

랫드 유선 상피 세포의 분리와 gap junction 단백질의 발현 양상

서민수 · 강경선 · 이영순*

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실
(게재승인: 2003년 12월 1일)

Characterization of rat mammary epithelial cells and expression of gap junctional proteins

Min-Soo Seo, Kyung-Sun Kang and Yong-Soon Lee*

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Accepted: December 1, 2003)

Abstract : We have a cultured method to grow rat mammary epithelial cells (RMEC) for 1 to 14 days in 1:1 mixture of Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient and F-12 (DMEM/F-12) containing 10% fetal bovine serum (FBS), human EGF, insulin, hydrocortisone, human transferrin and 17β -estradiol *in vitro*. We were able to isolate and distinguish two cell types, luminal epithelial cells and myoepithelial cells, from primary cultures of RMEC. Immunocytochemical stains were used to distinguish luminal epithelial cells and myoepithelial cells. Peanut lectin (PNA) was stained in most alveolar epithelial cells and luminal epithelial cells of rats, while Thy-1.1, a maker of potential rat mammary myoepithelial cells, was expressed in myoepithelial cells in the rat. Also, we examined the expression patterns of three types of gap junction proteins, connexin 26 (Cx26), connexins 32 (Cx32) and connexin 43 (Cx43) by immunocytochemistry and western blot analysis. In the cell types, the results show that at the early stage of culture, luminal epithelial cells were increased and these cells were surrounded by myoepithelial cells. At the late stage of culture, luminal epithelial cells were decreased, in contrast myoepithelial cells were increased. In the expression pattern of gap junction, Cx26 maintained its expression until day 3, but afterwards gradually decreased in intensity. Expression of Cx32 remained until day 5, then decreased slightly. Cx43 gradually increased until the middle time of culture then decreased in intensity. These results suggest that connexins may be important for the control of growth in rat mammary epithelial cell types.

Key words : rat mammary epithelial cells(RMECs), gap junction, connexin

서 론

랫드 유선 상피 세포는 크게 두 가지 타입의 세포로 분류할 수 있는 것으로 알려져 있다. 즉 luminal epithelial cell과 myoepithelial cell로 나눌 수 있는데, 이를 면역 현광 염색으로 확인할 수 있다 [14].

Peanut agglutinin (PNA)는 정상 사람 유방상피세포, 여러 종류의 사람 암세포, 그리고 쥐에서 luminal epithelial

세포의 maker로 잘 알려져 있다. Thy1.1의 경우는 rat mammary myoepithelial cell의 maker로 사용된다 [1].

쥐 유선 조직은 하나 이상의 기능을 가진 분화된 세포로 구성되어 있는데, 유선은 branching ducts 말단부에 end buds, lobules 또는 분화된 alveoli로 이루어져 있는 것으로 알려져 있다 [3, 16]. Lumen은 유선의 여러 부분에 연속적으로 존재하는데 myoepithelial cells가 layer 형태로 주위를 둘러싸고 있다 [7, 18].

이 실험은 한국과학재단 (승인 번호: R01-2000-000-00213-0), 서울대학교 수의과학연구소 및 보건복지부 바이오 보건기술 개발 사업 (The Korea 21R&D project)의 지원 하에 진행되었음

*Corresponding author: Yong-Soon Lee

Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[Tel: 82-2-880-1246, Fax: 82-2-876-7610, E-mail: leeys@snu.ac.kr]

Gap junction을 통한 세포간의 교통은 세포와 세포사이의 항상성을 조절 및 유지하는 역할을 하고, 세포의 성장과 분화에 조절인자로 작용하는 것으로 알려져 있다 [12, 10]. 또한 gap junction의 작용은 암세포의 성장 및 죽음에도 관련이 있는 것으로 알려져 있다 [2, 8].

Gap junction은 물질의 이동 방식중의 하나로서 대사 물질을 연결한 세포에 직접적인 연결로 이동하는 방식을 가진다. 이온, 당, 아미노산, 핵산, 비타민, 호르몬, 그리고 그 밖의 작은 분자량의 물질들(1 kDal 이하)이 조직 내의 세포에 고르게 분포할 수 있는 것은 바로 이 방식에 의한 이동 때문이다 [11, 17]. Gap junction은 hexameric structure로 구성되어 있으며 세포간에 2개의 병렬 구조로 이루어진 hemi-channel로 형성된다 [1].

