 유도된 TUNEL positive cells이 강하게 발현되는 것을 관찰하였고, POLY 처리군에서는 세포고사가 유도된 TUNEL positive cells의 발현이 약하게 유도되었다.



**Fig. 2** – BBTE and GIN induced growth arrest in MCF7/adR cells. Cells were treated with vincristine (50 ng/ml), 50 µg/ml of BBTE, POLY and GIN for 24 h (A) and various concentration of GIN for 72 h (B). Subsequent distribution in different phases of the cell cycle was determined by FACS analysis as described in Materials and Methods.



**Fig. 3** – BBTE and GIN induced apoptosis in MCF7/adR cells. Cells were treated with 50 µg/ml of BBTE and GIN. After 24 h treatment, cells were labeled with biotin-dUTP, and stained with secondary antibody avidin-FITC and DAPI, and then analyzed by fluorescence microscopy. Bar indicates 25 µm

**다약제 내성단백질 P-당단백질발현에 미치는 영향**

한편 상기 결과처럼 세포사가 유도되었다면 MCF7/adR 세포주에서 세포사가 일어나는 양상이 일반적으로 MDR 단백질인 P-당단백질에 대하여 극복되는지 확인하기 위해 BBTE와 GIN을 대상으로 어느 정도 항암제를 배출하는 막전달체인 P-당단백질의 기능을 억제하는지 대조군인 vincristine을 대상으로 P-당단백질의 발현양상을 조사하여 유세포 분석결과를 나

타내었고(Fig. 4A), 그 수치를 그래프화하였다(Fig. 4B). MCF-7 세포주에서는 P-당단백질이 전혀 발현되지 않는 반면, MCF7/adR 세포주에서는 P-당단백질이 99% 정도, vincristine 처리군에서는 100% 모든 세포에서 발현되는 것을 확인하였다. 이렇게 발현되는 P-당단백질은 BBTE 처리에 의해 저해되어 약 19% 정도만 발현되었고, GIN 경우는 약 9% 정도 발현되었는데, BBTE보다는 GIN이 더 강하게 P-당단백질을 억제하였다. 한편 P-당단백질 활성을 회피하는 정도를 관찰하기 위해 P-당단백질의 발현양상을 면역세포분석법을 통해 공초점 형광현미경으로 관찰한 결과 Fig. 5에서처럼 MCF7/adR 세포주에서는 Alexa Fluor594로 염색한 MRP-1(적색 형광)과 anti-rabbit FITC로 표지한 P-당단백질(녹색)의 발현양상이 강하게 발현되었으나 BBTE 처리군에서는 강하게 P-당단백질이나 MRP-1 발현을 억제하였고 GIN은 P-당단백질을 억제하고 MRP-1 경우 약하게 억제되었다. 이는 BBTE에는 GIN 이외에 MRP-1을 강하게 억제하는 또 다른 성분이 있음을 암시하고 있다. 따라서 본 보정방암탕은 항암제 내성단백질인 MRP-1과 P-당단백질에 대해 강하게 억제효과를 가지는 것을 보아 향후 좀 더 과학적으로 항암제 회피경로를 파악할 필요가 있다고 사료된다. 더불어 항암제 내성 단백질의 발현부위를 관찰할 필요가 있는데 이는 암세포가 내성을 나타내는 이유로 막 뿐만 아니라 세포질내 lysosome과 핵막 주변부에도 존재할 가능성이 있기 때문이다.

