

간상피세포에서 BHT와 propyl gallate에 의한 gap junctional intercellular communication 억제 효과

김지선 · 김성란 · 안지윤 · 하태열 · 강경선¹ · 김선아*
한국식품연구원, ¹서울대학교 수의학과

Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication in Rat Liver Epithelial Cells Induced by BHT and Propyl Gallate

Ji-Sun Kim, Sung-Ran Kim, Ji-Yun Ahn, Tae-Youl Ha and Kyoung-Sun Kang¹, and Suna Kim*

Korea Food Research Institute

¹Department of Veterinary Public Health, Seoul National University

Abstract This study was conducted to analyze the cytotoxic effects of butylated hydroxytoluene (BHT) and propyl gallate (PG) in WB-F344 rat liver epithelial cells. Here we measured the inhibition level of gap junctional intercellular communication (GJIC) and elucidated the relationships between GJIC and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) such as ERK, JNK, and p38. The cytotoxicities of BHT and PG appeared at concentrations of 1.0 mM and 0.25 mM, respectively, in the WB-F344 cells; and GJIC inhibition, which was analyzed by a scrape-loading/dye transfer assay and Western blotting analysis, appeared at 0.6 mM for BHT and 0.1 mM for PG, respectively. Also, the phosphorylations of Cx43, ERK, JNK, and p38 increased in dose-dependent manners. This suggests that BHT and PG treatments inhibited GJIC by the phosphorylation of MAPKs prior to cell damage.

Key words: gap junctional intercellular communication, butylated hydroxy toluene, propyl gallate, MAPKs

서 론

산화방지제는 식품의 산화에 의해서 발생하는 풍미 변화, 유지의 산패, 식품의 변색을 방지하거나 지연시키는 화합물로(1), 일반적으로 식품에 사용되는 산화방지제는 구조 내에 페놀기를 포함하여 유리 라디칼에 전자 혹은 수소를 공여하여 복합체를 만들어 산화를 저해한다(2). 식품 산화방지제는 토크페롤, 아스코르빈산 등의 천연산화방지제와 3,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), propyl gallate(PG), *tert*-butylhydroquinone(TBHQ), 3-*tert*-butyl-4-hydroxyanisole(BHA) 등의 합성산화방지제로 나뉘며 특히, BHT는 식용유지, 버터, 어패건제품, 어패염장품, 그 외 식품의 산화방지제로 사용되고, PG는 식용유지·돈지 및 버터류만에 사용이 허가되어 있다(2). 천연 산화방지제는 안전하기는 하나 가격이 비싸고, 단독으로는 산화 연쇄반응의 저지 능력이 낮거나(3), 유지 용해성이 없는 등의 문제가 있으며(4), 합성 항산화제는 탁월한 효과와 경제적 이점 때문에 폭넓게 사용되고 있으나, 안전성에 논란이 있어 사용방법이나 사용량이 부적당할 경우에는 인체에 위해를 일으킬 우려가 있으므로 사용기준을 규정하여 사용대상 식품의 종류, 사용량, 사용방법, 사용목적 등을 제한하여 일

정량 이상을 섭취하지 않도록 하고 있다(1,5-6).

지금까지 산화방지제를 포함한 식품첨가물의 위해성 평가는 주로 독성학적 견지에서 무시할 수 있는 수준인 일일섭취허용량(acceptable daily intake, ADI)을 설정하기 위하여 동물을 이용한 생체 내 독성평가에 주로 집중 되어 왔다(7). 그러나 *in vivo* assay의 경우 실험동물의 사용에 수반되는 비용 및 윤리적인 문제, 동물시험 결과의 차이 등의 문제들이 제기되어 왔기 때문에 이를 해결할 수 있는 간편하고 비용이 저렴하며 정확도를 높일 수 있는 대체시험법의 개발이 요구되고 있다.

Gap junction은 세포막에 존재하는 세포간 물질 전달 통로로 인접한 두 세포간에 수동적 확산(passive diffusion)에 의하여 물질을 이동시키므로 비교적 비특이적이라 할 수 있다. Gap junction을 통한 세포간의 교통은 세포와 세포사이의 항상성 조절 및 유지하는 역할을 하고, 세포의 성장과 분화에 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다(8-9). 그러므로 gap junction에 손상이 유발될 경우 암세포와 같이 비정상적인 세포 증식 등의 현상이 발생한다(10-11). Gap junction은 6개의 subunits로 구성된 환상구조의 connexon으로 이루어져 있으며, 이를 구성하는 connexin이 gap junction의 주요 구성 단백질로 세포의 gap junctional intercellular communication(GJIC)의 조절은 connexin의 down regulation에 의해 억제되기도 하지만 정상 세포에 독성을 나타내는 물질들은 주로 connexin을 인산화 시켜 GJIC를 억제하는 것으로 보고되고 있다(12-16). 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)와 H₂O₂를 비롯한 여러 종양촉진인자들은 GJIC에 영향을 주어 신호 전달에 변화를 초래하며, 특히 발암단계에서 GJIC의 감소가 보고되고 있다(17-19). 종양촉진인자에 의한 GJIC의 억제는 gap junction의 수

