

사람 유방암세포주 MCF-7에 Paclitaxel 처치 후 종양영상용 방사성의약품 섭취 변화에 대한 시험관내 연구

성균관의대 삼성서울병원 핵의학과
최준영 · 최 용 · 최연성 · 이경한 · 김병태

In Vitro Study of Tumor Seeking Radiopharmaceutical Uptake by Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 after Paclitaxel Treatment

Joon Young Choi, M.D., Yong Choi, Ph.D., Yearn Seong Choe, Ph.D.,
Kyung-Han Lee, M.D., and Byung-Tae Kim, M.D.

Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: This study was designed to investigate the cellular uptake of various tumor imaging radiopharmaceuticals in human breast cancer cells before and after paclitaxel exposure considering viable cell number. **Materials and Methods:** F-18-fluorodeoxyglucose, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, and Tc-99m-tetrofosmin were used to evaluate the cellular uptake in MCF-7 cells. MCF-7 cells were cultured in multi-well plates. Wells were divided into DMSO exposure control group, and paclitaxel exposure group. The exposure durations of paclitaxel with 10 nM or 100 nM were 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h. **Results:** Viable cell fraction was reduced as the concentration and exposure time of paclitaxel increased. After 10 nM paclitaxel exposure, the cellular uptake of all 5 radiopharmaceuticals was not reduced significantly, irrespective of exposure time and viable cell fraction. After 100 nM paclitaxel exposure, the cellular uptake of all 5 radiopharmaceuticals was enhanced significantly irrespective of viable cell fraction. The peak uptake was observed in experimental groups with paclitaxel exposure for 6 to 48 h according the type of radiopharmaceutical. When the cellular uptake was adjusted for the viable cell fraction and cell count, the peak cellular uptake was observed in experimental groups with paclitaxel exposure for 48 h, irrespective of the type of radiopharmaceutical. **Conclusion:** The cellular uptake of F-18-fluorodeoxyglucose, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, and Tc-99m-tetrofosmin did not reflect viable cell number in MCF-7 cells after paclitaxel exposure for up to 48 h. (Nucl Med Mol Imaging 2007;41(5):364-372)

Key Words: F-18-fluorodeoxyglucose, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, Tc-99m-tetrofosmin, paclitaxel, MCF-7, breast cancer, cell viability

서 론

악성종양환자에서 항암제의 치료효과를 조기에 정확하게 판정 또는 예측하는 것은 환자의 예후판정과 치료방침 결정에 중요하다. CT나 유방촬영술 같은 해부학적 영상은 병변의 크기 변화를 치료효과 판정의 주요 기준으로 사용하므로

항암제의 치료효과를 조기에 판정 또는 예측하기 어렵다.¹⁾

종양세포에 섭취되는 방사성의약품과 single photon emission computed tomography, positron emission tomography(PET) 영상 등을 이용한 핵의학적 방법은 분자-생화학적 변화를 주로 반영하므로, 해부학적 변화에 앞서서 항암제의 치료효과를 판정 또는 예측할 수 있다. 이런 목적으로 사용되는 방사성의약품으로는 F-18-fluorodeoxyglucose(F-18-FDG),²⁾ C-11-methionine,³⁾ Tc-99m-MIBI,⁴⁾ Tc-99m-tetrofosmin,⁵⁾ Tl-201,⁶⁾ Tc-99m-annexin V⁷⁾ 등이 있다.

항암제 치료효과를 판정하는 기준으로는 치료 전후의 종양섭취 방사성의약품의 섭취감소정도,^{1,6)} 치료 후 섭취정도,^{4,5)} 치료 후 영상에서의 방사성의약품의 섭취정도⁷⁾ 등 다양하다. 이 연구들은 대개 항암제 투여 수주 후 섭취양상을 평가하였다. 따라서 항암제 투여 후 1~2일 내의 매우 짧은 기간 동안의

• Received: 2007. 6. 26. • Accepted: 2007. 8. 14.
• Address for reprints: Byung-Tae Kim, M.D., Department of Nuclear Medicine, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, #50 Ilwon-Dong, Kangnam-Ku 135-710 Seoul, Korea
Tel: 02-3410-2650, Fax: 02-3410-2639
E-mail: bfnm.kim@samsung.com
* 이 연구는 보건복지부 인체구조 영상화 신기술 개발사업(02-PJ3-PG6-EV06-0002)의 지원으로 수행되었음.

방사성의약품의 섭취양상, 특히 섭취정도가 생존세포수 자체를 반영하는지는 잘 알려져 있지 않으며 새로운 항암제에 대해서는 더욱 잘 알려져 있지 않다.

Paclitaxel 이외의 항암제를 사용한 이전 in vitro 실험에서 radioactive deoxyglucose는 hexadecylphosphocholine,⁸⁾ platinum-based agent,⁹⁾ gemcitabine,¹⁰⁾ cycloheximide,¹¹⁾ bleomycin¹¹⁾ 등의 항암제에 4시간 또는 24시간 노출시 종양세포에서의 섭취가 증가하는 것으로 알려져 있다. Tc-99m-MIBI와 Tl-201도 cycloheximide와 bleomycin에 24시간 노출시 생존 세포수로 보정된 인간혈액세포에서의 섭취가 증가한다.¹¹⁾ 세포고사 발견용 방사성의약품인 Tc-99m-annexin V도 항암제 노출 시간에 비례하여 종양세포 섭취가 증가한다.¹²⁾ C-11-methionine과 Tc-99m-tetrofosmin의 경우에 항암제 투여에 따른 종양세포의 시간에 따른 섭취변화는 잘 알려져 있지 않다.

Paclitaxel은 비교적 최근에 개발된 항암제로 다른 항암제와 달리 세포증식과 분열에 필요한 microtubular network의 재구성 억제와 mitotic arrest에 의한 세포증식억제와 세포고사를 동시에 일으킨다.^{13,14)} 광범위한 암에 대한 뛰어난 항암효과로 유방암, 난소암, 폐암 등의 치료에 최근 많이 사용되고 있다. 그러나, paclitaxel 노출에 따른 방사성의약품의 시간에 따른 종양의 섭취양상은 잘 알려져 있지 않다.

이 연구에서는 paclitaxel 노출 시간에 따른 여러 종양영상용 방사성의약품의 유방암세포 섭취양상을 paclitaxel 노출 48시간까지 종양세포 생존능과 비교하여 알아보았다.