Gap junction은 때로는 유선에 풍부하게 존재하는데 분비 기능에 관여한다고 생각된다. 성숙속 기간, 임신 기간 사이에 유선의 성장은 이루어진다 [5]. 이미 *in vivo* 실험을 통해서 쥐 유선 조직에서 major connexin proteins로 알려진 Cx26, Cx32 그리고 Cx43의 발현 양상을 관찰한 결과가 알려져 있다 [19]. 지금까지의 보고된 문헌을 보면, 사람이나 마우스로부터의 유선 상피 세포의 분리가 비교적 쉽고 많이 연구가 이루어져 있으나 [9], 랫드로부터의 분리는 어려운 것으로 알려져 있다. 따라서 이번 실험의 목적은 랫드 유선 상피 세포를 분리하여 배양하는 방법을 확립하고, luminal epithelial cells와 myoepithelial cells를 면역 현광 염색으로 특성을 확인하며, gap junction의 발현 양상을 조사하는 것이다.

재료 및 방법

랫드 유선 상피 세포의 배양

동물은 7주령에 임신하지 않은 암컷 Spague-Dawley (SD) rats를 사용하였다. 쥐는 ether 마취 후 경추탈골로 안락사 시켰으며, 서혜부의 유선 조직으로부터 lymph nodes를 제외하고 조직을 분리하였다. 이렇게 획득한 유선 조직은 멸균된 가위를 사용하여 세절한 후 냉장 보관한 serum-free medium (DMEM/F-12; Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12)에 50 µg/ml gentamicin (Sigma, St. Louis, MO)을 첨가하였다. 세절한 유선 조직은 collagenase (Type III, 2 mg/ml; Worthington Biochemical, Freehold, NJ)를 처치한 후 shaking incubator를 이용하여 37°C에서 약 5시간 동안 보관하였다. Incubation 후에 약 350 g로 10분간 원심분리를 하여 상층액을 제거하였고, 원심분리 후 상층액 제거과정을 3회 반복하였다. 원심분리 후 생긴 pellet은 complete hormone medium을 첨가하여 single cell로 만들어서 100 mm tissue culture dish (Nunc, Rochester, NY)

에 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. Complete hormone medium은 DMEM/F-12 medium에 50 µg/ml gentamicin을, 10 µg/ml human EGF (γEGF), 5 mg/ml insulin, 0.5 mg/ml hydrocortisone, 2 mg/ml human transferrin, 0.005 µg/ml 17β-estradiol (Sigma, St. Louis, MO) 등을 첨가하여 만들었다. 세포 배양은 1일부터 14일까지 배양하였으며, 세포 배양 1일에만 10% FBS를 첨가한 complete hormone medium을 사용하였고 그 후로는 10% FBS를 첨가하지 않은 complete hormone medium을 사용하였다.

면역 현광 염색

Luminal epithelial cells과 myoepithelial cells의 특징을 구분하기 위해서 면역 현광 염색을 실시하였다. RMEC를 배양한 1일부터 3일, 5일 그리고 7일에 peanut lectin-FITC (PNA-FITC; dilution 1:100; Vector Laboratories, Burlingame, CA)를 luminal epithelial cell marker로 사용하였고, phycoerythrin-conjugated anti-Thy-1.1 monoclonal antibody (Thy-1.1-PE; dilution 1:100; Bioproducts For Science, Indianapolis, IN)는 myoepithelial cell marker로 사용하였다. 세포는 95% MetOH에 5% acetic acid 용액을 사용하여 -20°C에 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척 후 10% normal goat serum (NGS)를 처치한 PBS로 실온에서 약 2시간 정도 blocking을 실시하였다. 그 후에 각 항체를 처치한 다음 형광 현미경(Olympus Ix70, Okaya, Japan)으로 관찰하였다.

