



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

의학 석사학위 논문

사람 상피 세포주의 간극결합을 통한
세포간 신호전달의 기능적 연구

아주대학교 대학원

의학과

강희선

사람 상피 세포주의 간극결합을 통한
세포간 신호전달의 기능적 연구

지도교수 정 연 훈

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2007년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

강 희 선

강희선의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 박 기 현 인

심사위원 정 연 훈 인

심사위원 김 철 호 인

아주대학교 대학원

2006년 12월 22일

사람 상피 세포주의 간극결합을 통한 세포간 신호전달의 기능적 연구

세포간 간극결합(Gap junction intercellular communication)을 통한 세포간 신호전달의 체계는 매우 정교하며, 다양성을 갖는다. 이런 다양성을 발현시키며 간극결합을 구성하는 단백질인 connexin의 유전적인 발현 및 돌연변이 연구에 따르면, 간극결합을 통한 세포간 신호전달 체계가 조직의 기능과 장기의 발달에 필수적이라는 직접적 증거가 발견되었다. 특히 이비인후과 영역에서는 connexin 26, connexin 30이 deafness를 유발하는 유전질환과 연관되어 있음이 널리 알려져 있으며, 심한 중이염을 일으키는 원인중 하나인 진주종에서도 connexin의 발현이 정상 세포와는 다르다고 보고되었다. 이 연구에서는 진주종과 유사하다고 알려진 사람 상피 세포주인 HaCaT 세포주의 간극결합을 조절할 가능성이 있는 물질을 선택하였고, Acetic acid, H₂O₂, dexamethasone, Epicatechin epigallocatechin-3-gallate 와 Epicatechin, retinoic acid의 6가지 물질의 세포독성과 실험에 쓰일 적정 농도를 Neutral red uptake test를 시행하여 측정하였다. 이 결과에서 정해진 적정농도의 각 물질이 함유된 배지에서 자란 HaCaT세포주의 세포간 간극결합의 기능을 평가하기 위해, 이 세포간 결합을 통과할 수 있는 Lucifer yellow dye를 배지에 투여하면서 Scrape-loading and dye transfer 방법을 사용하여, 세포 내로 Lucifer yellow 분자를 투입시킨 후 세포간 확산이 진행된 결과를 형광현미경으로 관찰하였다. 현미경에서 사진을 촬영하여, 각 물질이 간극 결합의 기능에 얼마나 영향을 미쳤는지를 분석하여 이 물질 중에 Acetic acid (0.1%), H₂O₂ (5uM), dexamethasone (100 ug/ml)가 세포간 간극결합의 기능을 저하시켰으며, Epicatechin (50 ug/ml)이 기능을 상승 시켰음을

확인하였다. 이 연구결과를 통하여 HaCaT 세포주의 세포간 간극결합의 기능을 조절할 수 있는 물질이 진주층 치료물질로서의 적용 가능성 있음을 제시하고자 한다.

핵심어: cholesteatoma, HaCaT, gap junction, connexin, Scrape-loading and dye transfer, acetic acid, H₂O₂, dexamethasone, Epicatechin epigallocatechin-3-gallate, Epicatechin, retinoic acid

차 례

국문요약	i
차례	iii
그림 차례	iv
표 차례	v
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	3
A. 세포배양	3
B. 조절물질	3
C. 세포독성 검사	3
D. 간극결합 기능적 검사	4
1. 간극결합 기능 관찰 및 촬영	4
2. 확산거리 측정	4
3. 통계적 분석	5
III. 결과	6
A. 세포배양	6
B. 세포독성 검사	6
C. 간극결합 기능적 검사	9
IV. 고찰	14
V. 결론	17
참고문헌	18
ABSTRACT	20

그림 차례

Fig. 1. SLDT method with blade #10.	4
Fig. 2. 6가지 물질의 농도에 따른 세포 독성 측정	7
Fig. 3 SLDT method 후 각 물질에서의 확산 결과	10
Fig. 4 Lucifer yellow dye의 확산거리 측정방법	11
Fig. 5. 대조군과 각 물질 처리군의 색소 최대이동거리 비교	12

표 차례

Table1. 각 물질의 농도 설정값	9
Table2. 대조군과 각 물질 처리군의 색소 이동거리 값	12
Table 3. 세포간 신호 전달에 필수적인 구조물 및 구성 단백질	14

I. 서 론

세포간 간극결합(Gap junction intercellular communication; GJIC)은 이웃한 세포들의 세포질을 직접 연결하는 통로이며, 1 kDa이하의 저분자 물질, 즉 각종 대사물질, 이온, second messenger 등의 직접 전달이 이루어지는 곳이다. 이러한 간극결합의 독특한 특성 때문에, 세포의 항상성 유지, 분화, 성장 조절 등 다세포 생물에서 관찰되는 세포 활동에 이 간극결합이 결정적 역할을 할 것이라는 여러 이론들이 제시되었다.(Oyamada, Oyamada 등 2005) 간극결합을 이루는 단백질인 connexin(Cx)의 유전적인 발현 및 돌연변이 연구에 따르면, 간극결합을 통한 세포간 신호전달 체계가 조직의 기능과 장기의 발달에 필수적이라는 직접적 증거가 발견되었으며, 특히 이비인후과 영역에서는 connexin 26(Cx26), connexin 30(Cx30) 이 deafness를 유발하는 유전질환과 연관되어 있음이 보고되었다.(White and Paul 1999; Willecke, Eiberger 등 2002)