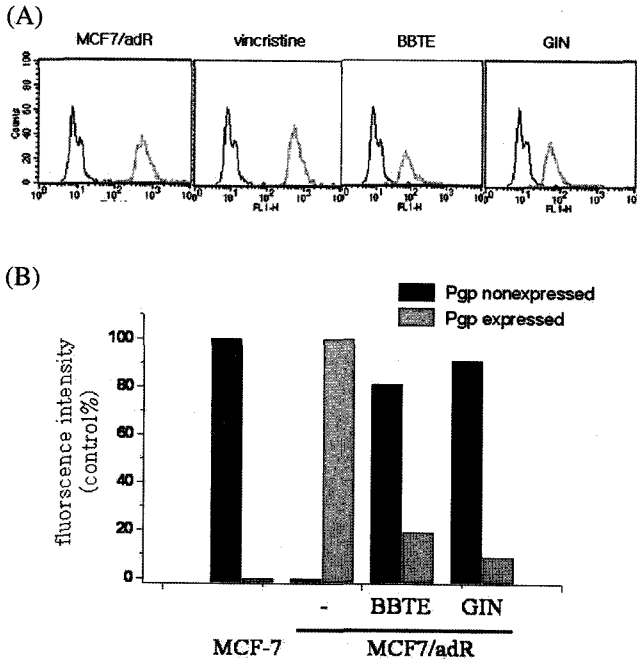


Fig. 4 - BBTE and GIN decreased P-gp expression in MCF7/adR cells. Cells were treated with vincristine (50 ng/ml), 50 µg/ml of BBTE and GIN. After 24 h treatment, cells were stained with P-gp antibody and expression level of P-gp was determined by FACS (A). (B) Percentage of P-gp expressed and P-gp nonexpressed portion were indicated.

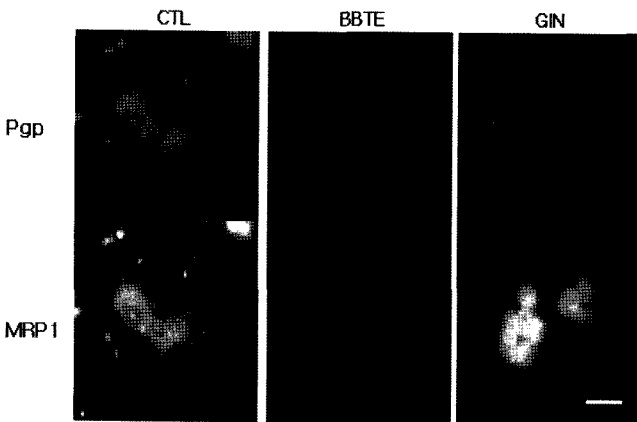


Fig. 5 - BBTE and GIN inhibited P-gp and MRP-1 expression in MCF7/adR cells. Cells were treated with 50 µg/ml of BBTE and GIN. After 24 h treatment, cells were labeled with anti-P-gp (FITC) antibodies or MRP-1 (Alexa Fluor594) and analyzed by confocal microscope. Bar indicates 25 µm.

결론

본 연구에서는 보정방암탕과 그의 구성약재로부터 항암제 내성을 가진 유방암 세포주에서 세포사와 항암제 내성을 회피 내지 극복할 수 있는 가능성을 관찰하였다. BBTE와 GIN은 유방

암 항암제내성 세포주인 MCF7/adR 세포의 세포사를 유도하였고, 이는 TUNEL 실험결과 세포고사인 것으로 확인되었으며, 세포주기의 G<sub>2</sub>/M단계를 정지시켰으며 P-당단백질과 MRP-1의 발현을 저해하였다. 따라서 BBTE와 GIN은 항암제내성을 갖는 세포주에서 세포고사를 유도함으로써 항암 효과를 나타내고 있다. 이는 화학요법의 항암효과를 유지시킬 수 있는 기회로 보다 많은 연구를 통해 향후 임상 암치료에 활용 가능성을 평가할 필요가 높다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년도 농촌진흥청의 Biogreen 21사업과 보건복지부의 한방치료기술연구개발사업(B050007)의 지원으로 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

- Hipfner, D. R., Deeley, R. G. and Cole, S. P. C. : Structural, mechanistic, and clinical aspects of MRP1. *Biochim. Biophys. Acta.* **1461**, 359 (1999).
- Perez, R. P., Hamilton, T. C., Ozoles, R. F. and Young, R. C. : Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* **71**(4), 1571 (1993).
- Cole, S. P. C., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Steward, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M. V. and Deeley R. G. : Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650 (1992).
- Juliano, R. L. and Ling, V. A. : Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta.* **455**, 152 (1976).
- Rosenberg, M. F., Kamis, A. B., Callaghan, R., Higgins, C. F. and Ford, R. C. : Three-dimensional structures of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein demonstrate major conformational changes in the transmembrane domains upon nucleotide binding. *J. Biol. Chem.* **278**, 8294 (2003).
- Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H. and Mackie, J. E. : Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* **258**, 1650 (1992).
- Schneider, E., Horton, J. K., Yang, C-H., Nakagawa, M. and Cowan, K. H. : multidrug resistance-associated protein gene overexpression and reduced drug sensitivity of topoisomerase II in a human breast carcinoma MCF7 cell line selected for etoposide resistance. *Cancer Res.* **54**, 152 (1994).
- Leier, I., Jedlitschky, G., Buchholz, U., Cole, S., Deeley, R. and Keppler, D. : The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related