Gap junction proteins인 connexins의 존재 여부를 확인하기 위해서 Cx26, Cx32 그리고 Cx43에 면역 현광 염색을 실시하였다. Connexin 26 (Mouse anti-Connexin 26; dilution 1:200; Zymed Laboratories, Inc)과 Connexin 32 (Mouse anti-connexin 32 monoclonal antibody; dilution 1:200; Chemicon International, Inc) 그리고 Connexin 43 (Mouse anti-connexin 43 monoclonal antibody; dilution 1:200; Chemicon International, Inc)를 1차 항체로 사용하였다. 세포는 95% MetOH에 5% acetic acid 용액을 사용하여 -20°C에 10분간 고정하였다. PBS로 2회 세척 후 5% skim milk를 함유한 PBS 용액으로 실온에서 약 2시간 정도 blocking을 하였다. 그 후에 각 1차 항체를 0.1% BSA와 0.5% tween-20를 처치한 PBS에 희석해서 실온에서 약 2시간 정도 정제하였다. 2차 항체는 FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody(Zymed Laboratories, Inc; dilution 1:2000)를 0.1% BSA를 처치한 PBS로 희석하여 실온에서 빛을 차단한 상태로 약 2시간 정도 반응시켰다. 그 후에 1% BSA가 함유된 PBS로 3회 세척한 후 현광 현미경(Olympus Ix70, Okaya, Japan)으로 관찰하였다.

Western blot analysis

Western blot analysis는 RMEC의 성장 및 분화에 따라서 Cx26, Cx32 그리고 Cx43의 발현 상태를 양적으로 비교하기 위해서 실시하였다. RMEC의 protein은 세포 배양 1일, 2일, 3일, 5일, 7일, 14일별로 추출하였다. Protein은 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM iodoacetoamide, 1 mM leupeptin, 1 mM antipain, 0.1 mM sodium orthovanadate 그리고 5 mM sodium fluoride를 함유한 20% SDS 용액을 사용하여 추출하였다. 날짜 별로 추출한 protein은 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (12.5% SDS-PAGE)를 이용하여 분리하였다 [4, 6]. 분리된 protein은 nitrocellulose membranes에 100 V, 350 mA로 1시간 동안 transfer 하였다. 그 후

에 skim milk를 사용하여 약 2시간 동안 실온에서 blocking을 하였다. 1차 항체로는 Connexin 26, Connexin 32 그리고 Connexin 43 (dilution 1:1000)을 사용하였으며 2차 항체는 HRP-Goat anti-Mouse IgG (H+L) conjugate (Zymed Laboratories, Inc; dilution 1:2000)을 사용하였다. 모든 항체의 사용은 각 제조사의 protocol에 따랐으며 protein bands는 ECL detection Kit (Amersham, Piscataway, NJ)로 발현을 시켰다.