*Corresponding author: Suna Kim, Food Function Research Group, Korea Food Research Institute, 516 Baekhyun-dong, Bundang-gu, Sungnam-si, Gyeonggi-do 463-746, Korea
Tel.: +82-31-780-9301
Fax: +82-31-780-9225
E-mail: suna@kfri.re.kr

Received April 17, 2007; accepted August 22, 2007

와 크기 감소 및 Cx43의 인산화와 관련되며 특히, 종양촉진인에 의한 산화적 스트레스로 ERK, JNK, p38과 같은 신호전달과 관련된 단백질을 포함하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 활성화 시키는 과정에 의해 촉진된다(20-22).

이에 본 연구에서는 *in vitro* bioassay법으로 정상 세포인 간상피세포를 이용하여 현재 식품 중 산화방지제로 사용되고 있는 BHT과 PG가 GJIC에 미치는 효과 및 그 작용 기전을 살펴보았다.

재료 및 방법

세포 배양

본 실험에서 사용한 세포주는 WB-F344 rat liver epithelial cell로서, 서울대학교 수의학과로부터 제공받아 사용하였다. 세포는 D-medium(Gibco, New York, NY, USA)를 사용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C의 세포배양기(Sanyo, Osaka, Japan)에서 배양하였다.

세포 독성

세포독성 측정을 위하여 1×10⁵ cell/mL의 농도로 WB세포를 파종하여 24시간 동안 CO₂ 배양기(Sanyo)에서 배양한 후, BHT와 PG가 첨가된 배지로 교환하였다. 시료 첨가 후 24시간 동안 배양한 뒤 배양이 끝난 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 측정하였다(23). 각 well에 0.1 mg의 MTT(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 가해주고 다시 37°C에서 4시간 배양하여 MTT를 환원시켜 생성된 formazan을 DMSO를 이용하여 용해시킨 후 microplate reader(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 세포독성은 대조군의 생존율에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

GJIC assay

BHT와 PG(Wako Ltd., Okayama, Japan)이 WB-F344 cell의 GJIC에 미치는 효과를 분석하기 위해, scrape loading/dye transfer (SL/DT) 방법을 사용하였다. GJIC 측정을 위하여 세포를 1×10⁵ cell/mL의 농도로 파종하여 37°C의 CO₂ 배양기에서 세포 사이가 완전히 유착될 때까지 배양하였다. 시료 처리 후 0.05% lucifer yellow CH(Sigma, St Louis, MO, USA)를 첨가하고, surgical-steel-blade scraper를 이용하여 3개의 scrape line을 만들었다. 차광 상태에서 3분간 실온 방치시킨 후, 4% neutral formalin 2 mL을 첨가하여 세포를 고정시킨 다음 inverted fluorescent microscope(Olympus Ix71, Tokyo, Japan)으로 lucifer yellow가 scrape line으로부터 수직으로 이동한 거리를 관찰하였다.

Protein extraction and quantification

세포를 75 cm² petri dish에 분주하여 90~100% monolayer에 이를 때까지 배양한 후, 각 물질의 농도별로 만든 배지로 교체하여 60분간 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 단백질을 수거한 뒤 RIPA buffer를 이용하여 cell을 분해시켜, Bradford reagent(Bio-Rad Co., Richmond, CA, USA)로 단백질 정량을 실시하였다. Cell lysate는 사용 전까지 50 μL 분주하여 -20°C에 보관하였다.

Western blot analysis

Western blot analysis는 BHT와 PG의 처리에 따라 Cx43 및 그 하위 kinase의 발현 상태를 양적으로 비교하기 위해서 실험하였다. Bradford assay로 정량된 단백질을 SDS polyacrylamide gel의 각 well당 20 μg을 loading하여 전기영동을 실시하였다. 2개의

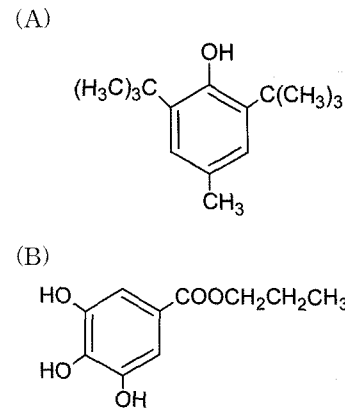


Fig. 1. Structures of (A) butylated hydroxy toluene and (B) propyl gallate.

