

# 발암물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 Connexin 발현 억제에 대한 녹차 추출물의 예방효과

아주대학교 의과대학 이비인후과학교실

최 성 준 · 정 연 훈

## Preventive Effect of Green Tea Extracts on the Inhibition of Connexin Expression Induced by Carcinogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Seong Jun Choi, MD and Yun-Hoon Choung, DDS, MD, PhD

Department of Otolaryngology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

### ABSTRACT

**Background and Objectives** : Carcinogens result in the impairment of intercellular communication as well as intracellular communication of normal cells. Connexin (Cx) is a main constituent protein of gap junctions that let messengers such as ions communicate between cells. We evaluated the effect of carcinogen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the expression of Cxs and gap junction intercellular communication (GJIC) in the human keratinocyte cell line (HaCaT) and analyzed the prevention effect of green tea extracts against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Materials and Method** : We performed neutral red dye uptake tests to determine the optimal concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, green tea extracts-epicatechin (EC) and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in this study. To analyze the expression change of Cxs, we performed RT-PCR, Western blot, and immunocytochemistry after 24-hour culture of HaCaT cells treated with agents. We also evaluated GJIC quantitatively using the 'scrape loading dye transfer (SLDT)' technique. **Results** : Cx26, Cx30, Cx31, Cx43, but not Cx29 were expressed in the HaCaT cells. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (250 uM) down-regulated Cx26 and Cx43 proteins. In HaCaT cells treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EC (175 uM) up-regulated Cx26 and Cx43 proteins, but EGCG (50 uM) up-regulated only Cx43 protein. Immunocytochemistry showed the decreased expression and abnormal location of Cx26 and Cx43 under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and EC and EGCG (5 uM) inhibited the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, showing similar staining in the control. In SLDT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> down-regulated GJIC, while EC and EGCG significantly prevented HaCaT cells from the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced, down-regulation of GJIC. **Conclusion** : The carcinogen, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, inhibits GJIC in the keratinocyte cell line. Green tea extracts, such as EC and EGCG, prevent GJIC inhibition in the keratinocyte cell line treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggesting they have a potential anti-cancer properties. (Korean J Otorhinolaryngol-Head Neck Surg 2008;51:355-62)

**KEY WORDS** : Tumor · Connexin · Green tea · Gap junction · H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · Carcinogen.

## 서 론

간극결합(gap junction)은 인접세포 간의 직접적인 정보 교환의 통로로서 일반적으로 비특이적, 수동적 확산에 의해 물질의 이동이 이루어지는 곳이다. 물질의 크기에 따라 비교적 선택적으로 cAMP, inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3)와 같은 1,000 Da 이하의 작은 물질이나 Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 등의 비유기 이온을 통과시키고, 반면에 단백질이나 핵산의 이동은 못하게 한다.<sup>1,2)</sup> 이러한 작은 정보 물질, 즉 second messengers의 이동에 의해 세포는 상호 정보교환

논문접수일 : 2007년 10월 30일 / 심사완료일 : 2008년 1월 15일  
교신저자 : 정연훈, 443-721 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5번지  
아주대학교 의과대학 이비인후과학교실  
전화 : (031) 219-5263 · 전송 : (031) 219-5264  
E-mail : yhc@ajou.ac.kr

을 하게 되고, 이를 통해 각 기관 및 조직의 발생, 분화 및 발육을 조절하고, 그 정상 기능을 발휘하게 된다.<sup>3,4)</sup> 간극결합을 구성하는 기본 단백이 connexin(Cx)이며, connexin 6개가 모여서 connexon이라는 hemi-channel을 만들고, 인접세포의 hemi-channel 2개가 만나서 간극결합 통로를 완성하게 된다.<sup>2)</sup> 현재까지 약 20여 종 이상의 Cx이 보고되었고 이들은 종 특이성 및 조직 특이성을 보여서 그 분포의 형태가 종과 조직에 따라 다양하다.<sup>2)</sup>

Cx 발현의 이상은 간극결합의 구조 및 기능 장애를 만들게 되고, 이는 간극결합을 통한 세포 간 신호전달(gap junctional intercellular communication, GJIC)의 장애를 초래함으로써 여러 가지 병적상태를 만들게 된다.<sup>2)</sup> 즉, 정상 조직의 급만성 질환을 초래하고, 난청 또는 피부 이상을 보이는 유전성 질환을 만들기도 하고, 세포의 비정상적 성장

과 암세포 성장에도 관여한다.<sup>1-6)</sup> 실제 in vitro, in vivo 연구에서 암유발 물질에 의해 Cx의 발현 및 간극결합 간 신호전달의 감소를 확인하였고, 암억제 물질에 의해 이들의 발현이 항진되는 것을 보고한 이래 Cx을 암억제 유전자(tumor suppressor gene)로 생각하고 있다.<sup>5-7)</sup>

이러한 암세포 성장과 Cx의 관련성을 고려할 때, 간극결합 단백질 Cx의 발현 조절은 세포 간 신호전달에 영향을 미치는 것으로 결국 세포의 성장과 분화를 조절할 수 있다. 즉, 양성질환을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 발암물질에 의한 암세포화 과정을 억제 또는 차단할 수 있다. 이러한 간극결합 조절 물질로는 현재 여러 물질들이 보고되고 있다.