결 과

랫드 유선 상피 세포의 분리 및 면역 현광 염색 RMEC는 primary culture로 1일부터 14일까지 DMEM/

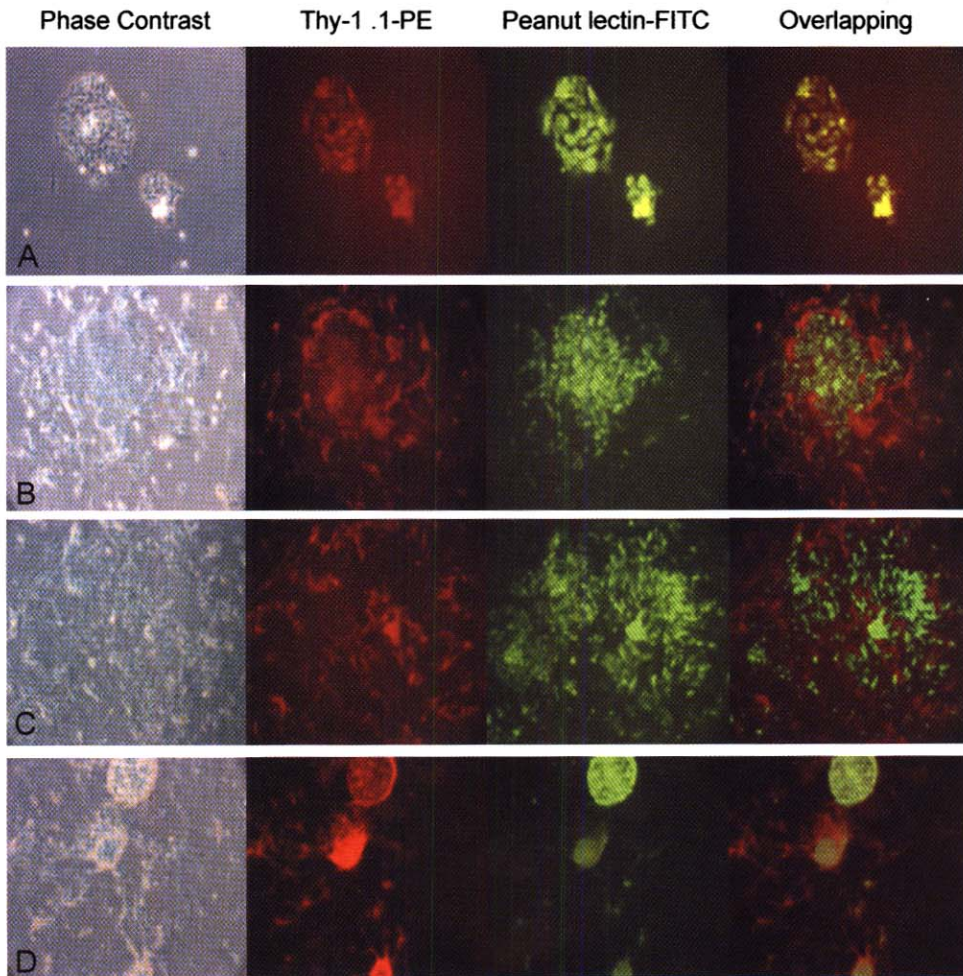


Fig. 1. Immunostaining of RMEC in primary culture in DMEM/F-12 for 1day(A), 3day(B), 5day(C) and 7day(D) with PNA-FITC and Thy-1.1-PE. (×100).

F-12 배지에서 배양하였다. 세포는 organoid로부터 monolayer로 성장하였으며, 면역 현광 염색을 통해서 RMEC를 luminal epithelial cells과 myoepithelial cells로 구분하였다.

PNA-FITC는 luminal epithelial cells에서 특이적으로 발현되고, Thy-1.1-PE는 myoepithelial cells에서 특이적으로 발현되었다. luminal epithelial cells은 현광 현미경으로 관찰한 결과 small cuboidal하고 cobblestone 형태를 가지고 tight하게 뭉쳐서 organoid로부터 뺀어 성장하는 모습을 볼 수 있었다. myoepithelial cells는 비교적 크고 긴 형태의 세포로 luminal epithelial cells의 외곽을 감싸고 있거나 epithelial conoly들 사이에서 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 세포 배양 1일째에서는 형태학적으로나 면역 현광 염색 결과에서도 luminal epithelial cells과 myoepithelial cells 간에 경계가 뚜렷하지 않음을 알 수 있다(Fig. 1A). 세포 배양 3일째부터는 각 cell types의 특징을 보이기 시작했다. PNA+ 세포는 cuboidal

cobblestone 형태의 모습을 보였고, Thy-1.1+ 세포는 크고 길쭉한 모양을 보였다. luminal epithelial cells는 colony의 중심부분에서 가까이 위치하고 tight한 형태를 보이고, 그 주위를 myoepithelial cells가 감싸는 형태를 보였다(Fig. 1B). 이러한 양상은 세포 배양 5일째까지 지속적으로 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 7일 이후부터는 luminal epithelial cells가 점차 myoepithelial cells로 바뀌는 것을 볼 수 있었다 [14]. 이것은 PNA+ cells의 위치가 Thy-1.1+의 위치와 거의 일치하는 것과 PNA+ cells의 모양이 Thy-1.1+ cells와 같이 크고 길쭉하게 변화하는 데서 알 수 있었다(Fig. 1D). 세포배양 7일 이후부터 14일째까지는 7일째와 거의 비슷한 양상을 보였다. 결과는 1일, 3일, 5일, 7일째의 세포배양과 면역 현광 염색으로 나타내었다(Fig. 1).