진주종(cholesteatoma)은 중이염의 흔한 원인 중 하나이며, 과각화(hyperproliferation) 와 상피세포의 분화(differentiation of epithelial cells)가 특징인 이과적 질환으로서, 심한 침습양상으로 인하여 중이 구조물을 파괴시키며 반드시 수술적 치료를 필요로 하지만 아직까지 진주종을 예방하거나 진행을 억제할 수 있는 약물적 치료법이 보고된 바가 없다. 하지만, 진주종에서 connexin 26(Cx26), connexin 43(Cx43)의 발현이 retroauricular skin에 비하여 증가해 있으며, 진주종에서의 connexin 발현을 억제시킬 경우 진주종의 성장을 억제할 수 있는 가능성이 있다고 최근 보고되었다.(Choung, Park 등 2006)

체외에서의 3차원적 진주종 모델에 대한 연구에서는 사람 상피 세포주의 하나인 HaCaT 세포주(spontaneously immortalized non-tumorigenic keratinocyte cell line)가 진주종에 비해 connexin 발현 정도가 낮게 나타나는 것이 보고되었다.(Fitzgerald, Fusenig 등 1994; Choung, Park 등 2006) HaCaT세포주는 배양과 약물 처리, 기능적 연구에 있어 진주종보다 수월하게 실험이 가능하다는 장점이 있으며, 진주종과 HaCaT세포주 모두 사람 상피세포에서 유래되었

으므로, HaCaT 세포주의 connexin 발현을 증가시킬 경우 진주종과 유사한 성질을 갖게 될 가능성이 있으며, 또한 HaCaT 세포주의 간극결합을 통한 세포간 신호전달에 영향을 주는 약물이 진주종에서도 같은 영향을 줄 가능성이 크므로, 배양이 용이한 HaCaT 세포주를 선택하여 실험을 진행하였다. HaCaT 세포주에 여러 약물을 처리한 후, SLDT(Scrape-loading and dye transfer) method(el-Fouly, Trosko 등 1987)를 사용하여 각 약제의 효과를 통계적으로 비교, 분석하였다.

본 연구의 목적은 HaCaT 세포주의 간극결합의 기능을 촉진하거나 억제하는 물질을 찾아내어, 차후의 진주종의 간극결합의 기능적 조절 연구 및 치료에도 적용될 수 있는 토대를 마련하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

A. 세포배양

Dulbecco's minimum essential media(DMEM)을 배양액으로 사용하여 80% confluence를 이룬 HaCaT 세포주를 이용하였다.

B. 조절 물질

실험군에 쓰인 물질은 Acetic acid (Duksan, Seoul, Korea), H₂O₂ (Duksan, Seoul, Korea), dexamethasone (Dexa-S®, Ilsung, Seoul, Korea), Green Tea Extracts(Sigma, Steinheim, Germany)로서 Epicatechin epigallocatechin-3-gallate (EGCG)와 Epicatechin, retinoic acid (Sigma, Steinheim, Germany)으로서, 임상적으로 쉽게 사용가능하거나 간극결합과 연관되어 있다고 알려진 총 6종을 선택하였다.(Ren, de Feijter 등 1994; Masgrau-Peya, Salomon 등 1997; Upham, Kang 등 1997; Kang, Kang 등 2000; Takahashi, Nomata 등 2004)

C. 세포독성 검사

Neutral red uptake test로서 살아있는 세포에만 색소를 incorporation 시킨 후에 흡광도를 측정하는 방법을 사용하였다. 6가지 약물을 각각의 농도에 맞추어 multiwell plate에 넣어 배양액과 함께 24시간 동안 세포를 배양한 후 Clean Bench에서 배양액을 제거한 뒤 0.33% Neutral Red Solution [N-2889] (Sigma, Steinheim, Germany)을 배양액 volume의 10% 되는 양과 동일하게 첨가하여 3시간 incubation 후 세포를 빨리 Neutral Red Assay Fixative [N-4270] (Sigma, Steinheim, Germany)으로 세척한 후에 dye를 배양액과 같은 양의 Neutral Red Assay Solubilization Solution [N-4395] (Sigma, Steinheim, Germany)로 녹인 후에 540nm에서 흡광도를 측정하였다. (Borenfreund and Puerner,1985)

D. 간극결합 기능적 검사

1. 간극결합 기능 관찰 및 촬영

Scrape-loading dye transfer method로서 배양된 세포군이 있는 접시에 외과용 절제 칼을 사용하여 칼자국을 낸 대조군과 실험군 각각에 Lucifer yellow (0.5%) 용액을 넣어 5분간 incubation 시킨 후(Fig. 1) PBS로 3-4회 세척한 이후에 형광 현미경(Axiovert 200, Carl Zeiss, Germany)으로 Lucifer yellow 의 세포간 확산 결과를 200배율로 관찰하며 디지털 카메라(Axiocam, Carl Zeiss, Germany)로 촬영하여 Tiff 그림 파일로 저장하였다.