gel 중에 하나는 0.25% Coomassie blue staining을 통하여 단백질 영동을 확인하였고, 나머지 한 개의 gel은 PVDF membrane(Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)으로 transfer하였다. 이 membrane을 blocking agent인 5% skim milk가 함유된 PBS-T(phosphate buffered saline containing 0.1% Tween 20, Sigma)로 1시간 동안 blocking 한 후, PBS(Sigma, St Louis, MO, USA)로 세척하고, monoclonal mouse anti-connexin 43 antibody (Chemicon, Temecula, CA, USA)을 cold chamber에서 overnight 하였다. 다시 PBS-T로 세척 후, horseradish peroxidase(HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody(Zymed, San Francisco, CA, USA)하에 1시간 동안 실온에서 방치한 후, ECL Western blotting detection reagents(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)로 발색시켜 암실에서 band를 확인하였다. MAP kinase는 ERK, p38, JNK와 이의 인산화 형태인 pERK, pp38, pJNK를 위의 방법과 동일하게 측정하였다.

통계 처리

실험의 통계 분석은 SAS program(24)을 이용하여 실험군당 평균±표준오차로 나타내었으며 각 군의 유의차 검정은 분산분석을 한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의하여 검정하였다.

결과 및 고찰

WB-F344 간상피세포에 대한 세포 독성

WB-F344 간상피세포에 대하여 BHT와 PG의 독성이 없는 농도를 설정하기 위하여 MTT법을 이용하여 세포 생육 억제 효과를 측정하였다(Fig. 2). WB-F344 간상피세포에 BHT를 처리하여 세포독성 시험을 실시한 결과, 정상 대조군(기준값 = 100)과 비교하여 BHT는 1.0 mM 이상 첨가하였을 때 세포 생육이 80% 이하로 저하되었고, 40 mM 이상 첨가하였을 때 40% 이하의 세포 생육을 보였다. WB cell에 PG를 처리하여 세포독성시험을 실시한 결과, 0.75 mM 이상에서 세포 생육이 80%이하로 저하되었고 3.0 mM에서는 50%의 세포생육을 보여 BHT보다 낮은 농도에서 세포 독성이 나타나는 것으로 나타났다. 세포 생육이 80%이하가 될 때 세포 독성이 있음을 의미한다는 보고를 감안할 때(25), BHT는 1.0 mM, PG는 0.75 mM에서 세포독성이 나타난 것으로 관찰되었다.

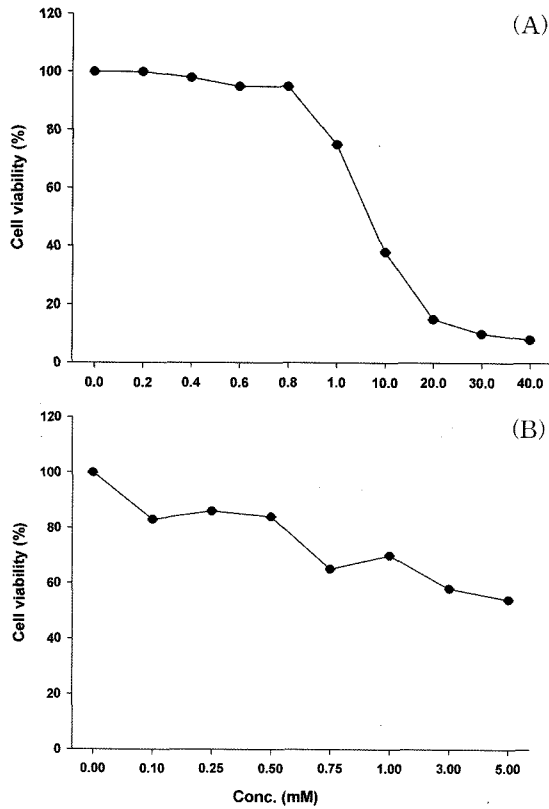


Fig. 2. Cytotoxic effects of (A) butylated hydroxy toluene and (B) propyl gallate on WB-F344 cell.

GJIC에 미치는 효과

BHT와 PG의 세포독성 결과를 토대로 세포독성이 없는 농도를 고려하여 GJIC의 활성을 측정하였다. GJIC의 측정을 위하여

SL/DT법을 이용하였는데 이 방법은 빠르고 신뢰도가 높은 방법으로 물리적으로 세포에 자극을 가해 손상된 세포 사이로 일시적인 틈을 만들어 세포의 생육이나 군집형성능에는 영향을 끼치지 않고 발색물질인 lucifer yellow가 gap junction을 통해 이웃 세포로 전이된 염색 정도를 평가하였다(26).