랫드 유선 상피 세포에서 Gap junction의 존재 확인
RMEC에서 gap junction protein의 유무를 확인하기 위

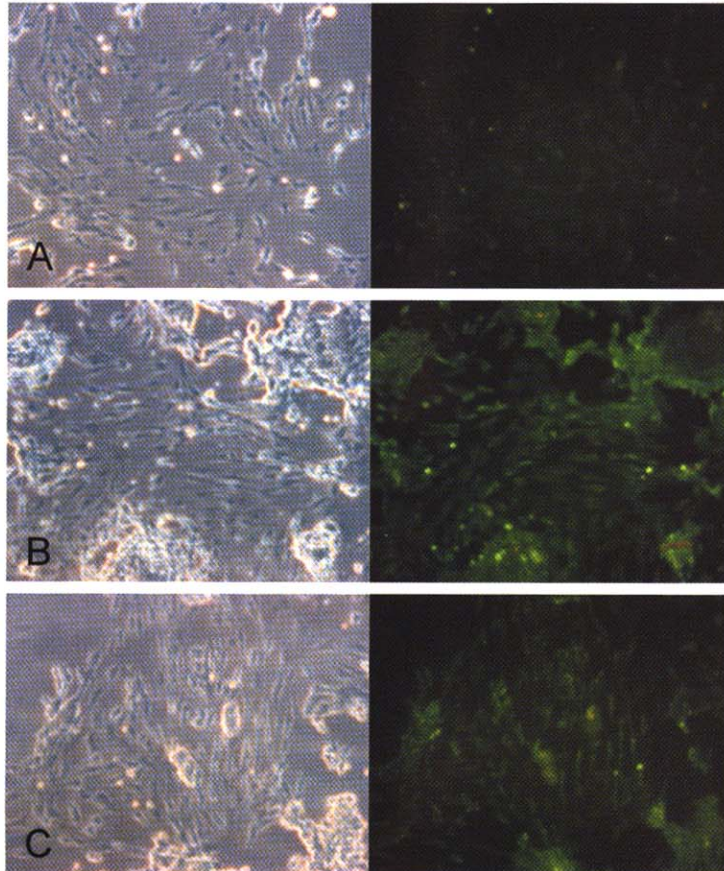


Fig. 2. Immunostaining of RMEC in primary culture in DMEM/F-12 for Cx26(A), Cx32(B) and Cx43(C) ($\times 100$).

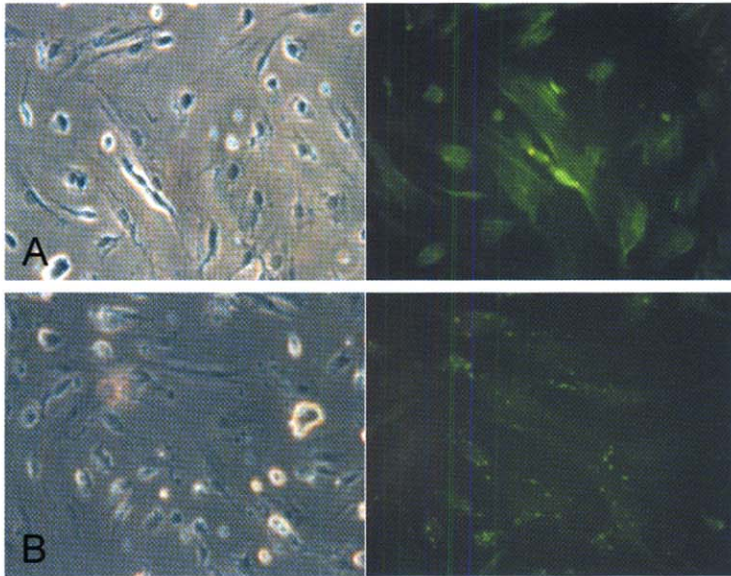


Fig. 3. Immunostaining of RMEC in primary culture in DMEM/F-12 for Cx32(A) and Cx43(B) (x400).