Fig. 1. SLDT method. with blade #10.

2. 확산 거리 측정

ImageJ[®](National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) 1.37v 를 사용하여 저장된 그림 파일을 Grayscale로 변환한 뒤 threshold를 각 그림에서 동일한 정도로 조정하여 세포의 윤곽선을 표시한 뒤에, 이 윤곽선이 중앙선에서 멀리 떨어져 있는 지점 순서대로 각 그림마다 14곳씩 지정하여 각 지점과 중앙선 간의 거리를 inch 단위로 측정하였다.

3. 통계적 분석

SPSS® (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) 12.0을 사용하여 확산 거리의 평균, 표준편차 값을 구하고, 대조군과 실험군 간 확산 거리에 차이가 없다는 귀무가설에 대해 t -test를 시행하였다.

III. 결 과

A. 세포배양

سبق 37도의 배양기에서 100 pi dish에 배양한 HaCaT 세포를 Trypsin-EDTA 처리하여 60pi dish 8개에 같은 양으로 분할하여 옮겨 약 72시간 배양 후 각각의 dish에서 80% 의 confluence를 보일 때 실험을 진행하였다.

B. 세포독성 검사

농도를 상당량 높여도 세포독성을 관찰하지 못한 물질도 있었다.(Acetic acid, up to 2%) 세포 성장을 억제한 것으로 측정된 약물과 그 농도는 각각 H₂O₂(30uM), Dexamethasone (200 ug/ml), Epicatechin (100 ug/ml) EGCG (100 ug/ml), Retinoic acid (10⁻⁴, 10⁻⁵ M)였다. (Fig. 2)