BHT와 PG의 GJIC 억제능을 형광 광학현미경상에서 SL/DT를 통해 확인한 결과는 Fig. 3과 같으며, GJIC이 원활한 세포수를 직접 계수한 결과는 Fig. 4와 같다. BHT는 0.4 mM까지는 GJIC의 변화가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으나 0.6 mM부터는 GJIC의 억제 효과가 나타났고, PG의 경우는 0.1 mM부터 GJIC의 억제를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$).

BHT와 PG의 GJIC 억제 효과를 검증하기 위해 connexin 중 WB세포에서 주로 발현하는 Cx43의 인산화 양상을 측정하였다. Cx43은 인산화 정도에 따라 P0, P1, P2의 세 가지 형태로 나타나는데, P0는 Cx43 단백질이 인산화되지 않았음을, P1, P2로 갈수록 과인산화 상태를 보여준다(17,25).

BHT와 PG의 처리에 따른 Cx43 단백질의 발현 및 인산화를 측정 한 결과, 처리군의 농도가 증가할수록 농도 의존적으로 P0가 감소하고 인산화된 P1과 P2의 단백질 발현이 증가되는 것으로 확인되었으며 특히 BHT와 PG 모두 500 μ M 이상에서 현저하게 인산화가 증가되는 것으로 나타났다(Fig. 5).

BHT와 PG의 농도에 따른 세포내 신호전달경로의 변화를 관찰하기 위해, connexin의 구조적 변화에 영향을 주어 GJIC의 개폐에 조절하는 것으로 보고(27-29)되고 있는 MAPKs의 인산화를 측정하였고, 이때 주요 biomarker로는 ERK, p38, JNK와 각각의 인산화 형태의 단백질을 측정하였다.

BHT에 대한 MAP kinase의 발현 양상을 살펴본 결과(Fig. 6), ERK 경우 인산화 형태인 pERK가 시료의 농도가 증가할수록 발현이 증가하여 활성화되었고, 특히 0.6 mM에서부터 유의하게 발현양이 증가한 것을 관찰할 수 있었다($p < 0.001$)(Fig. 6A). p38 역시 정상 세포에서는 인산화 형태인 pp38이 발현양이 적었으나 농

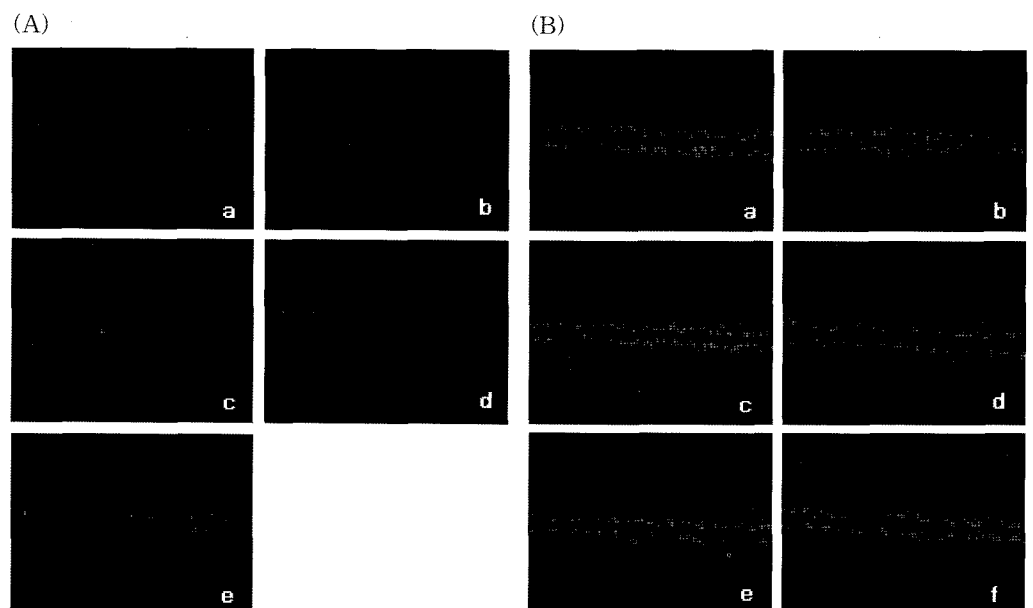


Fig. 3. Effects of butylated hydroxy toluene (BHT) and propyl gallate (PG) on the gap junctional intercellular communication (GJIC) using by SL/DT assay. (A) Cells were treated with (a) control, (b) BHT 0.4 mM, (c) BHT 0.6 mM, (d) BHT 0.8 mM, (e) BHT 1.0 mM. (B) Cells were treated with (a) control, (b) PG 0.1 mM, (c) PG 0.25 mM, (d) PG 0.5 mM, (e) PG 0.75 mM, and (f) PG 1.0 mM. Data were quantified from 3 different scrape-loaded images from different plates.