해서 면역 현광 염색을 실시하였다. Rat mammary gland 에서 major gap junction proteins로 알려져 있는 Cx26, Cx32, Cx43의 각 antibody를 이용하여 이들의 존재를 확인하였다(Fig. 2-3). Cx43의 경우, 세포와 세포사이에서 plaque를 형성하여 세포막에 gap junction이 띠모양으로 관찰되었다(Fig. 2C, 3B). Cx32의 경우, 세포질 내 filament에 강하게 발현하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B, 3A). Cx26의 경우는 다른 Cxs과는 달리 면역 현광 염색을 통해서 존재 여부를 확인하기에는 어려움이 있었다(Fig. 2A). 그러나 western blot analysis를 통해서 Cx26, Cx32, Cx43의 존재를 확인하였다 (Fig. 4).

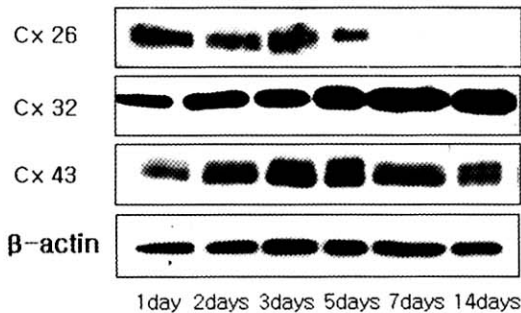


Fig. 4. Western blot analysis of Cx26, Cx32 and Cx43 proteins in RMEC during culture in DMEM/F-12.

랫드 유선 상피 세포의 성장에 따른 gap junction의 발현 양상 확인

Gap junction proteins의 존재를 확인하였으므로, RMEC이 성장에 따라 gap junction 발현 양상의 변화를 관찰하였다. Western blot analysis를 통해서 Cx26, Cx32, Cx43 각각의 발현 양상을 세포배양 1일, 2일, 3일, 5일 7일 그리고 14일째에 확인하였다. Cx26은 세포배양 초기에 강하게 발현되다가 세포배양 5일째부터 점차 발현이 감소되는 되다가 7일 이후부터는 약하게 발현하거나 거의 발현하지 않았다. Cx32의 경우, 세포배양 초기에서부터 발현이 존재하고 점차 발현이 증가하다가 7일 이후부터는 거의 동일량의 발현을 관찰할 수 있었다. Cx43은 초기부터 발현하다가 세포배양 2일째부터 증가하기 시작하여 5일째에 발현이 최고치에 이르고, 이후로 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4).

고찰

본 실험은 RMEC의 세포 배양법의 확립과 세포 타입의 분리 및 특성 확인 그리고 gap junction의 발현 여부와 발현 양상에 대해서 연구하였다. 특히 RMEC의 경우는 알려진 다른 종의 mammary epithelial cells보다 분리가 쉽지 않을 뿐만 아니라, 랫드 유선에서 분리된 세포에 대한 연구도 많이 이루어지지 않았다는 점에서 이번 실험의 중요성을 말할 수 있다. 먼저 면역 현광 염색

을 통해서 RMEC의 특성을 알아보았는데, RMEC는 luminal epithelial cells과 myoepithelial cells로 구분할 수 있었다 [14]. 이것을 우리가 확립한 culture system에서 RMEC를 배양하여 확인하였다.

RMEC는 primary culture를 통해서 얻게 되는데, 세포는 organoid가 culture dish의 바닥에 붙어서 그 organoid에서 천천히 자란다. 형태학적으로 RMEC는 크게 2가지로 구분된다. Small cuboidal하고 cobblestone 형태이며 tight하게 뭉쳐서 organoid로 성장하는 세포 타입이 있고, 이해 비해 비교적 크고 긴 형태의 세포로 외각을 감싸고 있거나 epithelial conoly들 사이에서 관찰할 수 있는 세포 타입으로 구분할 수 있다. 전자와 같은 세포 타입은 luminal epithelial cells로서 PNA-FITC에 의해서 특이적으로 염색할 수 있었고, 후자와 같은 세포 타입은 myoepithelial cells로서 Thy-1.1-PE에 의해서 특이적으로 염색할 수 있었다. RMEC는 배양 1일째에는 세포간에 뚜렷한 구분은 할 수 없었지만, 배양 3일째부터 5일째 사이에는 PNA+ 세포와 Thy-1.1+ 세포사이의 구분이 뚜렷해졌다. 그러나 세포 배양 7일부터는 PNA+ 세포가 점차 줄어들면서 Thy-1.1+ 세포로 바뀌는 현상을 확인할 수 있었다. 즉 7일 이후부터는 luminal epithelial cells가 점차 myoepithelial cells로 바뀌는 것을 확인할 수 있었다 [14].