대상 및 방법

1. 세포배양

MCF-7 세포주(Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 5% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 g/mL streptomycin, 584 mg/L L-glutamine, glucose 2 g/L 등을 포함한 RPMI-1640 배지(Gibco Industries Inc., OK, USA)를 사용하여 100 mL plastic culture dish(Corning Inc., NY, USA)에서 배양하였다. 세포는 37°C 온도와 5% CO₂를 함유한 가습 공기 상태에서 조직배양기(Water-Jacked Incubator 3250, Forma Scientific, OH, USA)에서 배양하였다. Subculture는 1주일에 1회 시행하였다.

2. 방사성의약품 세포섭취실험

세포섭취실험에 사용된 방사성의약품은 F-18-FDG(cyclotron으로 자체 생산), C-11-methionine(cyclotron으로 자체 생산), Tl-201(Korea Atomic Energy Research Institute, Daejeon,

Korea), Tc-99m-MIBI(DuPont Pharmaceuticals Company, DE, USA), Tc-99m-tetrofosmin(Amersham plc, Buckinghamshire, United Kingdom)이었다. Paclitaxel(Tocris Bioscience, MS, USA)은 1:10으로 희석된 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma Chemical Co., MO, USA) 용액에 녹였다.

방사성의약품 섭취를 알아보기 위한 실험군은 6개로 아무것도 첨가하지 않는 DMSO를 48시간 노출시킨 DMSO 노출 대조군, 다양한 paclitaxel 노출시간을 가지는 5개의 paclitaxel 노출 실험군으로 이루어졌다. MCF-7세포를 subculture 할 때, 각 well 당 2 mL의 용적을 가지는 3개의 12-well plate(Corning Inc., NY, USA)에 약 1.0×10^6 개의 세포를 각 well에 RPMI-1640 배지 1.0 mL와 함께 넣어 주고 조직배양기에서 배양하였다. 2-3일 뒤 약 50-60%의 confluence를 보일 때, 12-well plate에서 배지를 모두 갈아주고, 바로 이어서 4개의 well에 10 nM이 되도록 10 μ L의 paclitaxel을, 다른 4개의 well에는 10 μ L의 DMSO용액을 넣었다. 이 후 24시간 뒤에 다른 4개 well에 10 nM이 되도록 10 μ L의 paclitaxel을 넣었다. 이 후 12시간 뒤에 또 다른 4개 well에 10 nM이 되도록 10 μ L의 paclitaxel을 넣었다. 이 후 6시간 뒤에 또 다른 4개 well에 10 nM이 되도록 10 μ L의 paclitaxel을 넣었다. 이 후 4시간 뒤에 또 다른 4개 well에 10 nM이 되도록 10 μ L의 paclitaxel을 넣었다. 이 후 2시간 뒤에 각 실험군 4개의 well 중 3개에 종양영상용 방사성의약품을 넣고 1시간 동안 조직배양기에서 배양하여 세포섭취가 일어나도록 하였다. 방사성의약품 투여시간을 기준으로 paclitaxel에 노출된 시간은 각각 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간이었으며, paclitaxel을 녹이는데 사용한 DMSO의 영향을 보기 위한 DMSO의 노출시간은 48시간이었다.

방사성의약품을 투여한 각 well에서 배지를 건어 각각 5-mL medi-tube(Mediland, Seoul, Korea)로 옮겼다. 이 후 각각의 well을 500 μ L의 cold phosphate-buffered saline(Sigma Chemical Co., MO, USA)으로 2번 헹군 뒤, 이를 배지가 있는 각각의 medi-tube로 옮겼다. 각 well에 500 μ L의 증류수를 넣은 후 5분간 조직배양기에서 둔 뒤, 광학현미경(Axiovert 135, Carl Zeiss Inc., Jena, Germany)으로 세포가 떨어져 있는지 확인하고, 새로운 medi-tube로 이를 옮겼다. 500 μ L의 증류수를 다시 각 well에 넣은 뒤, 남아 있는 세포를 이 전에 증류수가 들어 있는 세포분획이 있는 medi-tube로 각각 옮겼다. 이렇게 세포분획과 배지분획을 가진 medi-tube를 automatic gamma counter(1480 Wizard, PerkinElmer Inc., CT, USA)에서 방사성의약품의 해당되는 photo peak를 맞추고, 20%의 window를 정한 뒤, 각 tube에 대하여 10초간 계수하였다. 세포분획과 배지분획 계수의 합을 각 well에서의 실제 방사성

의약품 투여량으로 정하고, 투여량에 대한 섭취율(% uptake)을 각 well에 대하여 구하였다. 계수가 끝난 용액은 protein assay 시행 전까지 -20°C의 냉동고에서 보관하였다.

100 nM의 paclitaxel에 대하여 같은 방법으로 실험하였으며, 각각 방사성의약품에 대하여 위의 실험을 반복하였다.

3. 생존세포분율 측정

방사성의약품을 투여하지 않은 6개의 well(DMSO 48시간 노출 대조군, paclitaxel 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간 노출 실험군)에 대하여 paclitaxel의 농도와 노출시간에 따른 MCF-7 세포에 대한 cytotoxicity를 알아보기 위하여 trypan blue 염색법을 사용하였다.¹⁵⁾ 각 well의 세포를 trypsin EDTA 용액(Sigma Chemical Co., MO, USA)으로 분리시킨 뒤, 원심분리(1200 RPM, 5분)하여, 상층액을 제거하고 phosphate-buffered saline 500 µL로 다시 고루 혼합하였다. 0.8 mM의 phosphate-buffered saline으로 희석된 trypan blue 용액(Sigma Chemical Co., MO, USA)을 세포 현탁액과 1:1로 혼합한 뒤 15분 뒤에, hemocytometer로 푸른색으로 염색된 죽은 세포와 염색되지 않은 살아 있는 세포의 비율을 계산하였다. 총 계수된 세포수는 100개 이상이 되도록 실행하였다. 10 nM 및 100 nM의 paclitaxel에 대하여 각각 5회 같은 방법으로 실험하였고, 평균값을 사용하였다.

생존세포분율은 총세포에 대한 살아있는 세포의 비율로 정하였으며, 방사성의약품 섭취율을 생존세포분율로 나누어, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 투여량대비 섭취율을 구하였다.