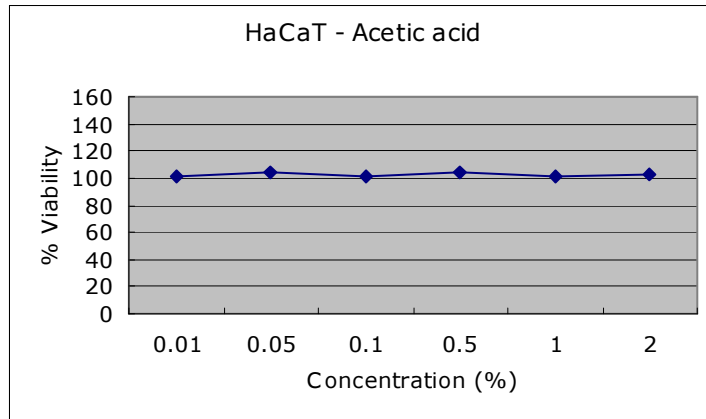


Fig. 2-1 Acetic acid 의 세포독성 결과

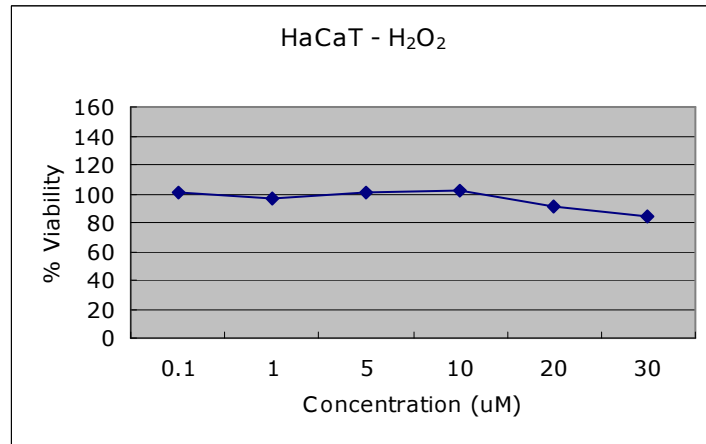


Fig. 2-2 H₂O₂의 세포독성 결과

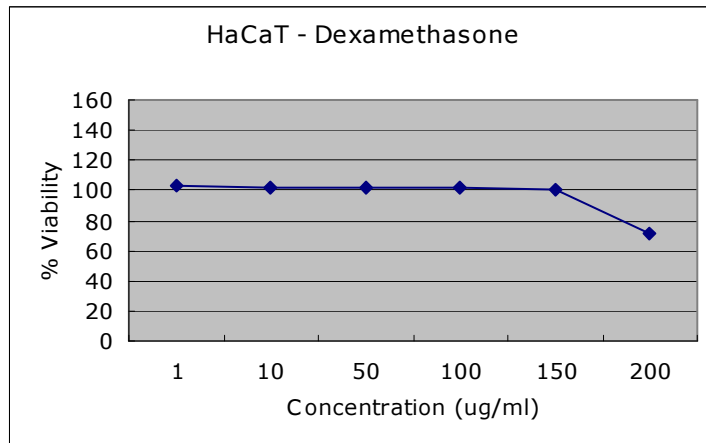


Fig. 2-3 Dexamethasone의 세포독성 결과

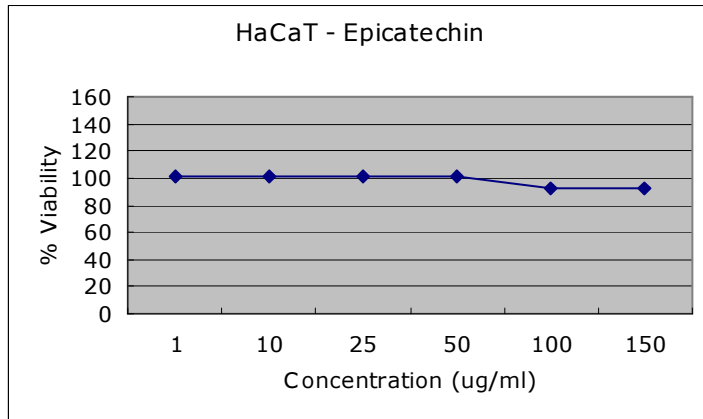


Fig. 2-4 Epicatechin의 세포독성 결과

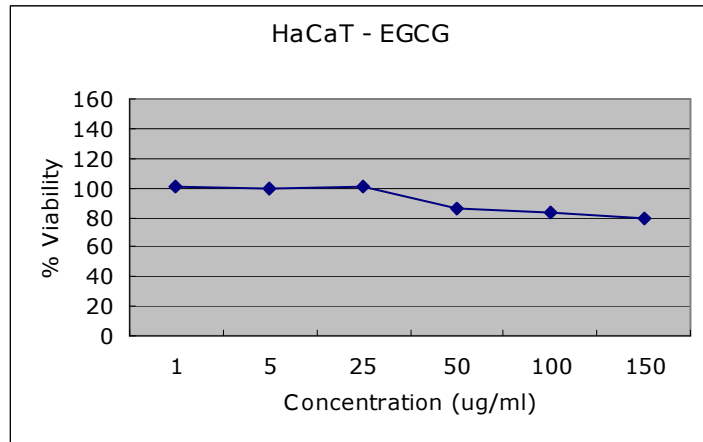


Fig. 2-5 EGCG의 세포독성 결과

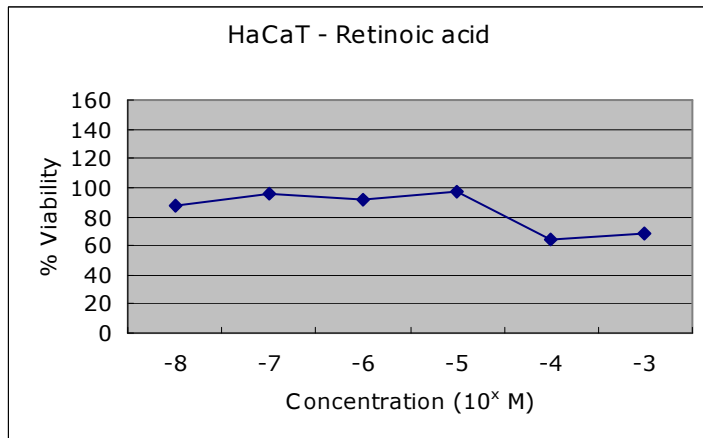


Fig. 2-6 Retinoic acid의 세포독성 결과

Fig. 2. 6가지 물질의 농도에 따른 세포 독성 측정

세포독성 검사의 결과에 따라 간극결합의 기능적 검사를 시행할 때의 각 물질의 농도를 정하였다. (Table 1) 세포독성이 나타나기 시작할 때의 농도 바로 전 혹은 그 전단계의 농도를 선택하였다. EGCG는 농도에 따른 이중효과가 있다는 기존의 보고가 있어 5ug/ml와 50ug/ml 두 가지의 농도를 선택하여 각 그룹의 이름을 EGCG5, EGCG50로 정하였다.

Group Name	Concentration
Acetic acid	0.10%
H ₂ O ₂	5uM
Dexamethasone	100 ug/ml
EGCG5	5 ug/ml
EGCG50	50 ug/ml
Epicatechin	50 ug/ml
Retinoic acid	10 ⁻⁵ M

Table1. 각 물질의 농도 설정값

C. 간극결합 기능적 검사

디지털 카메라에서 획득된 이미지는 각 실험군에서 Fig. 3과 같았다. (x200배율하 fluorescence로 촬영)