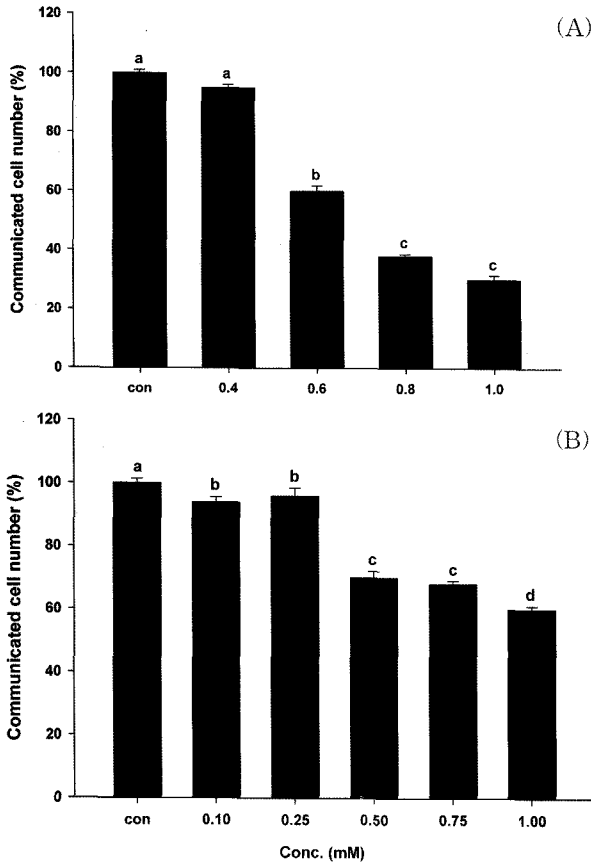


Fig. 4. Comparison of communicated cell numbers in different concentrations of butylated hydroxy toluene (BHT) and propyl gallate (PG) on the gap junctional intercellular communication (GJIC) using by SL/DT assay. (A) Cells were treated with (a) control, (b) BHT 0.4 mM, and (c) BHT 0.6 mM, (d) BHT 0.8 mM, (e) BHT 1.0 mM. (B) Cells were treated with (a) control, (b) PG 0.1 mM, (c) PG 0.25 mM, (d) PG 0.5 mM, (e) PG 0.75 mM, and (f) PG 1.0 mM. Data quantified from 3 different scrape-loaded images each from different plates.

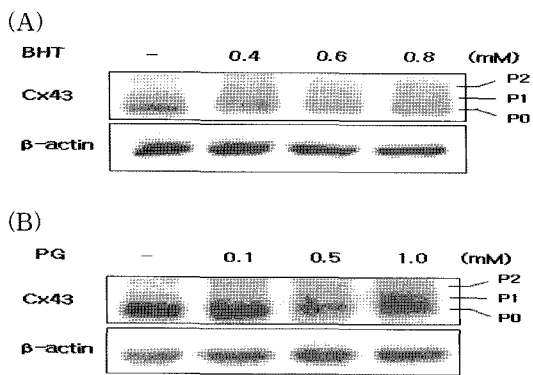
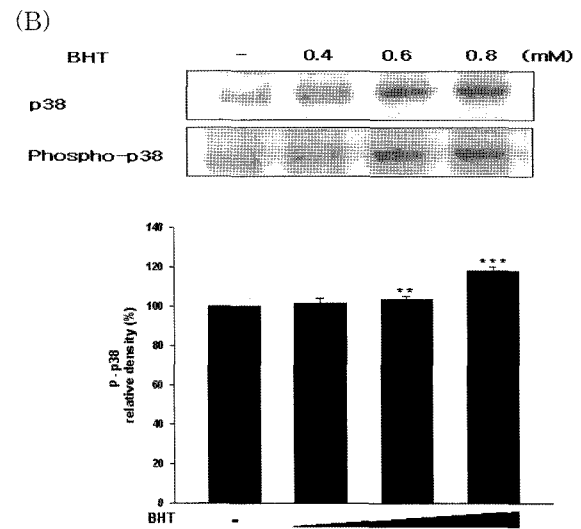
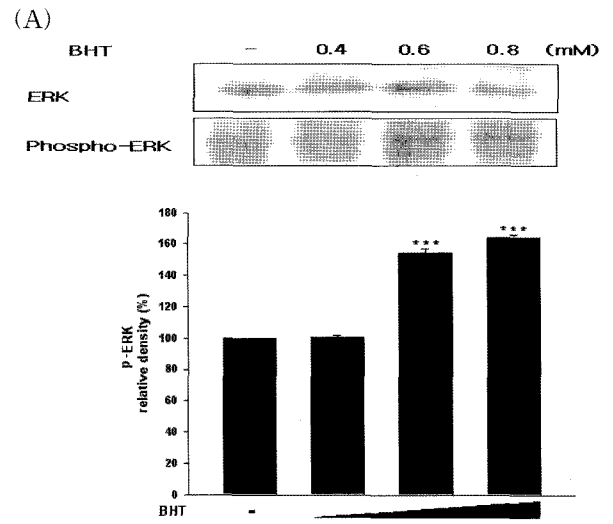