그 중 하나가 녹차 추출물이다. 녹차는 catechin이라 불리는 polyphenol을 함유하고 있으며, 대표적 성분이 epigallocatechin-3-gallate (EGCG)이며, 그 외 epicatechin, epicatechin gallate 등이 있다.<sup>8)</sup> 이러한 녹차 성분이 in vitro 및 in vivo 실험 등을 통하여 발암과정에서 간극결합 억제 예방효과가 있으며, 항암효과가 있다는 보고들이 있다.<sup>9,10)</sup>

두경부 영역에서의 악성종양의 주종은 상피세포에서 유래된다. 사람 상피의 주요한 간극결합 단백질은 Cx26과 Cx43으로 알려져 있고, Kamibayashi 등이 기저세포암, 편평상피세포암에서 Cx26, Cx43은 거의 발현되지 않고, 일부 Cx만이 비정상적으로 세포질내에 존재한다고 보고한 바 있다.<sup>11)</sup> 하지만 아직 상피세포를 이용한 발암물질에 의한 암 발생 과정에서 Cx의 변화 및 간극결합 세포간 신호전달의 이상을 자세히 고찰한 문헌은 거의 없는 실정이다.<sup>12)</sup>

저자들은 두경부 종양이 다른 부위의 암보다 담배, 술 등의 외부자극이 중요한 것을 고려할 때, 발암 유도물질의 외부자극이 정상 상피세포의 Cx의 발현 및 기능 변화를 초래할 것이며, 이러한 Cx 발현을 조절하는 물질을 통하여 항암 효과를 낼 수 있을 것으로 가정하였다. 따라서 본 연구는 정상상피 세포주를 이용하여 발암물질을 자극하였을 때의 Cx 발현 변화를 분자생물학적 관찰을 통하여 입증하고 이러한 변화가 실제 간극결합 세포간 신호전달에 어떻게 영향을 미치는지를 기능적으로 평가하며, 아울러 녹차추출물을 이용하여 이에 대한 예방효과를 분석하는 데 그 목적이 있다.

## 재료 및 방법

본 연구는 사람의 정상 각화상피 세포주인 HaCaT 세포 (spontaneously immortalized non-tumorigenic and highly differentiating keratinocyte cell line)를 이용하여 1) 세포독성 검사를 시행하여 발암물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 녹차추출물의 적절 농도를 결정하였고, 2) 역전사중합반응을 통하

여 HaCaT 세포주의 Cx mRNA의 발현을 확인하였으며, 3) Western blot을 통하여 Cx 단백질의 변화를 확인하였다. 4) Cx 단백질의 발현량 변화와 세포내 위치변화를 확인하기 위해 면역세포화학염색을 시행하였고, 5) 간극결합 간 세포 간 신호전달을 기능적으로 평가하기 위하여 Scrape loading dye transfer (SLDT) 실험을 시행하였다.

## 세포주 배양

HaCaT 세포를 Dulbecco's minimum essential medium (DMEM)을 이용하여 37°C에서 95% air와 5% CO<sub>2</sub>를 포함한 가슴 기압에서 배양하였다. 세포는 35 mm 조직배양 접시에서 배양하고 2일마다 배지를 교체하였고, 실험은 세포의 포화도(confluence)가 80% 이상된 경우에 실시하였다. 발암자극 물질로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Duksan, Seoul, Korea)를 사용하였고, 녹차 추출물로는 epicatechin (EC), epigallocatechin-3-gallate (EGCG)를 사용하였으며 Sigma (Steinheim, Germany)사에서 구입하였다.

## 세포독성검사(Neutral red uptake assay)

Neutral red based in vitro toxicology assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 이용하여 세포독성을 정량적으로 분석하였다. HaCaT 세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EC, EGCG를 각각 다양한 농도별로 첨가하며, 약물이 첨가된 세포주를 배양기에서 꺼내어 0.33% neutral red 용액과 10% 배양배지에 넣고 2시간 동안 배양하였다. Neutral red assay 고정액에 넣고 세척한 다음 neutral red solubilization 용액에 넣고 10분간 배양하였다. Spectrometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다. 흡광 정도에 따라 정량적으로 분석하여 비교하였는데 3회를 실시하여 평균하였다.

## 역전사 중합반응(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 실험

사람 상피세포에 분포하는 것으로 알려진 Cx26, 29, 30, 31, 43의 발현을 분석하였다. 다음의 PCR primer를 이용하여 PCR을 시행하였다.

Cx26(725bp) Up : 5'-TGT-TTT-CCA-GAG-CAA-ACC-GC-3', Down : 5'-CTG-GGC-AAT-GAG-TTA-AAC-TGG-3', Cx29(700 bp) Up : 5'-GCC-TCC-ACC-ACT-GAC-AAT-3', Down : 5'-GCC-TAT-GTG-GCA-CAC-CCT-3', Cx30(600 bp) Up : 5'-GCA-GCA-TCT-TTT-TCC-GAA-TC-3', Down : 5'-ATG-CTC-CTT-TGT-CAA-

GCA-GT-3', Cx31(660 bp) Up : 5'-ATG-GAT-TGG-AAG-AAG-CTT-CAG-3', Down : 5'-TTA-AAT-GGG-GGT-CAG-GCT-AGG-3', Cx43(294 bp) Up : 5'-TAC-CAT-GCG-ACC-AGT-GGT-GCG-CT-3', Down : 5'-GAA-TTC-TGG-TTA-TCA-TCG-GGG-AA-3.

각각의 primer 1  $\mu$ l, template 1  $\mu$ l, 10x PCR buffer 2  $\mu$ l, dNTP 1  $\mu$ l, 10xTaq buffer 2  $\mu$ l, 증류수 14  $\mu$ l로 구성된 reaction mixture에 Taq DNA polymerase(QIAGEN) 0.2  $\mu$ l를 넣고 94°C 1분, 58°C 1분, 72°C 1분으로 35 cycles 시행하고 72°C 8분, 94°C 4분 시행하였다. 이를 agarose gel에 걸어서 발현을 비교하였다. HaCaT 세포주를 24시간 배양한 후에 위의 방법으로 RT-PCR을 시행하였다.