4. Bradford protein assay

Paclitaxel의 농도와 노출시간에 따른 MCF-7 세포수의 변화를 알아보기 위하여, Protein Assay Kit(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 사용하여 Bradford protein assay를 시행하였다.¹⁶⁾ Background, 0 g/mL, 1.25 g/mL, 2.5 g/mL, 3.75 g/mL, 5.0 g/mL, 7.5 g/mL, 10 g/mL의 bovine serum albumin 표준용액을 각 군당 2개씩 총 200 µL가 되도록 96-well plate(Corning Inc., NY, USA)에 넣었다. 냉동고에서 보관되어 있던 방사성의약품이 투여된 세포분획을 가진 21개의 medi-tube (triplicated된 1종의 대조군 및 6종의 실험군)를 상온에서 녹인 뒤 BSA 표준곡선 안에 포함되도록 일정 용량을 정하여 각 medi-tube 당 2개 well에 넣었다. 이어서 phosphate-buffered saline 용액을 각 well의 총 부피가 200 µL가 되도록 투여하였다. 표준곡선용 BSA 용액 및 실험군이 들어있는 모든 well에 50 µL의 dye reagent 용액을 투여하고 잘 섞

은 뒤, 590 nm의 필터를 가진 Fluorescence Microplate Reader (Spectrafluor Plus, Tecan Co., Austria)로 흡광도를 측정하고, 표준곡선을 이용하여 각 well의 단백질 양을 정량하였다.

10 nM 및 100 nM의 paclitaxel에 대하여 각각 5회 같은 방법으로 실험하였으며, 측정된 값의 평균을 구하여 각 농도 및 노출시간에 따른 대조군에 대한 상대세포수를 백분율로 구하였다.

5. 통계분석

각 실험군사이의 생존 세포분획과 상대세포수를 비교하기 위하여 Mann-Whitney U test를 사용하였다. $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의하다고 판정하였다. 표의 결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였다.

결 과

1. 생존세포분율

DMSO 노출 대조군, 10 nM 및 100 nM의 paclitaxel 노출 실험군에서의 생존 세포의 비율은 Table 1과 같다. 10 nM과 100 nM의 paclitaxel 노출 실험군의 생존 세포비율은 모두 대조군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소되었다($p < 0.05$). 즉, paclitaxel 농도가 높을수록, 노출시간이 길수록 MCF-7 세포의 생존 세포비율이 DMSO 노출 대조군에 비하여 감소하였다.

Table 1. Viable Cell Fraction Calculated by Trypan Blue Staining.

Group	Viable cell fraction (%)	
DMSO control	91.0 ± 1.74	
Paclitaxel exposure	10 nM	100 nM
2 h	87.1 ± 3.57	86.0 ± 5.75
6 h	83.7 ± 4.92	79.3 ± 7.95
12 h	81.5 ± 7.22	74.0 ± 6.06
24 h	78.2 ± 9.09	64.9 ± 6.64
48 h	75.8 ± 11.2	54.7 ± 6.36

2. Bradford protein assay

10 nM 및 100 nM의 paclitaxel에 대하여 각 농도 및 노출시간에 따른 대조군에 대한 상대세포수의 백분율은 Table 2와 같다. DMSO 노출 대조군, paclitaxel 노출 실험군 사이에 상대세포수의 유의한 통계적 차이는 없었다. 다만, 100 nM paclitaxel의 48시간 노출 실험군은 다른 실험군에 비하여 통계적으로 유의하게 상대세포수가 감소되었다($p < 0.05$).

Table 2. Relative Cell Counts by Bradford Protein Assay.

Group	Relative cell counts (%)	
DMSO control	100 ± 4.10	
Paclitaxel exposure	10 nM	100 nM
2 h	100 ± 2.21	104 ± 7.07
6 h	97.3 ± 4.22	101 ± 6.26
12 h	102 ± 5.27	102 ± 10.9
24 h	99.3 ± 3.61	96.5 ± 8.55
48 h	97.8 ± 5.59	64.8 ± 13.3

3. F-18-FDG 섭취실험

0.37 MBq의 F-18-FDG를 각 well에 투여하고 얻은 DMSO 노출 대조군, 10 nM 및 100 nM paclitaxel 노출 실험군의 총 투여량대비 섭취율, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 대조군에 대한 투여량대비 상대섭취율은 Table 3과 같다.

10 nM paclitaxel 노출 실험군은 DMSO 노출 대조군과 비교하여 살아 있는 세포비율이 감소함에도 불구하고 F-18-FDG 섭취율이 큰 변화를 보이지 않았다. 생존 세포비율로 교정한 대조군에 대비한 투여량대비 상대섭취율도 큰 변화를 보이지 않았으며, 오히려 대조군에 비하여 4~16% 정도 증가하였다.

100 nM paclitaxel 노출 실험군은 DMSO 노출 대조군과 비교하여 살아 있는 세포비율이 감소함에도 불구하고 F-18-FDG 섭취율이 시간에 따라 증가하여, 24시간 노출에 최대값인 대조군 대비 2.0배의 섭취율 증가를 보였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 노출시간 증가에 따라 F-18-FDG 섭취율이 증가하였으며, 48시간 노출에

서 최대값인 2.85배의 증가를 나타내었다.

4. C-11-methionine 섭취실험

0.74 MBq의 C-11-methionine을 각 well에 투여하고 얻은 DMSO 노출 대조군, 10 nM 및 100 nM paclitaxel 노출 실험군의 총 투여량대비 섭취율, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 대조군에 대한 투여량대비 상대섭취율은 Table 4와 같다.

10 nM paclitaxel 노출 실험군은 DMSO 노출 대조군과 비교하여 살아 있는 세포비율이 감소함에도 불구하고 C-11-methionine 섭취율이 24시간 노출까지는 큰 변화를 보이지 않았으나, 48시간 노출에서는 대조군 대비 1.7배 증가하였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 큰 변화를 보이지 않았으며, 48시간 노출에서는 대조군 대비 2배 정도 증가하였다.

100 nM paclitaxel 노출 실험군은 DMSO 노출 대조군과 비교하여 살아 있는 세포비율이 감소함에도 불구하고 C-11-methionine 섭취율이 증가하는 경향을 보였으며, 6시간 노출에서 최대값을 이루어 대조군 대비 2.8배의 섭취율 증가를 보였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 노출시간의 증가에 따라 C-11-methionine 섭취율은 증가하였으며, 24시간 노출에서 최대값인 3.5배 증가를 나타내었다.

5. Tl-201 섭취실험

0.19 MBq의 Tl-201을 각 well에 투여하고 얻은 DMSO 노

Table 3. F-18-FDG Uptake after Paclitaxel Exposure.