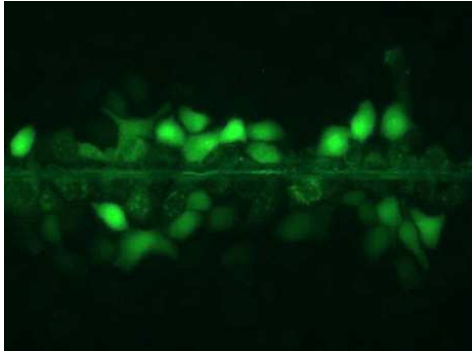


Fig. 3-1 Control

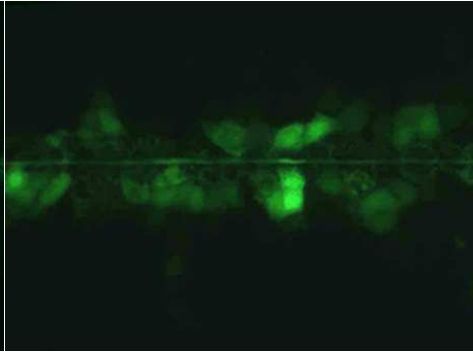


Fig. 3-2 Acetic acid 0.10%

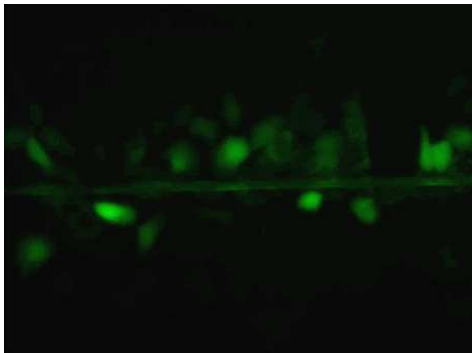


Fig. 3-3 H₂O₂ 5uM

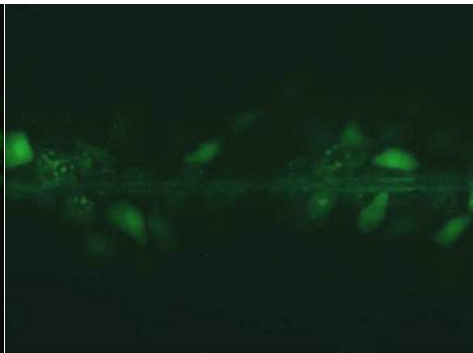


Fig. 3-4 Dexamethasone 100 ug/ml

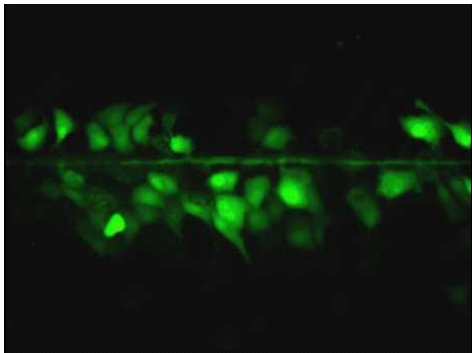


Fig. 3-5 EGCG5 5 ug/ml

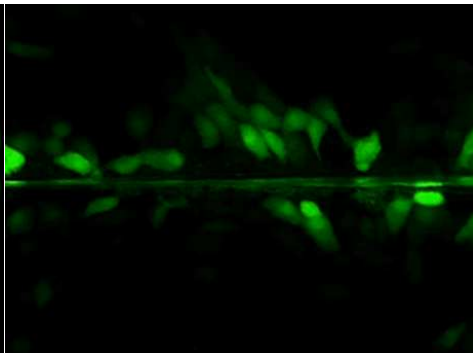


Fig. 3-6 EGCG50 50 ug/ml

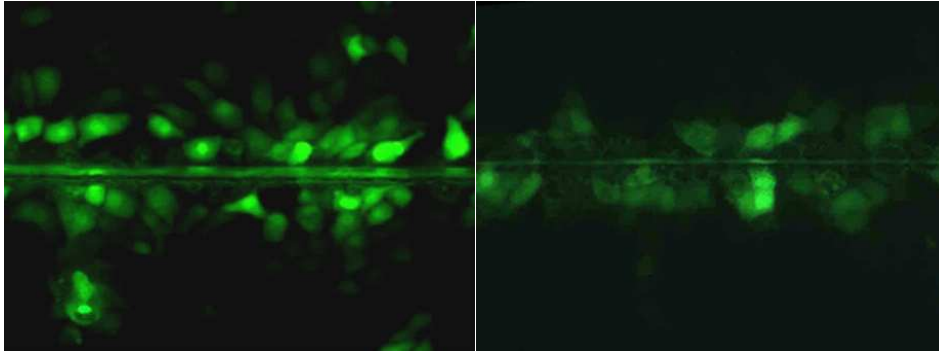


Fig. 3-7 Epicatechin 50 ug/ml Fig. -8 Retinoic acid $10^{-5}M$

Fig. 3 SLDT method 후 각 물질에서의 확산 결과

이렇게 얻어진 각 물질별, 농도별 이미지에서 간극결합간 색소 이동값을 얻어내기 위하여 ImageJ[®]를 사용하여 세포들의 윤곽선을 평가할 수 있게 threshold 값을 균일하게 지정한 뒤 수평 눈금을 적용하여 (Fig. 4)와 같이 변환한 뒤 중심선으로부터 가장 멀리 확산된 수직 거리를 14곳에서 측정하였다.

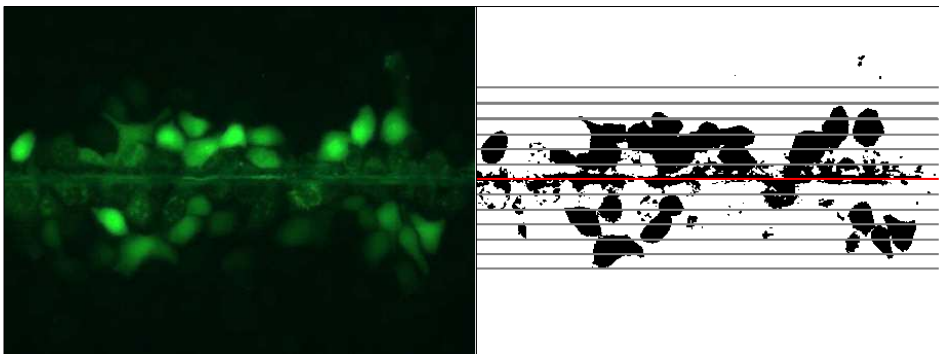


Fig. 4-1 Control 이미지 Fig. 4-2 변환된 이미지로 값 측정

Fig. 4 Lucifer yellow dye의 확산거리 측정방법

상기와 같은 측정을 통해 얻어낸 간극결합간 색소 이동 측정값은 (Table 2)와 같으며, SPSS[®]에서 *t*-test 와 Boxplot graph를 이용하여 대조군과 각 물질 처리군을 (Fig. 5)와 같이 도표화 하였다.