#### Western blot을 이용한 Cx26과 Cx43의 발현분석

Western blot은 일반적인 방법으로 Cx26과 Cx43에 대해서 시행하였다. 세포주를 아연 이온이 포함된 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 뒤 50 mM Tris-Cl(pH 7.4), 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride와 단백분해 효소 억제제(Complete, Boehringer-Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)를 포함한 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) buffer에 세포주를 넣고 5분간 100°C로 반응시켰다. 상층액을 새 튜브로 옮긴 뒤 Bio-Rad protein assay를 사용하여 단백질 내용물을 표준화시켜 각 샘플의 50~100  $\mu$ g를 4x sample buffer를 처리한 후 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel을 이용한 전기영동으로 분석하였다. 단백질을 poly-vinyl difluoride(PVDF) membrane으로 이동시킨 후 mouse anti-Cx43 monoclonal antibody(Zy-med, CA, USA)와 rabbit anti-Cx26 polyclonal antibody(Zy-med, CA, USA)로 처리하였다. 이후 horseradish peroxidase-conjugated goat antimouse/antirabbit IgG antibody를 사용하여 면역반응성 띠가 나타나는 것을 확인하였다. 단백질 발현량의 정량적 평가를 위하여 Adobe Photoshop 7.0 프로그램을 이용하여 반응성 띠의 density를 측정하였다. 이를 SPSS® 12.0으로 Student t-test 통계 처리를 하였으며,  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

#### 면역세포화학반응검사를 이용한 Cx26과 Cx43의 발현분석

24시간 약물 처리한 세포주의 배양액을 제거한 후 4% paraformaldehyde로 20분간 고정하였다. PBS로 2회 세

척 후 0.15% triton X-100(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 10분간 상온에서 처리하여 항체가 세포막의 구멍을 통해 일시적으로 투과되도록 하였다. 세포주를 PBS로 희석한 2% BSA(bovine serum albumin), 0.1% tween 20으로 상온에서 30분 동안 처리하여 blocking을 실시하고, PBS로 2회 세척하였다. 세포주를 rabbit polyclonal anti-connexin 26 antibody(Zy-med, CA, USA)와 mouse monoclonal anti-connexin 43 antibody(Zy-med, CA, USA)로 하루를 반응시켰다. 이것에 1.5 mg/ml 농도의 FITC(fluorescein isothiocyanate)-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody와 Texas red-conjugated goat anti-mouse IgG secondary antibody(Jackson Immunoresearch, Pennsylvania, USA)를 각각 1 : 200으로 희석하여 50  $\mu$ l씩을 Cx 26과 Cx 43 부위에 각각 섞고 이중염색을 시행하였다. 어두운 곳에서 1시간 성숙시키고 PBS로 10분씩 3회를 세척한 뒤, 이를 Confocal microscope(LSM510, Carl Zeiss Meditec, Jena, Germany)를 이용하여 관찰하였다.

#### 기능적 연구 : Scrape loading dye transfer(SLDT) assay

간극결합을 통한 세포 간 신호전달의 기능을 분석하기 위해서 1987년 El-Fouly 등이 제시한 SLDT 방법을 사용하였다.<sup>13)</sup> 배양세포를 PBS로 2회 세척한 후 0.5% Lucifer yellow를 넣고 #20 수술용 칼로 칼자국을 내고, 이후 10분간 배양기에 넣어둔 후 Lucifer yellow 용액을 제거하고 PBS로 1회 세척하였다. 4% paraformaldehyde로 고정된 후 형광현미경(Axiovert 200, Carl Zeiss, Germany)으로 lucifer yellow의 세포 간 이동을 관찰하였다. 형광현미경 사진을 ImageJ®(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) 프로그램을 이용하여 gray scale로 변환한 뒤 역치(threshold)를 각 그림에서 동일한 정도로 조정하여 세포의 윤곽선을 표시한 뒤, 이 윤곽선이 중앙선에서 멀리 떨어져 있는 지점 순서대로 각 그림마다 14곳씩 지정하여 각 지점과 중앙선 간의 거리를 (inch $\times$ 100) 단위로 측정하였다. 염색의 세포 간 이동거리를 자료로 SPSS® 12.0으로 Student t-test 통계처리를 하였으며,  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