Group	10 nM Paclitaxel		100 nM Paclitaxel	
	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio
DMSO control	3.36 ± 3.87	1.00 ± 1.17	3.36 ± 3.87	1.00 ± 1.17
2 h	3.37 ± 7.50	1.04 ± 2.36	3.95 ± 4.44	1.25 ± 1.43
6 h	3.30 ± 3.86	1.07 ± 1.28	3.75 ± 2.86	1.27 ± 9.91
12 h	3.41 ± 2.17	1.12 ± 7.32	3.88 ± 2.38	1.41 ± 8.83
24 h	3.35 ± 5.68	1.16 ± 2.00	6.85 ± 1.09	2.85 ± 4.63
48 h	3.03 ± 8.14	1.07 ± 2.96	5.22 ± 1.05	2.58 ± 5.29

Table 4. C-11-Methionine Uptake after Paclitaxel Exposure.

Group	10 nM Paclitaxel		100 nM Paclitaxel	
	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio
DMSO control	4.10 ± 4.56	1.00 ± 1.07	4.10 ± 4.56	1.00 ± 1.07
2 h	4.14 ± 7.40	1.05 ± 1.81	9.94 ± 7.35	2.56 ± 1.82
6 h	4.25 ± 1.40	1.13 ± 3.56	11.3 ± 3.21	3.16 ± 8.61
12 h	4.13 ± 7.96	1.13 ± 2.08	10.7 ± 1.09	3.19 ± 3.12
24 h	4.09 ± 9.58	1.15 ± 2.60	10.3 ± 2.07	3.50 ± 6.75
48 h	6.91 ± 6.78	2.02 ± 1.90	6.80 ± 8.57	2.75 ± 3.33

출 대조군, 10 nM 및 100 nM paclitaxel 노출 실험군의 총 투여량대비 섭취율, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 대조군에 대한 투여량대비 상대섭취율은 Table 5와 같다.

10 nM의 paclitaxel 투여에 대하여 살아 있는 세포비율은 감소하는데 비하여 Tl-201 섭취율은 48시간 노출까지 큰 변화를 보이지 않았다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 큰 변화를 보이지 않았으며, 오히려 7~20% 정도 약간 증가하였다.

100 nM paclitaxel 노출 실험군은 DMSO 노출 대조군과 비교하여 살아 있는 세포비율이 감소함에도 불구하고 Tl-201 섭취율이 시간에 따라 증가하였으며, 48시간 노출에서 최대값인 대조군 대비 1.4배의 섭취율 증가를 보였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 노출시간의 증가에 따라 Tl-201 섭취율은 증가하였으며, 48시간 노출에 최대값인 2.4배 증가를 나타내었다.

6. Tc-99m-MIBI 섭취실험

0.37 MBq의 Tc-99m-MIBI를 각 well에 투여하고 얻은 DMSO 노출 대조군, 10 nM 및 100 nM paclitaxel 노출 실험군의 총 투여량대비 섭취율, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 대조군에 대한 투여량대비 상대섭취율은 Table 6과 같다.

10 nM의 paclitaxel 투여에 대하여 살아 있는 세포비율은 감소하는데 비하여 Tc-99m-MIBI 섭취율은 7~37% 정도 증가하였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 11~59% 정도 증가하여, 24시간 노출에서 최대값을 이루었다.

100 nM의 paclitaxel 투여에 대하여 살아 있는 세포비율은 감소하는데 비하여 노출시간의 증가에 따라 Tc-99m-MIBI 섭취율은 증가하였으며, 12시간 노출에서 2.3배의 최고 섭취증가를 보였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 모두 증가하였으며 12시간 노출에서 최고인 2.8배 섭취

Table 5. Tl-201 Uptake after Paclitaxel Exposure.

Group	10 nM Paclitaxel		100 nM Paclitaxel	
	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio
DMSO control	22.1 ± 4.10	1.00 ± 1.82	22.1 ± 4.10	1.00 ± 1.82
2 h	22.6 ± 2.30	1.07 ± 1.07	22.8 ± 6.39	1.09 ± 3.00
6 h	23.3 ± 2.62	1.14 ± 1.26	24.3 ± 1.00	1.27 ± 5.10
12 h	23.8 ± 1.83	1.20 ± 9.07	25.4 ± 3.20	1.41 ± 1.75
24 h	20.6 ± 2.03	1.09 ± 1.05	30.3 ± 4.02	1.93 ± 2.51
48 h	21.3 ± 5.71	1.15 ± 3.03	31.7 ± 1.73	2.39 ± 1.28

Table 6. Tc-99m-MIBI Uptake after Paclitaxel Exposure.

Group	10 nM Paclitaxel		100 nM Paclitaxel	
	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio
DMSO control	1.14 ± 4.35	1.00 ± 3.29	1.14 ± 4.35	1.00 ± 3.29
2 h	1.22 ± 3.12	1.11 ± 2.45	1.41 ± 5.38	1.31 ± 4.31
6 h	1.45 ± 2.97	1.38 ± 2.44	2.09 ± 2.46	2.09 ± 2.12
12 h	1.54 ± 4.36	1.50 ± 3.65	2.64 ± 1.25	2.84 ± 1.16
24 h	1.56 ± 4.53	1.59 ± 3.98	2.29 ± 5.35	2.81 ± 5.65
48 h	1.50 ± 2.46	1.58 ± 2.23	1.56 ± 2.48	2.28 ± 3.12

Table 7. Tc-99m-Tetrofosmin Uptake after Paclitaxel Exposure.

Group	10 nM Paclitaxel		100 nM Paclitaxel	
	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio	%Uptake	Viable cell No. corrected relative uptake ratio
DMSO control	1.29 ± 5.05	1.00 ± 4.31	1.29 ± 5.05	1.00 ± 4.31
2 h	1.17 ± 2.76	0.95 ± 2.45	1.17 ± 3.32	0.95 ± 2.98
6 h	1.29 ± 3.25	1.08 ± 3.00	1.71 ± 4.10	1.52 ± 4.00
12 h	1.20 ± 3.98	1.04 ± 3.78	2.28 ± 1.02	2.16 ± 1.06
24 h	1.08 ± 1.67	0.96 ± 1.64	2.50 ± 1.51	2.71 ± 1.80
48 h	1.11 ± 9.07	1.03 ± 9.23	2.17 ± 2.19	2.78 ± 3.09

증가를 보였다.