- conjugates. *J. Biol. Chem.* **269**, 27807 (1994).
- 9) Norman, B. H., Dantzig, A. H., Kroin, J. S., Law, K. L., Tabas, L. B., Shepard, R. L., Palkowitz, A. D., Hauser, K. L., Winter, M. A., Sluka, J. P. and Starling, J. L. : Reversal of resistance in multidrug resistance protein (MRP1)-overexpressing cells by LY329146. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3381 (1999).
  - 10) Kuwano, M., Toh, S., Uchiyumi, T., Takano, H., Kohno, K. and Wada, M. : Multidrug resistance-associated protein subfamily transporters and drug resistance. *Anticancer Drug Design* **14**, 123 (1999).
  - 11) Lehne, G., Morkrid, L., den Boer, M. and Rugstad, H. E. : Diverse effects of P-glycoprotein inhibitory agents on human leukemia cells expressing the multidrug resistance protein (MRP). *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **38**, 187 (2000).
  - 12) Marbeuf-Gueye, C., Salerno, M., Quidu, P. and Garnier-Suillerot, A. : Inhibition of the P-glycoprotein- and multidrug resistance protein-mediated efflux of anthracyclines and calceinacetoxymethyl ester by PAK-104P. *Eur. J. Pharmacol.* **391**, 207 (2000).
  - 13) Loe, D. W., Deeley, R. G. and Cole, S. P. C. : Characterization of vincristine transport by the Mr 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for co-transport with reduced glutathione. *Cancer Res.* **58**, 5130 (1998).
  - 14) Chaudhary, P. M. and Roninson, I. B. : Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell* **66**, 85 (1991).
  - 15) Bosch, I. and Croop, J. : P-glycoprotein multidrug resistance and cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1288**, 37 (1996).
  - 16) Lehnert, M. : Clinical multidrug resistance in cancer: a multifactorial problem. *Eur. J. Cancer* **32A**, 912 (1997).
  - 17) Anilkumar, T. V., Sarraf, C. E., Hunt, T. and Alison, M. R. : The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts. *Br. J. Cancer* **65**, 552 (1992).
  - 18) Muller, M., Meijer, C., Zaman, G. J. R., Borst, P., Scheper, R. J., Mulder, H. S., de b Vries, E. G. E. and Jansen, P. L. M. : Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 13033 (1994).
  - 19) Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, V., Barnouin, K., Kurz, G. and Keppler, D. : Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Res.* **56**, 988 (1996).
  - 20) Loe, D. W., Almquist, K. C., Cole, S. P. C. and Deeley, R. G. : ATP dependent 17( $\beta$ -D-glucuronide) transport by multidrug resistance protein: inhibition by cholestatic steroids. *J. Biol. Chem.* **271**, 9683 (1996).
  - 21) Taketo, M., Schroeder, A. C., Mobraaten, L. E., Gunning, K. B., Hanten, G., Fox, R. R., Roderick, T. M., Stewart, C. L., Lilly, F., Hansen, C. T. and Overbeek P. A. : VB/N: An inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 2065 (1991).
  - 22) Wijnholds, J., de Lange, E. C. M., Scheffer, G. L., van den Berg, D.-J., Mol, C. A. A. M., van der Valk, M., Schinkel, A. H., Scheper, R. J., Breimer, D. D. and Borst, P. : Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J. Clin. Investig.* **105**, 279(2000).
  - 23) Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K. L., Lewis, R. A., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M. and Lupski, J. R. : A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **15**, 236 (1997).
  - 24) Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., van Deemter, L., Wijnholds, J. and Schinkel, A. H. : Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Res.* **60**, 5761 (2000).