#### 세포독성 검사(Neutral red uptake assay)

Neutral red uptake 검사는 살아 있는 세포만 vital dye neutral red를 함유할 수 있는 성질을 이용하여 세포독성

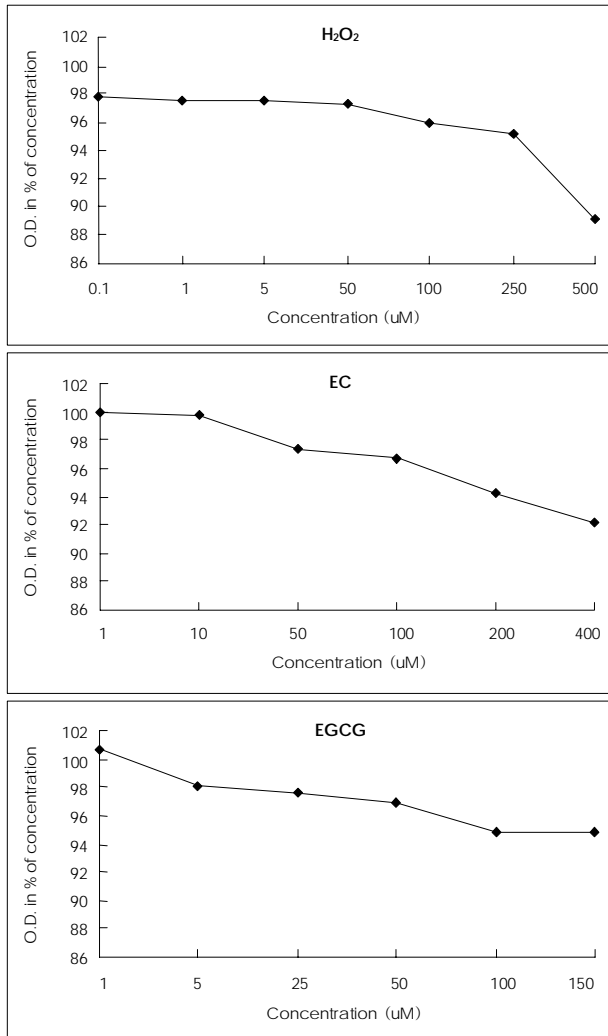


Fig. 1. Neutral red uptake assay. After 24-hour culture, the maximal nontoxic concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, EC, and EGCG were found to be 10 ng/ml, 175 μM, and 50 μM, respectively.

여부를 확인하는 실험이다. HaCaT 세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 녹차 추출물 EGCG, EC를 각각 여러 농도로 처리한 뒤 24시간 배양한 뒤 neutral red dye uptake 정도를 평가하였다. 약물의 영향을 보이면서 세포 간 신호전달 실험을 시행하기 위한 적절농도로서 세포를 최소 95% 이상 생존시킬 수 있는 최대 농도로 결정하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 250 uM, EC는 175 uM, EGCG는 50 uM로 결정하였다(Fig. 1). 단 EGCG는 농도에 따라 세포 성장 촉진 및 사멸 자극의 두 가지 작용(dual action)이 동시에 있을 수 있다는 보고<sup>15)</sup>에 따라 면역세포화학검사와 기능적 연구에서는 5 uM과 50 uM로 시행하였다.

#### Cx mRNA의 발현

HaCaT 세포주를 이용한 RT-PCR에서 Cx26, Cx30,

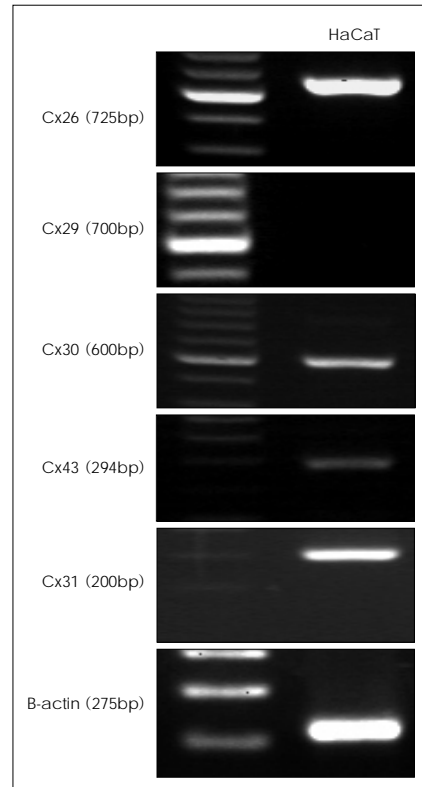


Fig. 2. RT-PCR of Cxs. HaCaT cells showed Cx26, Cx30, Cx31, Cx43 mRNAs, but not Cx29.

Cx31, Cx43의 mRNA 발현이 관찰되었고 Cx29는 전혀 발현되지 않았다(Fig. 2).

#### Western blot을 이용한 Cx26, Cx43 단백질 발현 비교

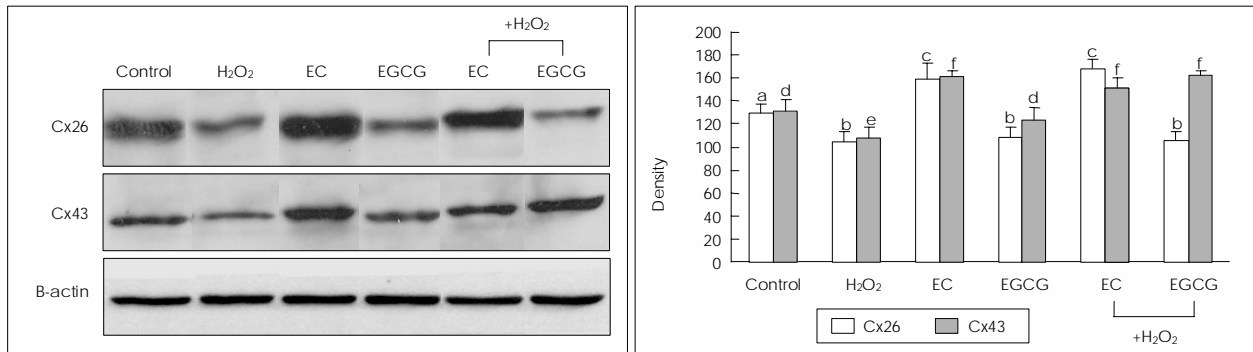
상피세포의 대표적인 간극결합 단백질로 Cx26과 Cx43 단백질 발현을 비교 분석하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 HaCaT 세포주의 경우 Cx26과 Cx43의 단백질 발현이 정상 대조군에 비해 현저히 감소하였다. EC만을 처리한 경우는 정상 대조군에 비해 Cx26과 Cx43 단백질 발현이 많이 증가되었으나 EGCG의 경우는 Cx26은 감소하였으며, Cx43은 대조군과 유사하였다. 한편, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포주에 EC를 같이 첨가한 경우는 Cx26과 Cx43 단백질 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독 처리한 경우보다 통계적으로 유의하게 증가하였고, EGCG를 같이 첨가한 경우는 Cx43만 통계적으로 증가하였다(Fig. 3). 즉, 녹차추출물 EC와 EGCG가 발암물질 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Cx26, Cx43 단백질량 감소를 방지하는 효과가 있었으며, 특히 EC가 더 효과적이었다.