Fig. 5. Changes of the phosphorylation levels of Cx43 by the treatment of (A) hydroxy toluene (BHT) and (B) propyl gallate (PG) using Western blot analysis. Total cellular protein extracts were prepared and western blot analyses were performed with 20 μ g protein using specific antibody for Cx43.

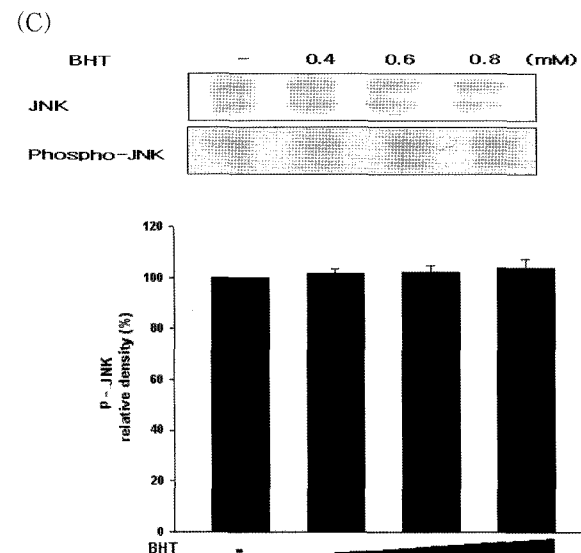


Fig. 6. Effects of butylated hydroxy toluene (BHT) on the phosphorylation of ERK, p38s and JNK. Total cellular protein extracts were prepared and Western blot analyses were performed with 20 μ g protein using specific antibody for (A) total ERK or pERK, (B) total p38 or pp38 and (C) total JNK or pJNK.

도가 증가함에 따라 그 양의 차이를 보였고, 0.8 mM에서는 대조군에 비하여 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B, $p < 0.001$). BHT에 대한 JNK의 발현 수준은 인산화 여부와 상관