Table2. 대조군과 각 물질 처리군의 색소 이동거리 값

Group	Number of measurement (n)	Length of diffusion through gap junction (inch)		
		Mean (inch)	Std. deviation	t-test with control group
Control	14	0.4306	0.0735	-
Acetic acid	14	0.3405	0.0580	0.001
H ₂ O ₂	14	0.3285	0.0786	0.002
Dexamethasone	14	0.3562	0.0662	0.009
EGCG5	14	0.4548	0.1177	0.520
EGCG50	14	0.4510	0.0982	0.539
Epicatechin	14	0.6804	0.1706	0.000
Retinoic acid	14	0.4343	0.1103	0.917

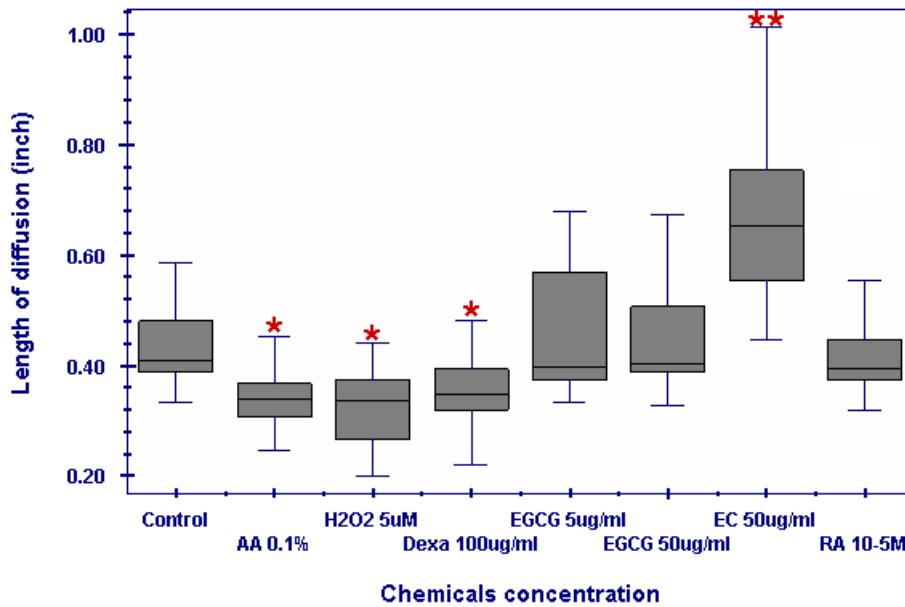


Fig. 5. 대조군과 각 물질 처리군의 색소 최대이동거리 비교
 (*: down-regulation, **: up-regulation, p<0.05)

Acetic acid, H₂O₂와 dexamethasone은 간극결합간 색소 이동의 평균값이 대조군보다 낮았으며 대조군과의 유의한 차이를 보였다.(p<0.05) Epicatechin (50 ug/ml)은 대조군보다 높은 색소이동 수치를 보이며 유의한 차이를 보여주었다. (p<0.05) 이외에 EGCG5, EGCG50, Retinoic acid group은 색소 이동 거리 평균이 대조군보다 증가하였으나, 유의한 차이를 보이지는 않았다.(p>0.05)

IV. 고 찰

세포간 신호 전달 및 세포 조직 구조의 유지를 위해 세포막 내에 존재하는 구조물에는 Gap junctions, tight junctions, adherens junctions, desmosomes, hemi-desmosomes, focal adhesions, chemical synapses 및 immunological synapses 등이 있으며 각 구조물의 주요 단백질은 Table 3와 같다. (Segretain and Falk 2004)

Table 3. 세포간 신호 전달에 필수적인 구조물 및 구성 단백질

Types of structures	Trans-membrane proteins
Gap junction	Connexins
Tight junction	Claudins
Adherens junctions	Cadherins
Desmosomes	Desmoglein and desmocollin
Focal adhesions, hemi-desmosomes	Integrins
Chemical synapses	Acetylcholine receptors and other membrane channels
Immunological synapses	MHC class I receptors

이들 단백질에는 또다시 scaffolding proteins(ZO-1등), anchor proteins (catenins, vinculin, α -actinin, plakoglobin, desmoplakin, talin등) 및 signaling proteins (focal adhesion kinase등)이 결합하여 actin, microtubule, intermediate filament network 등으로 구성되는 세포 골격 구조물에 연결되면서 복잡한 3차원 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이중에서 connexin은 비교적 간단한 “pore”일 것이라고 생각되기도 했으나 최근 연구에 따르면 여러 종류의 connexin 결합 단백질(connexin-binding proteins)들의 존재가 밝혀지고 있는 추세이다. (Segretain and Falk 2004)