#### 면역세포화학염색(Immunocytochemistry)

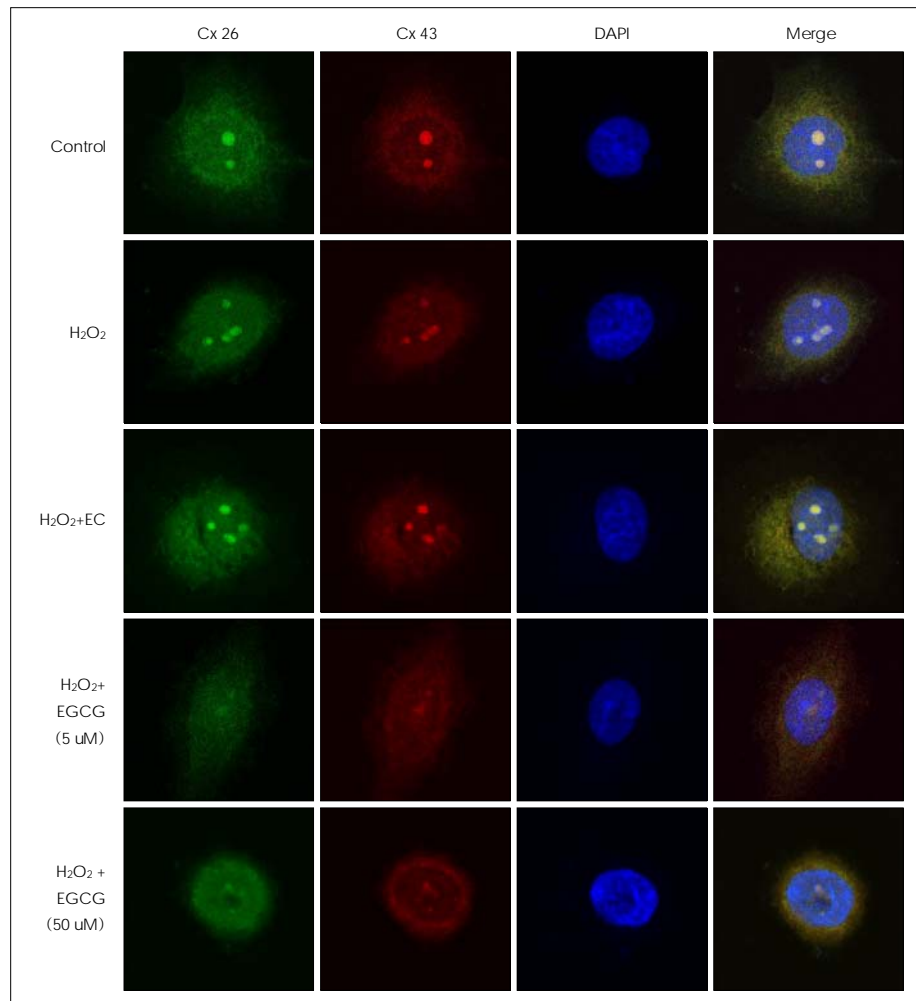
Cx26과 Cx43에 대한 면역세포화학염색을 Confocal microscope으로 관찰하였다. Cx는 세포질내 소포체에서 생

성되어 세포막으로 이동하여 주로 그 발현이 세포막에 분포하는데, HaCaT 세포주의 경우 Cx의 발현이 많아 세포막뿐만 아니라 세포질내에서도 잘 관찰되었다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 경우에는 Cx의 발현이 감소하면서 핵주변에 밀집되는 양상으로 세포막으로의 이동이 저하되는 양상을 보였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

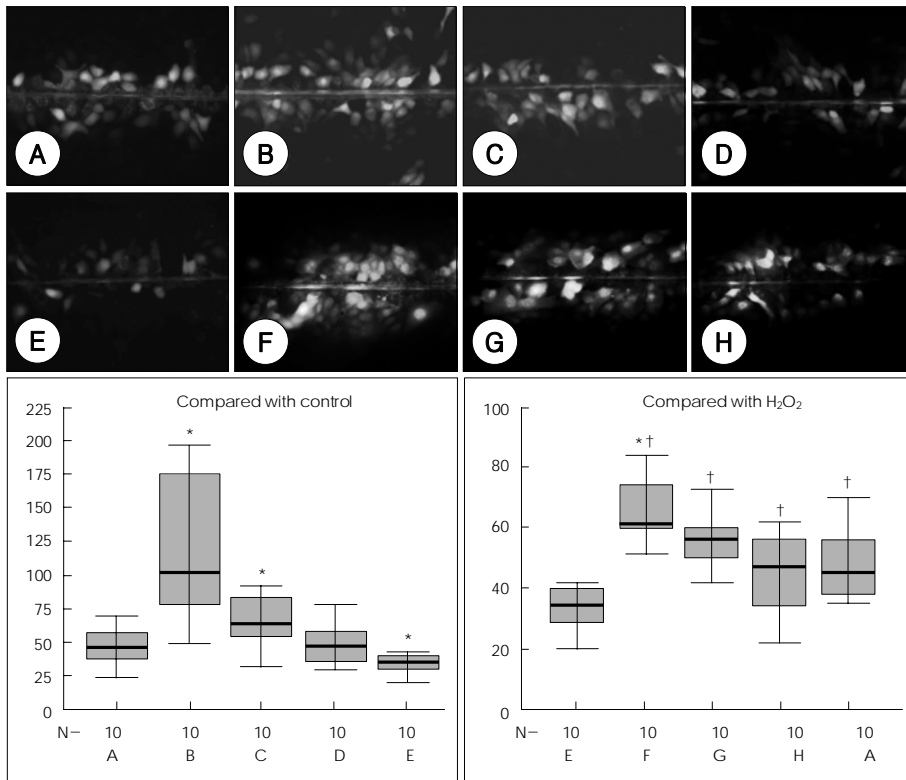
를 처리한 세포에 EC 또는 EGCG 5 uM을 같이 첨가한 경우는 거의 정상 대조군 세포의 모습으로 Cx 발현이 회복된 양상이었으나, EGCG 50 uM을 같이 첨가한 경우는 Cx 발현이 EGCG 5 uM만큼 효과가 분명치 않고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리한 세포의 양상과 유사하였다(Fig. 4).