7. Tc-99m-tetrofosmin 섭취실험

0.37 MBq의 Tc-99m-tetrofosmin을 각 well에 투여하고 얻은 DMSO 노출 대조군, 10 nM 및 100 nM paclitaxel 노출 실험군의 총 투여량대비 섭취율, 생존 세포비율로 교정한 생존 세포에서만 대조군에 대한 투여량대비 상대섭취율은 Table 7과 같다.

10 nM의 paclitaxel 투여에 대하여 살아 있는 세포비율은 감소하는데 비하여 Tc-99m-tetrofosmin 섭취율 및 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율은 모두 48시간 노출까지 큰 변화를 보이지 않았다.

100 nM의 paclitaxel 노출에 대하여 살아 있는 세포비율은 감소하는데 비하여 paclitaxel 실험군 모두 Tc-99m-tetrofosmin 섭취율이 증가하였으며, 24시간 노출에서 최대값인 1.9배 증가를 보였다. 생존 세포비율로 교정한 투여량대비 상대섭취율도 증가하였으며, 48시간에서 최고인 2.8배 증가를 보였다.

고 찰

이 연구는 핵의학 영역에서 많이 사용되는 종양영상용 방사성의약품인 F-18-FDG, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, Tc-99m-tetrofosmin의 섭취정도가 모두 저농도 또는 고농도의 paclitaxel 투여 후 48시간까지 MCF-7 인간유방암세포주의 생존 세포수를 반영하지 못한다는 것을 보여 준다. 저농도의 paclitaxel 투여에서는 5가지의 방사성의약품의 섭취정도가 큰 변화가 없었으며, 고농도의 paclitaxel 투여에서는 생존 세포의 비율이 감소함에도 불구하고 방사성의약품의 섭취가 오히려 증가하였다.

F-18-FDG는 현재 가장 많이 사용되는 PET 종양영상용 방사성의약품으로, 악성종양에서 포도당 수송 및 대사가 증가된 것을 이용한 것이다. 즉, in vitro 및 in vivo 연구에서 종양세포의 F-18-FDG 섭취증가는 세포막의 포도당 송체 GLUT1과 GLUT3, 그리고 hexokinase type II의 발현증가와 깊은 연관이 있다고 알려졌다.¹⁷⁻²¹⁾ 여러 in vitro 연구에서 radioactive deoxyglucose는 항암제 노출시 종양세포에서의 섭취가 증가하는 것으로 알려졌다.⁸⁻¹¹⁾ 그러나, paclitaxel을 사용하여 48시간까지 섭취를 본 연구는 없었다. 이 연구에서는 고농도의 paclitaxel 노출시 유방암세포에서 생존 세포비율이 감소함에도 불구하고 48시간까지 F-18-FDG 섭취가 증가한다는 것을 보였으며, 항암제 치료 후 급성기에 시행한 F-18-FDG 섭취정도가 치료효과를 반영하지 않는다는 기존의 연구를 뒷받침해 준다.²²⁾ 항암제에 의한 F-18-FDG 섭취

증가의 기전을 알아본 연구는 없지만 F-18-FDG 섭취가 세포막의 포도당 수송 단백질 및 hexokinase 발현과 관계가 깊고,¹⁷⁻²¹⁾ 실제로 유전자 치료 후 종양세포의 F-18-FDG 섭취 및 포도당 수송 단백질 발현이 증가하는 것으로 고려해 볼 때,²³⁾ 항암제에 이러한 F-18-FDG 섭취증가는 세포에 대한 스트레스 증가로 인하여 세포 사멸을 방지하기 위한 방어기전으로 세포막의 포도당 수송이 증가하는 것으로 추측된다.

C-11-methionine은 악성 종양에서 아미노산 수송과 단백질 합성이 증가되어 있는 것을 이용한 PET 종양영상용 방사성의약품이다. 이 중 C-11-methionine은 단백질합성을 보다는 아미노산 수송 증가와 관련이 더 높은 것으로 알려져 있다.^{24,25)} 특히, C-11-methionine은 뇌종양, 비뇨생식기 종양 등에서 F-18-FDG 보다 유용한 것으로 알려져 있다.²⁶⁾ 항암제 투여 직후의 종양섭취를 본 연구는 없지만, in vitro 실험에서 H-3-methionine의 선암세포 섭취가 방사선 조사 후 12일까지 감소하지 않고, 오히려 약간 증가된다는 것이 알려져 있다.²⁷⁾ 이 연구에서도 고농도의 paclitaxel 노출시 유방암세포에서 생존 세포비율이 감소함에도 불구하고 48시간까지 C-11-methionine 섭취가 증가하였다. 저농도에서도 생존 세포비율감소에 비하여 섭취가 감소되지 않았다. 이는 C-11-methionine 섭취정도도 항암제 투여 후 초기에 치료효과를 판정하기는 부적절하다는 것을 시사해 준다. 그렇지만, 실제로 이러한 C-11-methionine 섭취증가의 기전을 알아 본 연구는 아직 없다.

Tl-201은 주로 세포막 전위차와 Na⁺/K⁺-ATPase 활동에 의하여 세포로 섭취되는 종양영상용 방사성의약품이다.²⁸⁾ 실제로 두경부종양에서 Na⁺/K⁺-ATPase 활동도와 Tl-201 섭취간에 연관이 있다는 보고가 있다.²⁹⁾ 종양세포에서 항암제 투여 후 섭취변화를 본 연구는 없지만, 인간전단핵세포(premonocyte)에서 bleomycin 노출시 24시간까지 Tl-201 섭취가 증가하며, 농도가 높을수록 섭취가 증가한다는 보고가 있다.¹¹⁾ 이 연구에서도 paclitaxel 노출시 특히 고농도에서 살아 있는 세포비율의 감소에도 불구하고 MCF-7 세포의 Tl-201 섭취가 증가하였다. 이는 Tl-201 섭취정도는 항암제 치료에 대한 반응을 초기에 반영하지 않는다는 것을 뜻한다. 그렇지만, 실제로 항암제 투여 후 이러한 종양세포의 Tl-201 섭취증가와 세포막 전위차와 Na⁺/K⁺-ATPase 활동과의 관계 등의 섭취기전을 알아 본 연구는 아직 없다.