포유류의 세포에서는 gap junction을 이루기 위해 두개의 hemi-channel (connexon) 이 결합하며, 이 connexon은 6개의 connexin이 결합하여 형성한다. Connexin은 25-62 kDa 정도의 크기를 가지는 20종류 정도의 isoform이 존재하

는 것으로 알려져 있으며, 한 connexon을 이루기 위해 6개의 동일하거나 (homomeric) 서로 다른(heteromeric) 종류의 connexin이 결합된다. 또한, 하나의 gap junction을 이루기 위해 동일하거나(homotypic) 서로 다른(heterotypic)종류의 connexon hemi-channel 이 만나게 되며, 이런 다양한 조합으로 인해 한 세포 내의 gap junction들 사이에서도 서로 다른 charge, size selectivity를 보이게 된다. (Evans and Martin 2002) 가능한 조합을 생각해 볼 때 최소한 20⁶ 가지 이상의 connexon heteroform 이 가능한 것을 추론해 볼 수 있다. 실제로, heterogenous한 gap junction channel이 상당한 기능적 차이를 나타낸다고 하며, voltage-dependent gating, chemical gating, channel conductance, phosphorylation-depent regulation, channel permeability-selectivity 등 미세한 환경변화에도 다양한 기능적 특징을 보여준다고 한다. (Cottrell and Burt 2005) 이번 연구에서 다양한 약물에 대해 GJIC의 기능이 변화한 것은 위의 기전들 중 어느 한 가지라기보다는 pH의 변화나 phosphorylation 정도의 변화 등 여러 가지가 함께 개입되었을 것으로 추측되며, 일례로 이번 연구의 결과에는 포함시키지 않았으나, 세포 배양 dish의 온도를 room temperature에서 섭씨 37도까지 변화시켜 보았을 때 색소 확산의 정도에 변화가 생기는 것을 관찰하였던 것으로 볼때, 온도변화도 GJIC의 기능을 변화시키는 요인 중의 하나로 보이며, 추후 이런 환경들을 더욱 엄격히 제어하는 연구가 필요할 것으로 보인다.

SLDT method을 시행할 때의 어려운 점으로서 blade를 아주 조심스럽게 다루지 않으면 cell layer가 blade에 밀리며 절개선 양측으로 floating되는 경우가 많다. 이럴 경우에는 floating layer를 이루는 세포들의 세포막에 손상이 생겨 색소분자가 많이 침투할 것으로 추정되며, 실제로 floating layer가 형광 물질에 많이 염색된 것을 관찰할 수 있어 위양성의 결과를 초래하기도 하는데 본 실험에서는 이런 결과는 이미지 촬영을 하지 않았다. 정교한 조작이 필요한 이런 방법 외에도 세포내로 색소 분자를 투입시키는 방법은 Scratch loading, bead loading, syringe loading 등이 있다고 알려져 있다.(McNeil,2003)

HaCaT cell line을 사용하여 실험한 논문에 따르면, keratinocyte 및 여러

keratinocyte-derived cell line 가운데 HaCaT 가 가장 빠른 세포 성장 속도 및 가장 많은 GJIC를 가지고 있어서 이번 실험에 가장 빨리 결과를 줄 수 있을 것으로 생각되어 이번 실험의 세포군으로 선택하였다. (Fitzgerald, Fusenig 등 1994) 물론 cholesteatoma 의 connexin 발현 정도가 reatouricular skin등에 비해 높다고 보고되었으나, cholesteatoma 의 배양이 용이하지 않아 HaCaT cell line 배양으로 대체하였다. 최근에는 배양이 까다롭다고 알려진 cholesteatoma 를 배양하는 여러 기법이 소개되고 있어, (Tanaka, Yaguchi 등 2005) 향후 cholesteatoma model 을 사용하여 세포간 간극결합의 기능적 연구를 위한 방법론에 도움이 될 것으로 보인다.

결과에서 acetic acid, hydrogen peroxide, dexamethasone 이 GJIC 의 기능을 대조군과 비교할 때 유의하게 down-regulation하였고, epicatechin이 up-regulation 시킨 것을 확인할 수 있었다. 그 외의 물질도 평균값에 있어서는 대조군과 차이를 보였으나 유의한 결과를 보여주지는 못하였다. 이 결과에 따르면, 진주종의 up-regulation되어 있는 GJIC를 acetic acid, hydrogen peroxide, dexamethasone 의 세가지 물질이 저하시켜 진주종의 성장을 저해시킬 수 있는 가능성을 제시해 준다. 하지만, 치료물질로서 바로 적용할 수는 없으며, 진주종의 체외 배양 모델에서 SLDT method등을 다시 사용하여 색소 이동의 기능적 변화를 관찰하고 차후에 임상연구를 통하여 검증받아야 할 것이다.