**Fig. 3.** Western blot of Cx26 and Cx43. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> down-regulated Cx26 and Cx43 proteins. But, EC and EGCG (50 uM) prevented HaCaT cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced down-regulation of Cx26 and Cx43. Lower graph shows the quantitative analysis of Cx26 and Cx43 proteins. 'a-f' in lower graph means that protein volumes are significantly different among the different characters (Student's t-test,  $p < 0.05$ ) but not different among the same characters ( $p > 0.05$ ).



**Fig. 4.** Immunocytochemistry of Cx 26 and Cx43 (Confocal image,  $\times 400$ ). Immunocytochemistry of HaCaT cells showed decreased expression and abnormal location (around nucleus) of Cx26 and Cx 43 under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> compared with control. EC and EGCG 5 uM prevented the effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on HaCaT cells, showing very similar appearance as that in control. While EGCG 50 uM showed the weak preventive effect against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Fig. 5.** Scrape Loading Dye Transfer (SLDT). A : Control. B : EC. C : EGCG 5 μM. D : EGCG 50 μM. E : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. F : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EC. G : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+ EGCG 5 μM. H : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+EGCG 50 μM. Upper figures show the dye transfer through gap junctions under several conditions (× 200). Lower figures showed statistical analysis. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> down-regulated intercellular communication (Lucifer Yellow transfer), while EC and EGCG (5 μM, 50 μM) up-regulated it on HaCaT cells. And both EC and EGCG (5 μM, 50 μM) inhibited the down-regulation effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. \*student's t-test, p< 0.05 comparing with control, †p< 0.05 comparing with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The measure of Y-axis=inch × 100, Box with midline means a standard deviation with average. Upper and Lower bars means the range of the data.

세포간 신호전달 확인을 위한 기능적 연구 : Scrape loading dye transfer(SLDT)

SLDT 실험은 8회에 걸쳐 시행하였고, 각 샘플의 그림을 여러 장 찍은 뒤 최소 20개 이상의 일정 dye transfer 구역을 임의로 설정하여 dye transfer 길이를 측정하였다. 정상 대조군에서는 lucifer yellow dye가 일반적으로 3~5개 인접세포로 전달되었다. 반면 EC은 control보다 통계적으로 유의하게 인접세포 4~8개까지 dye transfer가 이루어졌으며, EGCG는 정상 대조군과 유사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 세포간 신호전달을 통계적으로 유의하게 감소시켰고, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포에 녹차추출물 EC, EGCG를 각각 같이 처리한 경우에는 첨가하지 않은 경우보다 세포 간 신호전달이 효과적으로 예방되는 것을 확인할 수 있었다. 그런데 EGCG의 경우 저농도(5 μM)가 고농도(50 μM)보다 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대하여 더 효과적인 예방 효과를 보였다(Fig. 5).

고 찰

어떤 조직이나 기관이 정상적으로 분화하고 기능하기 위해서는 정상적인 세포내 신호전달뿐만 아니라 세포간 신호전달이 필수적이다. 세포간 신호전달은 간극결합을 통하여 주로 이루어지는데, 주 단백질 Cx의 구조 및 기능변화에 따라 여러 가지 질환을 초래할 수 있다. 대표적인 것이

Cx26 변이에 따른 선천성 난청으로, 내이의 organ of Corti에서 K<sup>+</sup> 재순환에 필수적인 간극결합의 기능손상으로 청각유모세포의 손상을 초래하여 난청을 발생한다.<sup>1)</sup> 또한 건선(psoriasis), 유두종(papilloma) 등 피부질환과 이비인후과 귀질환인 진주종은 상피세포가 악성세포는 아니지만 비정상적으로 과성장하는 질환으로서 간극결합 Cx이 과발현되는 양상을 보인다고 알려져 있다.<sup>3)</sup>

한편, 암세포에서는 이런 양성 상피질환에서의 Cx 과발현과는 달리 간극결합 단백질의 발현이 감소된다.<sup>5-7)</sup> 기저세포암, 편평상피세포암에서 Cx26, Cx43은 거의 발현되지 않고, 일부 Cx만이 비정상적으로 세포질내 존재한다고 한다.<sup>11,12)</sup> Cx26은 종양 발생의 class II 암억제 유전자(tumor suppressor gene)로 알려져 있으며, Cx43도 암발생 과정에서 과인산화되어 간극결합 사이의 세포간 신호전달이 억제된다고 한다.<sup>15)</sup> 또한 암세포의 이상 증식, 침습, 전이 등 암의 진행 정도는 상피암의 다단계 발생 시 Cx 발현의 양적, 질적 감소와 관련이 있다.<sup>5,6)</sup>

이러한 암을 포함한 여러 질환에서 간극결합의 발현을 조절할 수 있다면 그 기능을 정상화하거나 조절할 수 있을 것이다. 즉, 간극결합 단백질 Cx의 발현 조절은 세포 간 신호전달을 조절하는 것으로 결국 세포의 성장과 분화를 조절할 수 있다. 악성종양인 경우는 간극결합 조절을 통하여 발암물질에 의한 암세포화 과정을 억제할 수 있을 것이다.