Tc-99m-MIBI는 주로 미토콘드리아의 전위차에 의하여 세포로 섭취되는 종양영상용 방사성의약품이다.²⁸⁾ 특히, Tc-99m-MIBI는 유방암 영상에 많이 사용되어 좋은 결과를 보여 왔다.³⁰⁾ 종양세포에서 항암제 투여 후 섭취변화를 본 연구는 없지만, 인간전단핵세포(premonocyte)에서 bleomycin

노출시 24시간까지 Tc-99m-MIBI 섭취가 증가하며, 농도가 높을수록 섭취가 증가한다는 보고가 있다.¹¹⁾ 이 연구에서 Tc-99m-MIBI 섭취는 살아 있는 세포 비율의 감소에도 감소하지 않고, 고농도의 paclitaxel 노출에 증가하였다. 이는 Tc-99m-MIBI 섭취정도로 항암제 반응을 조기에 평가할 수 없다는 것을 시사해 준다. 항암제 투여 후의 Tc-99m-MIBI 섭취기전을 알아 본 연구는 없지만, 최근 인간 폐세포에서 방사선 조사 후 Tc-99m-MIBI 섭취가 일시적으로 증가하고, 이것이 세포내 미토콘드리아의 막전위 증가가 그 기전이라고 설명하고 있다.³¹⁾ 따라서, 항암제 투여 후의 Tc-99m-MIBI의 증가도 이와 관계가 있을 가능성이 있다.

Tc-99m-tetrofosmin은 세포막 전위차와 미토콘드리아의 전위차에 의하여 세포로 섭취되는 종양영상용 방사성의약품이다.²⁸⁾ 최근에는 다약제내성과 관련하여 Tc-99m-MIBI와 함께 많은 연구가 이루어지고 있다.³²⁾ 항암제 투여 직후의 Tc-99m-tetrofosmin 섭취변화를 알아본 기존 연구는 없지만, 이 연구에서는 Tc-99m-tetrofosmin 섭취는 살아 있는 세포의 비율감소에도 불구하고, 저농도나 고농도의 paclitaxel 모두에서 섭취가 감소하지 않았으며, 오히려 고농도의 paclitaxel 에서는 48시간 노출까지 종양세포의 섭취가 증가하였다. 이는 다른 방사성의약품과 마찬가지로 Tc-99m-tetrofosmin 섭취 정도로 항암제 반응을 조기에 평가할 수 없다는 것을 시사해 준다. 이러한 섭취증가 기전은 알려지지 않았지만, Tl-201과 Tc-99m-MIBI도 섭취가 증가하고, Tc-99m-tetrofosmin 섭취가 세포막 전위차와 미토콘드리아의 전위차 모두에 관계되고, 위에서 언급한 방사선 조사에 의한 미토콘드리아의 막전위 증가를 고려해 볼 때, Tc-99m-tetrofosmin 섭취증가도 항암제에 의한 세포막 전위와 미토콘드리아 전위 변화와 관계가 있을 것으로 보인다.^{28,31)}

이 연구에서는 5가지 종양영상용 방사성의약품 모두에서 paclitaxel 노출에 따른 MCF-7 종양세포의 방사성의약품 섭취증가가 확인되었다. 특히, 100 nM paclitaxel에서 생존 세포수로 보정된, 즉 생존 세포만의 방사성의약품 섭취는 모두 48시간에서 최고를 이루어 대조군에 비하여 3.0-4.7배의 높은 증가를 보였다. 이는 paclitaxel 이라는 세포독성 스트레스 노출시간 증가에 따라, 포도당수송대사, 아미노산수송대사, 세포막전위, 미토콘드리아대사 등이 모두 증가한다는 것을 시사해 준다. 실제로 한 연구에서는 종양세포의 Tl-201 섭취가 미토콘드리아 ATP 합성증가 뿐만 아니라 해당작용의 증가와도 연관이 있다고 보고하였다.³³⁾ 그렇지만, 이러한 항암제 투여에 의한 방사성의약품의 섭취증가 기전을 규명하는 추가적인 연구가 필요하다.

이러한 살아 있는 세포수를 반영하지 않는 이 5가지 종양

영상용 방사성의약품의 섭취증가는 이 종양영상용 방사성의약품들이 항암제 치료효과를 아주 초기에는 반영하지 않을 가능성을 제시해 주며 항암제 치료효과를 조기에 반영할 수 있는 새로운 종양영상용 방사성의약품이 필요하다는 것을 시사해준다. 최근, 이러한 목적으로 연구되고 있는 종양영상용 방사성의약품이 Tc-99m-annexin V와 F-18-fluorothymidine(F-18 FLT)이다. Tc-99m-annexin V는 세포고사 초기에 세포 밖으로 노출되는 phosphatidyl serine에 특이적으로 결합하여 항암제에 대한 효과를 조기에 판정할 가능성을 제시해 주고 있다.⁷⁾ F-18-FLT는 종양세포의 세포분열능력을 반영하는 종양영상용 방사성의약품으로 최근 사용되기 시작하였다.³⁴⁾ 세포실험 및 동물실험에서 F-18-FLT는 F-18-FDG 보다 항암제에 대한 치료효과를 조기에 더 잘 반영하는 것으로 보고되고 있다.^{34,36)} 그렇지만, 이 두 가지 종양영상용 방사성의약품은 국내에서는 제조가 어렵고, 상업화되어 있지 않아 실제 임상에 사용하기가 아직은 힘들다.

이 연구의 제한점은 다음과 같다. Paclitaxel 처치 후 최대 약 45%의 종양세포가 사멸하였는데, 더 많은 세포가 죽는 100 nM 보다 높은 농도를 실험군에 넣었을 때도 방사성의약품 섭취증가가 나타나는지 확인이 필요하다. 실제로 종양세포의 방사성의약품 섭취증가가 생존 세포에서만 일어나고 죽어있는 세포에서는 섭취가 없는 것에 대한 확인이 필요하다. 즉, 죽어 있는 세포에서 확산 등의 다른 방법에 의하여 방사성의약품 섭취가 일어나지는 않았는지 알아볼 필요가 있다. 이를 위해서는 autoradiography 같은 방법이 도움이 될 것이다. Paclitaxel 처치하는 시점에서의 실험군사이에 cell confluence가 다르므로 이것이 결과에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. 그렇지만, paclitaxel 처치하는 시점에서의 실험군사이에 cell confluence를 일치시키면 방사성의약품 투여 시점에서의 cell confluence가 달라지는 문제가 또 생기게 된다. In vitro 실험이므로 in vivo 에서도 같은 결과를 보일지에 대한 확인이 필요하다. 특히, 방사성의약품이 일정 농도로 세포 주위에 있는 in vitro와 달리 in vivo에서는 방사성의약품이 혈류에 따라 혈중에서 제거되므로 세포막안과 밖의 방사성의약품의 농도차가 시간에 따라 다르게 된다. 또한, in vivo에서는 빠른 종양의 성장으로 인하여 종양 내부는 저산소상태를 보이게 된다. 세포 또는 동물실험에서 저산소상태는 F-18-FDG의 섭취를 증가시키고,³⁷⁻³⁹⁾ methionine 섭취에는 영향이 없으며,³⁹⁾ Tl-201과 Tc-99m-MIBI의 섭취는 감소시킨다.⁴⁰⁾ 이러한 차이들이 in vivo에서 항암제 치료 후의 방사성의약품 종양섭취에 영향을 끼칠 가능성이 있다. In vivo에서는 항암제 치료 후에 종양주위로 대식세포(macrophage)의 침윤이 관찰된다. 활성화된 대식세포에는 F-18-FDG 등의 방