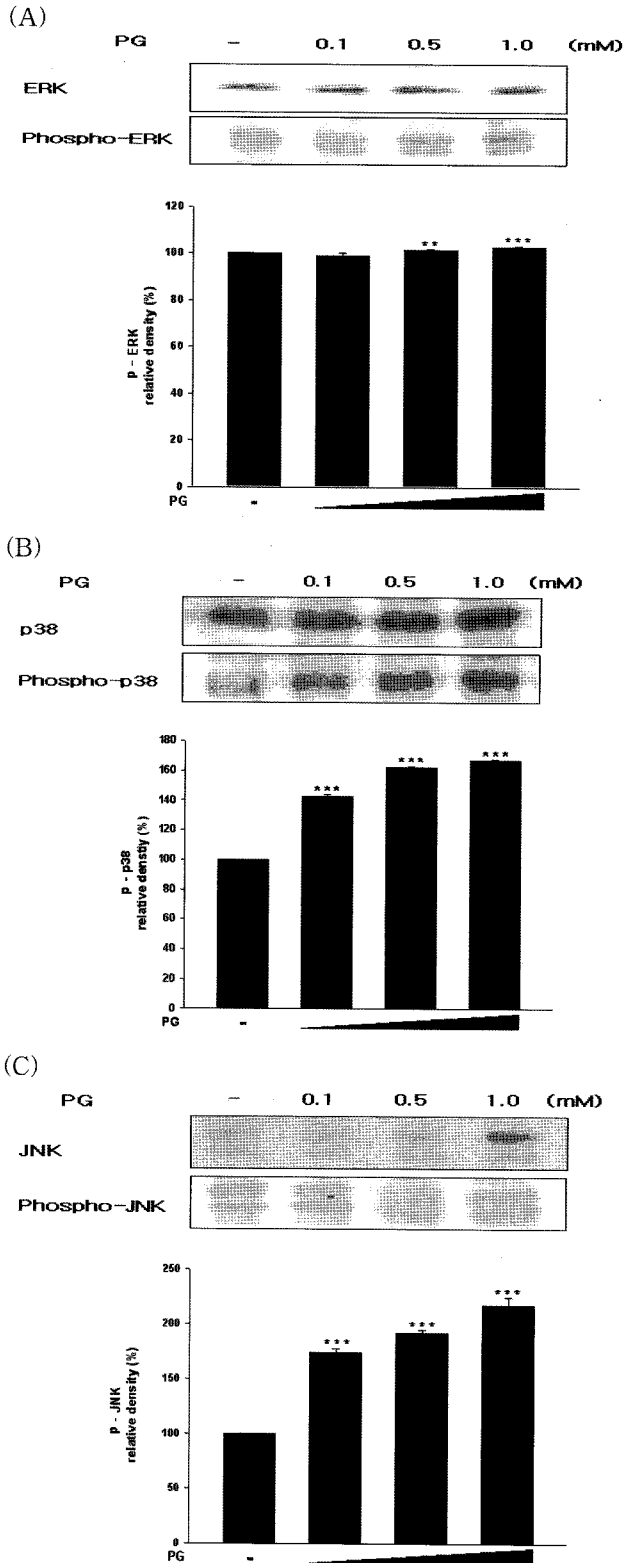


Fig. 7. Effect of propyl gallate (PG) on the phosphorylation of ERK, p38 and JNK. Total cellular protein extracts were prepared and Western blot analyses were performed with 20 µg protein using specific antibody for (A) total ERK or pERK, (B) total p38 or pp38 and (C) total JNK or pJNK.

없이 모두 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다.

PG에 대한 MAP kinase의 발현 양상을 살펴본 결과(Fig. 7),

ERK는 인산화 형태인 pERK가 농도 의존적으로 발현양이 증가하였으며, 특히 0.5 mM부터 유의하게 발현양이 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 7A, $p < 0.01$). JNK와 p38 역시 각각의 인산화 형태에서 각각의 대조군과 그 발현양을 비교하여 보았을 때 농도 의존하여 유의하게 증가하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 7B, 7C, $p < 0.001$).

결과적으로 BHT와 PG는 Cx43의 인산화를 유발하여 GJIC을 억제시키는 것으로 나타났으며 이와 관련된 단백질은 ERK와 p38의 인산화가 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으나 JNK의 발현은 PG처리시 농도 의존적으로 인산화가 증가하였으나 BHT처리시에는 통계적으로 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. Cho(17) 등은 ERK 억제제인 PD98059와 p38 억제제인 SB202190을 처리한 세포에서 H₂O₂에 의한 GJIC의 억제를 예방함으로써 GJIC의 억제와 직접적으로 관련됨을 보고하였으며 *Phellinus linteus*에 의한 GJIC 회복 연구를 통해 ERK 뿐만 아니라 p38 MAP kinases도 발암에 의한 gap junction의 기능과 관련성이 큼을 제시하였다. 본 연구결과에서도 BHT와 PG에 의한 Cx43의 인산화와 함께 p38과 ERK의 인산화가 촉진됨을 보여주었으며 이는 Cho(17)의 결과와 일치한다. 나아가 본 연구결과는 정상세포에서 산화방지제와 같은 식품첨가물의 세포 독성이 관찰되기 전에 GJIC의 억제가 진행되고 이의 작용기전을 명확히 함으로서, 독성평가를 위해 *in vitro* assay법으로 활용 가능성이 높음을 제시하였으며 이는 식품 첨가물의 안전성 평가시 gap junction을 통한 세포간의 정보 교환이 민감한 biomarker가 될 수 있을 것이라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 정상 세포인 간상피세포를 이용하여 BHT와 PG가 GJIC에 미치는 효과 및 그 작용 기전을 살펴보았다.

BHT와 PG를 WB-F344세포에 각각 1.0 mM, 0.75 mM 이상 처리한 결과, 세포 생육이 80%이하로 저하되어 세포 독성을 보였고, BHT와 PG의 GJIC에 대한 억제효과는 이보다 낮은 농도인 0.6 mM, 0.1 mM에서 나타났으며 처리에 따른 Cx43 단백질의 발현 및 인산화를 측정된 결과, BHT와 PG 모두 농도 의존적으로 Cx43의 인산화가 증가하였고, Cx43의 구조적 변화와 관련된 MAP kinase는 주요 biomarker인 ERK, p38, JNK의 발현 및 인산화를 측정된 결과, 농도 의존적으로 ERK와 p38의 인산화가 증가하는 것으로 나타났다. 이는 WB-F344세포에 BHT와 PG의 처리가 세포독성을 나타내기 전 농도에서 GJIC의 억제하였음을 의미하며 이는 식품첨가물의 안전성 평가에도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 논문은 과학기술부의 기능성 식품소재 기반기술개발사업과 한국식품연구원의 연구비 지원으로 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kim MR. Food Safety. Shinjeong, Seoul, Korea. pp. 119-124 (2004)
2. Branen AL, Davidson PM, Salminen S. Food Additives. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA. pp. 143-145 (1990)
3. Kim BS, Lee CW, Lee YJ, Hong KH, Lee CH, Park GG, Kim