간극결합 발현 상승 및 세포 간 신호전달을 촉진(up-regulation)하는 물질로는 vitamin D, 은행엽, 녹차, retinoic acid, phobol ester, epidermal growth factor, lycopene, high  $Ca^{2+}$  등이 있다.<sup>15)</sup> 한편 간극결합의 세포 간 신호전달을 억제(down-regulation)하는 물질로는 low  $Ca^{2+}$ , steroid, zinc 등이 있고  $H_2O_2$ , 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), 1,1-bis(p-chloropheny)-2,2,2-trichloroethane (DDT) 등 발암물질이 있다.<sup>15,16)</sup>

그 발암물질 중 본 연구에서는  $H_2O_2$ 를 사용하였는데, 아직까지  $H_2O_2$ 에 의한 정상 상피세포에서의 간극결합 발현에 대한 영향은 보고된 바가 없다.  $H_2O_2$ 는 reactive oxygen species (ROS)를 생성함으로써 암발생 초기 과정(promotion phase)에 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>16)</sup> 생성된 ROS가 세포 내 신호전달과 간극결합 간 신호전달에 영향을 미치므로 세포의 변형을 가져오는데, 이러한 과정은 가역적일 수 있어 차단이 가능하다.<sup>17)</sup> 특히 두경부 영역의 상피세포암의 원인 중 하나가 담배, 술 등의 외부자극을 고려할 때, ROS 생성에 따른 세포 간 신호전달 감소의 기전을 이해하는 것은 중요하다.

한편, 암을 억제하거나 예방할 수 있는 자연물질의 발견에 최근 관심이 높다. 그 중 하나가 일상적으로 마시는 녹차이다. 녹차는 EGCG, EC, epicatechin gallate 등 catechin이라 불리는 polyphenol을 함유하고 있으며, 항산화 작용, 항암효과가 있는 것으로 보고되고 있다.<sup>10,14)</sup> 그 중 EGCG는 녹차성분의 약 50%를 차지하는 것으로 urokinase-type plasminogen activator (UPA) 처리과정을 억제시켜 암세포에서 항진되는 MMP-2, MMP-9 등의 matrix metalloproteinase를 억제시키는 것으로 알려져 있다.<sup>18)</sup> 보고에 의하면 EGCG가 신장세포에서, EC가 간세포에서 발암물질에 의하여 간극결합 세포 간 신호전달이 억제되는 것을 방지한다고 한다.<sup>15,19)</sup>

간극결합 단백질 Cx의 발현은 여러 단계에서 조절될 수 있다. 전사(transcription), RNA 처리(processing), RNA 이동(transport and localization), 전역(translation), mRNA 분해, 그리고 단백질활성(protein activity) 등 DNA에서 RNA를 거치는 과정 6단계 모두에서 일어날 수 있다.<sup>20)</sup>

본 연구에서  $H_2O_2$ 는 간극결합 단백질 생성의 과정에서 단백질량의 감소를 보였지만, 아주 현저한 차이를 보이지는 않았으며, 면역세포화학검사에서 Cx의 세포막으로의 이동(trafficking)이 완전 차단되는 양상을 보이지는 않았다. 이는 다른 발암물질의 결과와는 다른 것으로, 본 연구에서는 간극결합 기능검사를 위하여 세포의 적절한 생존을 유지하기 위하여  $H_2O_2$ 의 농도를 높게 설정하지 않은 이유와  $H_2O_2$

가 다른 간극결합 손상 기전을 가진 것에 기인한다고 추측할 수 있다. 실제 본 연구의 SLDT 기능적 실험에서는 세포 간 신호전달이 통계적으로 유의하게 정상 대조군에 비해 감소됨을 보였다. 이는  $H_2O_2$ 가 전사 및 전역과정에서의 손상이 미약하더라도 전역 후 억제(posttranslational inhibition)를 보이는 것으로 세포막에서의 hemi-channel 결합과정이나 다른 요소와의 기능적 결합이 잘 안되었을 가능성이 있다.

본 연구에서 이러한  $H_2O_2$ 의 Cx 발현 감소 및 세포 간 신호전달 감소를 녹차추출물이 예방하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, EC이 EGCG보다 효과적이었는데 전사단계에서부터 예방을 하며 결국 간극결합의 기능을 정상적으로 유지케 하는 것으로 보여진다. 하지만 녹차의 주성분(50% 이상을 차지)인 EGCG는 농도에 따라 약간 다른 양상을 보이는 것 같았다. 본 연구에서 Western blot에서 EGCG 50  $\mu$ M로 시행한 경우  $H_2O_2$ 에 대한 예방효과가 EC만큼 좋지 않았음을 확인하였고, 면역세포화학검사와 SLDT에서는 5  $\mu$ M의 저농도가 50  $\mu$ M의 고농도보다 더 효과적인 반응을 보였다. 실제 EGCG가 항염증 및 항산화 작용을 가지고 있으면서, 동시에 일부 세포성장 억제 및 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다.<sup>8)</sup> 즉, EGCG는 세포외 환경의 ROS제거기능을 가지면서, 아울러 일부 ROS를 유도할 수 있다.<sup>14)</sup> 이러한 기능이 정상세포와 암세포에 선택적으로 작용할 수 있다고 한다.<sup>8)</sup> 본 연구에서 50  $\mu$ M EGCG의 경우에는 이 두 가지 기능이 모두 보여지면서 5  $\mu$ M보다 그 효과가 적었던 것으로 판단이 된다. 하지만 암세포와 정상세포가 혼재된 경우에는 그 선택적 기능으로 인하여 고농도가 저농도보다 더 효과적일 수 있다.<sup>8)</sup>