사성의약품의 섭취가 증가한다는 것이 알려져 있으므로 항암제 치료 직 후에 이러한 대식세포의 F-18-FDG 섭취가 전체 종양섭취에 어떤 영향을 미치는 지도 확인이 필요하다.⁴¹⁾

결론적으로, MCF-7 유방암세포주에서 종양영상용 방사성의약품인 F-18-FDG, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, Tc-99m-tetrofosmin의 섭취율은 paclitaxel 투여 후 48시간까지 생존 종양세포 수의 감소를 반영하지 못한다.

요 약

목적 : 여러 종양영상용 방사성의약품이 암환자에서 치료후 반응을 보는 데 사용되고 있다. 이 연구에서는 paclitaxel 노출 시간에 따른 여러 종양영상용 방사성의약품의 유방암세포 섭취양상을 paclitaxel 노출 48시간까지 생존 종양세포 수와 비교하여 알아보았다. **대상 및 방법** : F-18-fluorodeoxyglucose, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, Tc-99m-tetrofosmin의 5가지 종양영상용 방사성의약품의 MCF-7 유방암세포에서의 세포섭취를 알아보았다. DMSO 노출 대조군, 다양한 paclitaxel 노출시간을 가지는 5가지의 실험군(노출시간: 2시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간)의 총 6가지 조건에서 종양영상용 방사성의약품을 60분간 섭취시킨 뒤 섭취율을 구하였다. Paclitaxel은 10 nM과 100 nM의 2가지 농도를 사용하였다. **결과** : 10 nM의 paclitaxel은 노출 48시간까지 MCF-7 세포의 살아 있는 세포의 비율을 약 75% 정도로 감소시켰지만, 종양세포의 5가지 종양영상용 방사성의약품 섭취는 대조군과 비교시 유의하게 감소하지 않았다. 100 nM의 paclitaxel은 노출 48시간까지 MCF-7 세포의 살아 있는 세포의 비율을 약 55% 정도로 감소시켰지만, 종양세포의 5가지 종양영상용 방사성의약품 섭취는 대조군과 비교시 유의하게 증가하였다. **결론** : MCF-7 유방암세포주에서 종양영상용 방사성의약품인 F-18-FDG, C-11-methionine, Tl-201, Tc-99m-MIBI, Tc-99m-tetrofosmin의 섭취율은 paclitaxel 투여 후 48시간까지 생존 종양세포 수의 감소를 반영하지 못한다.

References

- Maini CL, Tofani A, Sciuto R, Semprebene A, Cavaliere R, Mottolise M, et al. Technetium-99m-MIBI scintigraphy in the assessment of neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma. *J Nucl Med* 1997;38:1546-51.
- Brucher BL, Weber W, Bauer M, Fink U, Avril N, Stein HJ, et al. Neoadjuvant therapy of esophageal squamous cell carcinoma: response evaluation by positron emission tomography. *Ann Surg* 2001;233:300-9.
- Chesnay E, Babin E, Constans JM, Agostini D, Bequignon A, Regeasse A, et al. Early response to chemotherapy in hypopharyngeal cancer: assessment with ¹¹C-methionine PET, correlation with morphologic response, and clinical outcome. *J Nucl Med* 2003; 44:526-32.
- Shih CM, Hsu WH, Huang WT, Wang JJ, Ho ST, Kao A. Usefulness of chest single photon emission computed tomography with technetium-99m methoxyisobutylisonitrile to predict taxol based chemotherapy response in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2003;199:99-105.
- Kao CH, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Changlai SP, Lee JK. Paclitaxel-based chemotherapy for non-small cell lung cancer: predicting the response with ^{99m}Tc-tetrofosmin chest imaging. *J Nucl Med* 2001;42:17-20.
- Murata H, Kusuzaki K, Takeshita H, Hirata M, Hashiguchi S, Emoto K, et al. Assessment of chemosensitivity in patients with malignant bone and soft tissue tumors using thallium-201 scintigraphy and doxorubicin binding assay. *Anticancer Res* 2000;20:3967-70.
- Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, Bartsch P, Jerusalem G, Seidel L, et al. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent ^{99m}Tc recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis. *Clin Cancer Res* 2002;8:2766-74.
- Haberkorn U, Reinhardt M, Strauss LG, Oberdorfer F, Berger MR, Altmann A, et al. Metabolic design of combination therapy: use of enhanced fluorodeoxyglucose uptake caused by chemotherapy. *J Nucl Med* 1992;33:1981-7.
- Haberkorn U, Oberdorfer F, Klenner T, Strauss LG, Stohr M, Wallich R, et al. Metabolic and transcriptional changes in osteosarcoma cells treated with chemotherapeutic drugs. *Nucl Med Biol* 1994;21:835-45.
- Haberkorn U, Morr I, Oberdorfer F, Bellemann ME, Blatter J, Altmann A, et al. Fluorodeoxyglucose uptake in vitro: aspects of method and effects of treatment with gemcitabine. *J Nucl Med* 1994;35:1842-50.
- Slosman DO, Pugin J. Lack of correlation between tritiated deoxyglucose, thallium-201 and technetium-99m-MIBI cell incorporation under various cell stresses. *J Nucl Med* 1994;35:120-6.
- Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, et al. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc-EC-annexin V. *Cancer Biother Radio* 2001; 16:73-83.
- Olah E, Csokay B, Prajda N, Kote-Jarai Z, Yeh YA, Weber G. Molecular mechanisms in the antiproliferative action of taxol and tiazofurin. *Anticancer Res* 1996;16:2469-77.
- Charles AG, Han TY, Liu YY, Hansen N, Giuliano AE, Cabot MC. Taxol-induced ceramide generation and apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Chemoth Pharm* 2001;47:444-50.
- Chang YF, Renshaw HW. Pasteurella haemolytica leukotoxin: comparison of ⁵¹chromium-release, trypan blue dye exclusion, and luminol-dependent chemiluminescence-inhibition assays for sensitivity in detecting leukotoxin activity. *Am J Vet Res* 1986;47:134-8.
- Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* 1996;236:302-8.
- Chung JK, Lee YJ, Kim C, Choi SR, Kim M, Lee K, et al. Mechanisms related to [¹⁸F]fluorodeoxyglucose uptake of human colon cancers transplanted in nude mice. *J Nucl Med* 1999; 40:339-46.