V. 결 론

Acetic acid, H₂O₂, dexamethasone이 HaCaT 배양세포군의 GJIC의 기능을 저하시켜 gap junction을 통한 색소 물질의 이동을 저하시키며, epicatechin은 반대로 GJIC의 기능을 향상시켜 색소의 이동을 촉진시킨다는 것을 확인하였으며, 이 물질들이 진주종의 유발 혹은 치료물질로서 추후 연구의 좋은 재료가 될 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. Borenfreund E, Puerner JA: "Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption". *Toxicology letters* 24(2-3): 119-24, 1985.
2. Choung YH, Park K, Kang SO, Markov Raynov A, Ho Kim C, Choung PH: "Expression of the gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in human middle ear cholesteatoma". *Acta Otolaryngol* 126(2): 138-43, 2006.
3. Cottrell GT, Burt JM: "Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease". *Biochim Biophys Acta* 1711(2): 126-41, 2005.
4. el-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC: "Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication". *Exp Cell Res* 168(2): 422-30, 1987.
5. Evans WH, Martin PE: "Gap junctions: structure and function (Review)". *Mol Membr Biol* 19(2): 121-36, 2002.
6. Fitzgerald DJ, Fusenig NE, Boukamp P, Piccoli C, Mesnil M, Yamasaki H: "Expression and function of connexin in normal and transformed human keratinocytes in culture". *Carcinogenesis* 15(9): 1859-65, 1994.
7. Kang KS, Kang BC, Lee BJ, Che JH, Li GX, Trosko JE, Lee YS: "Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H(2)O(2)". *Cancer Lett* 152(1): 97-106, 2000.
8. Masgrau-Peya E, Salomon D, Saurat JH, Meda P: "In vivo modulation of connexins 43 and 26 of human epidermis by topical retinoic acid treatment". *J Histochem Cytochem* 45(9): 1207-15, 1997.
9. McNeil PL. Direct Introduction of Molecules into Cells Current Protocols in Cell Biologyed., vol. Supplement 18: John Wiley & Sons, Inc., 2003.

10. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T: "Regulation of connexin expression". *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2): 6-23, 2005.
11. Ren P, de Feijter AW, Paul DL, Ruch RJ: "Enhancement of liver cell gap junction protein expression by glucocorticoids". *Carcinogenesis* 15(9): 1807-13, 1994.
12. Segretain D, Falk MM: "Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal". *Biochim Biophys Acta* 1662(1-2): 3-21, 2004.
13. Takahashi H, Nomata K, Mori K, Matsuo M, Miyaguchi T, Noguchi M, Kanetake H: "The preventive effect of green tea on the gap junction intercellular communication in renal epithelial cells treated with a renal carcinogen". *Anticancer Res* 24(6): 3757-62, 2004.
14. Tanaka Y, Yaguchi Y, Wada K, Kojima H, Moriyama H: "Creation of a cholesteatoma model using three-dimensional cultured skin equivalents". *Laryngoscope* 115(8): 1421-7, 2005.
15. Upham BL, Kang KS, Cho HY, Trosko JE: "Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells". *Carcinogenesis* 18(1): 37-42, 1997.
16. White TW, Paul DL: "Genetic diseases and gene knockouts reveal diverse connexin functions". *Annu Rev Physiol* 61(283-310), 1999.
17. Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckardt D, Romualdi A, Guldenagel M, Deutsch U, Sohl G: "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome". *Biol Chem* 383(5): 725-37, 2002.

ABSTRACTS

Functional study of Gap Junctional Intercellular Communication in Human Keratinocyte Cell Line

Hison Kahng

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Yun-Hoon Choung)

Gap junctions, unique membrane structures that mediate the intercellular communications among almost all tissues, are composed of connexins in vertebrate. The essential role of gap junction-mediated intercellular communications(GJIC) for coordination of cell homeostasis, tissue functions and organ development are well reported by many researches using genetics and mutant studies. Mutations of connexin 26 and connexin 30 have been linked to deafness. In human middle ear cholesteatoma, upregulated expression of both connexin 43 and connexin 26 were observed compared to those in normal human skin. In this study, spontaneously immortalized non-tumorigenic and a highly differentiating keratinocyte(HaCaT) cell line was used to find substances that can change the GJIC function via functional study using scrape-loading dye transfer(SLDT) method. Toxic drug level of acetic acid, H_2O_2 , dexamethasone, Epicatechin epigallocatechin-3-gallate, Epicatechin and retinoic acid were assessed by Neutral red uptake test. The adequate concentration of these six material was determined and added to the

culture medium of the HaCaT cell line. Scrape-loading dye transfer method was used to compare the functional aspect of GJIC in the different condition, By this method, fluorescent Lucifer yellow dye was introduced into the HaCaT cells and observed by the fluorescence inverted microscope. Captured images were analysed with image software and as a result, acetic acid, hydrogen peroxide, dexamethasone have down-regulated and epicatechin have up-regulated the GJIC function showing statistically significant difference($p < 0.05$) of the mean diffusion length of Lucifer yellow dye compared to that of the control group. The discovery of these substances will lead to the success of the medical treatment of cholesteatoma.

Key words: cholesteatoma, HaCaT, gap junction, connexin, Scrape-loading and dye transfer, acetic acid , H_2O_2 , dexamethasone, Epicatechin epigallocatechin-3-gallate, Epicatechin, retinoic acid