- YK, Lee MH. Study on determination method of TBHQ in foods. The Report of National Institute of Health 28: 366-371 (1991)
4. Peers KE, Coxon DT, Chan HW. Auto-oxidation of methyl linoleate: The effect of antioxidants on product distribution. J. Sci. Food Agr. 35: 813-817 (1984)
 5. Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)
 6. Choe SY, Yang KH. Toxicological studies of antioxidants, butylated hydroxytoluene (BHT) and butylated hydroxyanisole (BHA). Korean J. Food Sci. Technol. 14: 283-288 (1982)
 7. WHO Guideline for the study of dietary intakes of chemical contaminants. Report prepared by the Joint UNEP/FAO/WHO Food Contamination Monitoring Programme. WHO Offset Publication No. 87. Geneva, Switzerland (1985)
 8. Loewenstein WR. Junctional intercellular communication: The cell-to-cell membrane channel. Physiol. Rev. 61: 829-913 (1981)
 9. Kang KS, Yun JW, Yoon B, Lim YK, Lee YS. Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA. Cancer Lett. 152: 97-106 (2000)
 10. Kumar NM, Gilula NB. The gap junction communication channel. Cell 84: 381-388 (1996)
 11. Saez JC, Connor JA, Spray DC, Bennett MV. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate and to calcium ions. P. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2708-2712 (1989)
 12. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: The molecular basis of direct intercellular signaling. Eur. J. Biochem. 15: 1-27 (1996)
 13. Carystinos GD, Bier A, Batist G. The role of connexin-mediated cell-cell communication in breast cancer metastasis. J. Mammary Gland Biol. 6: 431-461 (2001)
 14. Oh SY, Grupen CG, Murray AW. Phorbol ester induces phosphorylation and down-regulation of connexin 43 in WB cells. Biochim. Biophys. Acta 1094: 243-245 (1991)
 15. Rivedal E, Yamasaki H, Sanner T. Inhibition of gap junctional intercellular communication in Syrian hamster embryo cells by TPA, retinoic acid, and DDT. Carcinogenesis 15: 689-694 (1994)
 16. 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, PCBs and PBBs alone or in mixtures. Environ. Health Persp. 104: 192-200 (1996)
 17. Cho JH, Cho SD, Hu H, Kim SH, Lee SK, Lee YS, Kang KS. The roles of ERK1/2 and p38 MAP kinases in the preventive mechanisms of mushroom *Phellinus linteus* against the inhibition of gap junctional intercellular communication by hydrogen peroxide. Carcinogenesis 23: 1163-1169 (2002)
 18. 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 H₂O₂. Cancer Lett. 152: 97-106 (2000)
 19. Rivedal E, Opsahl H. Role of PKC and MAP kinase in EGF- and TPA-induced connexin43 phosphorylation and inhibition of gap junction intercellular communication in rat liver epithelial cells. Carcinogenesis 22: 1543-1550 (2001)
 20. Eghbali B, Kessler JA, Reid LM, Roy C, Spray DC. Involvement of gap junctions in tumorigenesis: transfection of tumor cells with connexin32 cDNA retards growth *in vivo*. P. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10701-10705 (1991)
 21. 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 16: 1287-1297 (1995)
 22. Marshall CJ. Specificity of receptor tyrosine kinase signalling: Transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell 80: 175-185 (1995)
 23. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assesment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942 (1987)
 24. SAS/STATM User's Guide Release. 6.03 Edition. SAS Institute, Cary, NC, USA (1988)
 25. Hwang JW, Park JS, Jo EH, Kim SJ, Yoon BS, Kim SH, Lee YS, Kang KS. Chinese cabbage extracts and sulforaphane can protect H₂O₂-induced inhibition of gap junctional intercellular communication through the inactivation of ERK1/2 and p38 MAP kinases. J. Agr. Food Chem. 53: 8205-8210 (2005)
 26. 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: 422-430 (1987)
 27. Yang SR, Cho SD, Ahn NS, Jung JW, Park JS, Park JS, Jo EH, Hwang JW, Jung JY, Kim TY, Yoon BS, Lee BH, Kang KS, Lee YS. Role of gap junctional intercellular communication (GJIC) through p38 and ERK1/2 pathway in the differentiation of rat neuronal stem cells. J. Vet. Med. Sci. 67: 291-294 (2005)
 28. Roulston A, Reinhard C, Amiri P, Williams LT. Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor α . J. Biol. Chem. 273: 10232-10239 (1998)
 29. Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. P. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7686-7689 (1995)