18. Brown RS, Leung JY, Kison PV, Zasadny KR, Flint A, Wahl RL. Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer. *J Nucl Med* 1999;40:556-65.
19. Tian M, Zhang H, Nakasone Y, Mogi K, Endo K. Expression of Glut-1 and Glut-3 in untreated oral squamous cell carcinoma compared with FDG accumulation in a PET study. *Eur J Nucl Med Mol I* 2004;31:5-12.
20. Tohma T, Okazumi S, Makino H, Cho A, Mochiduki R, Shuto K, et al. Relationship between glucose transporter, hexokinase and FDG-PET in esophageal cancer. *Hepato-Gastroenterol* 2005;52:486-90.
21. Zhao S, Kuge Y, Mochizuki T, Takahashi T, Nakada K, Sato M, et al. Biologic correlates of intratumoral heterogeneity in ¹⁸F-FDG distribution with regional expression of glucose transporters and hexokinase-II in experimental tumor. *J Nucl Med* 2005;46:675-82.
22. Rozental JM, Levine RL, Nickles RJ, Dobkin JA. Glucose uptake by gliomas after treatment. A positron emission tomographic study. *Arch Neurol* 1989;46:1302-7.
23. Haberkorn U, Altmann A, Kamencic H, Morr I, Traut U, Henze M, et al. Glucose transport and apoptosis after gene therapy with HSV thymidine kinase. *Eur J Nucl Med* 2001;28:1690-6.
24. Ishiwata K, Vaalburg W, Elsinga PH, Paans AM, Woldring MG. Comparison of L-[1-¹¹C]methionine and L-methyl-[¹¹C]methionine for measuring in vivo protein synthesis rates with PET. *J Nucl Med* 1988;29:1419-27.
25. Ishiwata K, Kubota K, Murakami M, Kubota R, Sasaki T, Ishii S, et al. Re-evaluation of amino acid PET studies: can the protein synthesis rates in brain and tumor tissues be measured in vivo?. *J Nucl Med* 1993;34:1936-43.
26. Chung JK, Kim YK, Kim SK, Lee YJ, Paek S, Yeo JS, et al. Usefulness of ¹¹C-methionine PET in the evaluation of brain lesions that are hypo- or isometabolic on ¹⁸F-FDG PET. *Eur J Nucl Med Mol I* 2002;29:176-82.
27. Higashi K, Clavo AC, Wahl RL. In vitro assessment of 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose, L-methionine and thymidine as agents to monitor the early response of a human adenocarcinoma cell line to radiotherapy. *J Nucl Med* 1993;34:773-9.
28. 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.
29. Sato T, Indo H, Kawabata Y, Kobayashi T, Suenaga S, Iwashita Y, et al. Thallium-201 chloride (Tl-201) accumulation and Na⁺/K⁺-ATPase expression in tumours of the head and neck. *Dentomaxillofac Rad* 2005;34:212-7.
30. Del Vecchio S, Salvatore M. ^{99m}Tc-MIBI in the evaluation of breast cancer biology. *Eur J Nucl Med Mol I* 2004;31(Suppl 1):S88-96.
31. Furuta M, Nozaki M, Kawashima M, Iimuro M, Okayama A, Fukushima M, et al. Monitoring mitochondrial metabolisms in irradiated human cancer cells with ^{99m}Tc-MIBI. *Cancer Lett* 2004; 212:105-11.
32. Fuster D, Vinolas N, Mallafre C, Pavia J, Martin F, Pons F. Tetrofosmin as predictors of tumour response. *Q J Nucl Med* 2003; 47:58-62.
33. Fukumoto M, Kurohara A, Yoshimura N, Yoshida D, Akagi N, Yoshida S. Relationship between ATP synthesis and ²⁰¹Tl uptake in transformed and non-transformed cell lines. *Nucl Med Commun* 1998;19:1169-75.
34. Been LB, Suurmeijer AJ, Cobben DC, Jager PL, Hoekstra HJ, Elsinga PH. [¹⁸F]FLT-PET in oncology: current status and opportunities. *Eur J Nucl Med Mol I* 2004;31:1659-72.
35. Yeo JS, Lim SJ, Oh SJ, Ryu JS, Yun MK, Moon DH. Comparison of F-18 FLT uptake with F-18 FDG for early evaluation of chemotherapy response in human cancer cell lines. *J Nucl Med* 2003;44:81P [Abstract].
36. Leyton J, Latigo JR, Perumal M, Dhaliwal H, He Q, Aboagye EO. Early detection of tumor response to chemotherapy by 3'-deoxy-3'-[¹⁸F]fluorothymidine positron emission tomography: the effect of cisplatin on a fibrosarcoma tumor model in vivo. *Cancer Res* 2005;65:4202-10.
37. Clavo AC, Brown RS, Wahl RL. Fluorodeoxyglucose uptake in human cancer cell lines is increased by hypoxia. *J Nucl Med* 1995;36:1625-32.
38. Minn H, Clavo AC, Wahl RL. Influence of hypoxia on tracer accumulation in squamous-cell carcinoma: in vitro evaluation for PET imaging. *Nucl Med Biol* 1996;23:941-6.
39. Clavo AC, Wahl RL. Effects of hypoxia on the uptake of tritiated thymidine, L-leucine, L-methionine and FDG in cultured cancer cells. *J Nucl Med* 1996;37:502-6.
40. 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: implications for pre-therapeutic prediction of treatment outcomes with ^{99m}Tc-sestamibi, ²⁰¹Tl chloride and ^{99m}Tc-HL91. *Eur J Nucl Med Mol I* 2002;29:1006-11.
41. Kubota R, Yamada S, Kubota K, Ishiwata K, Tamahashi N, Ido T. Intratumoral distribution of fluorine-18-fluorodeoxyglucose in vivo: high accumulation in macrophages and granulation tissues studied by microautoradiography. *J Nucl Med* 1992;33:1972-80.