녹차 한 잔에는 약 150~200 mg EGCG가 포함되어 있고, 이는 300  $\mu$ M의 양에 해당된다.<sup>20)</sup> [3H]EGCG 실험에 의하면 복용한 EGCG의 약 10%가 흡수된다고 하며, 그 외에 구강점막 등을 통해 빠르게 흡수된다고 한다.<sup>8)</sup> 따라서 본 연구에서 사용된 50  $\mu$ M EGCG 농도는 한 잔의 녹차의 양과 견줄 수 있는 것으로, 매일 한 잔의 녹차로 ROS를 생성하는 외부의 발암자극을 예방할 수 있을 지 모른다.

## 결 론

ROS를 생성하는 발암물질  $H_2O_2$ 는 사람 정상 상피세포주의 간극결합 Cx의 발현 및 세포 간 신호전달을 억제시켰다. 녹차추출물 EC, EGCG는  $H_2O_2$ 에 의한 세포 간 신호전달 감소를 효과적으로 예방하였다. 따라서 세포 간 신호전달을 담당하는 간극결합 단백질 Cx의 발현감소가 상피

세포의 발암과정과 관련이 있으며, 이는 녹차 추출물에 의하여 예방될 수 있을 것으로 기대된다.

중심 단어 : 종양 · Connexin · 녹차 · 간극결합 · H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · 발암물질.

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2005-003-E00169).

## REFERENCES

- 1) Choung YH, Moon SK, Park HJ. *Functional study of GJB2 in hereditary hearing loss. Laryngoscope* 2002;112 (9):1667-71.
- 2) Lowenstein WR. *Junctional intercellular communication and the control of growth. Biochim Biophys Acta* 1979;560 (1):1-65.
- 3) Choung YH, Park K, Kang SO, Markov Raynov AM, Kim CH, Choung PH. *Expression of the gap junction proteins connexin 26 and connexin 43 in human middle ear cholesteatoma. Acta Otolaryngol* 2006;126 (2):138-43.
- 4) Bruzzone R, White TW, Goodenough DA. *The cellular internet: On-line with connexins. Bioessays* 1996;18 (9):709-18.
- 5) Trosko JE, Chang CC, Medcalf A. *Mechanisms of tumor promotion: Potential role of intercellular communication. Cancer Invest* 1983;1 (6):511-26.
- 6) Yamasaki H. *Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. Carcinogenesis* 1990;11 (7):1051-8.
- 7) Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. *High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin 32. Curr Biol* 1997;7 (9):713-6.
- 8) Kondo H, Park SH, Watanabe K, Yamamoto Y, Akashi M. *Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits apoptosis induced by irradiation in human HaCaT keratinocytes. Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316 (1):59-64.
- 9) Lambert JD, Yang CS. *Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. J Nutr* 2003;133 (10):3262S-7S.
- 10) Yang CS, Chung JY, Yang G, Chhabra SK, Lee MJ. *Tea and tea polyphenols in cancer prevention. J Nutr* 2000;130 (2s suppl):472S-8S.
- 11) Kamibayashi Y, Oyamada Y, Mori M, Oyamada M. *Aberrant expression of gap junction proteins (connexins) is associated with tumor progression during multistage mouse skin carcinogenesis in vivo. Carcinogenesis* 1995;16 (6):1287-97.
- 12) Sawey MJ, Goldschmidt MH, Risek B, Gilula NB, Lo CW. *Perturbation in connexin 43 and connexin 26 gap-junction expression in mouse skin hyperplasia and neoplasia. Mol Carcinog* 1996;17 (2):49-61.
- 13) 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* 1987;168 (2):422-30.
- 14) Yang GY, Liao J, Li C, Chung J, Yurkow EJ, Ho CT, et al. *Effect of black and green tea polyphenols on c-jun phosphorylation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in transformed and non-transformed human bronchial cell lines: Possible mechanisms of cell growth inhibition and apoptosis induction. Carcinogenesis* 2000;21 (11):2035-9.
- 15) Kang KS, Wilson MR, Hayashi T, Chang CC, Trosko JE. *Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCB's and PBB's, alone or in mixtures. Environ Health Perspect* 1996;104 (2):192-200.
- 16) Upham BL, Kang KS, Cho HY, Trosko JE. *Hydrogen peroxide inhibits gap junctional intercellular communication in glutathione sufficient but not glutathione deficient cells. Carcinogenesis* 1997;18 (1):37-42.
- 17) Cerutti PA. *Prooxidant states and tumor promotion. Science* 1985; 227 (4685):375-81.
- 18) Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, et al. *Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: A regulatory mechanism with cell-bound reactants. EMBO J* 1997;16 (9):2319-32.
- 19) Takahashi H, Nomata K, Mori K, Matsuo M, Miyaguchi T, Noguchi M, et al. *The preventive effect of green tea on the gap junction intercellular communication in renal epithelial cells treated a renal carcinogen. Anticancer Res* 2004;24 (6):3757-62.
- 20) Mukhtar H, Ahmad N. *Mechanism of cancer chemopreventive activity of green tea. Proc Soc Exp Biol Med* 1999;220 (4):234-8.