또한 RMEC culture에서의 세포간의 gap junction을 통한 세포간 교통을 알아보았다. *In vivo*에서는 이미 rat mammary gland cell types에 따라 gap junction의 변화 양상 pattern이 확인되어 있다 [19]. Rat mammary gland에서 major gap junction proteins인 Cx26, Cx32 그리고 Cx43중에서 Cx26과 Cx32의 경우는 주로 luminal epithelial cells에서 발현하는 것으로 알려져 있고, Cx43의 경우는 myoepithelial cells에서 많이 발현하는 것으로 알려져 있다 [20]. Connexin proteins 중 Cx26, Cx32의 경우는 rat에서 임신 전에는 발현을 관찰할 수 없다가 임신 기간에 발현을 관찰할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이들의 발현위치는 동일하다고 알려져 있으며 유즙의 분비나 특히 임신중에 유선의 성장에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다 [13, 15]. Cx43의 경우는 임신 전이나 임신기간에도 발현을 관찰할 수 있으나, 분만 후에는 발현양이 급격하게 감소하고, phosphorylation states가 부수적으로 나타난다고 알려져 있다. 임신전의 유선의 발달에 Cx43이 중요한 조절인자라고 생각되어진다. 이러한 gap junction proteins의 발현 pattern의 변화는 랫드 유선 상피 세포의 성장과 조절 뿐만 아니라 분화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [15, 19]. 이번 실험에서는 RMEC의 세포 배양 상태에서 면역 현광 염색으로 Cx26, Cx32, Cx 43의 존재를 확

인하였고, western blot analysis를 통해서 culture 일령에 따른 connexin proteins의 발현 양상을 확인하였다(Fig. 2-3).

Cx26의 경우는 면역 현광 염색으로는 존재를 확인하기 힘들었지만, western blot analysis에서는 확인할 수 있었다(Fig. 2A, Fig. 4). Cx32의 경우에는 고배율로 관찰한 결과 세포의 filament 부위에 염색된 것 같은 결과를 얻었다(Fig. 3A). Cx43의 경우는 고배율로 관찰한 결과 gap junction protiens의 전형적인 모습인 세포와 세포사이의 인접한 부분에 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 3B).

Western blot analysis를 실시하여 RMEC 세포 배양 1일, 2일, 3일, 5일, 7일, 14일 사이에 각 connexin proteins의 발현 양상을 관찰한 결과 Cx26은 세포배양 초기에 강하게 발현되다가 세포배양 5일째부터 점차 발현이 감소하다가 7일 이후부터는 약하게 발현하거나 거의 발현하지 않았다. Cx32의 경우는 세포배양 초기에서부터 발현이 존재하고 점차 발현이 증가하다가 7일 이후부터는 거의 동일한양의 발현을 관찰할 수 있었다. Cx43은 초기부터 발현하다가 세포배양 2일째부터 증가하기 시작하여 5일째에 발현이 최고치에 이르고 이후로 점차 감소하는 양상을 보였다(Fig. 4). Cx26과 Cx32의 gap junction 발현 양상 변화 pattern의 경우는 luminal epithelial cells에 이들이 많이 존재한다는 것으로 유추해 볼 때, luminal epithelial cells가 세포배양 초반에 증가하다가 7일째 이후부터는 점차 myoepithelial cells로 바뀌는 것에 따라서 Cx26의 gap junction 발현 양상이 줄어드는 결과를 볼 수 있었다. Cx32의 경우는 RMEC 세포 배양 일령에 관계없이 항상 존재하는 것으로 볼 때 luminal epithelial cells 뿐만 아니라 인접하고 있는 myoepithelial cells에도 연관이 있는 것으로 추측된다. Myoepithelial cells에서 많이 존재한다고 알려져 있는 Cx43의 경우는 세포배양 7일째 이후부터 발현양이 줄어드는 것으로 볼 때 luminal epithelial cells에 존재하던 Cx32가 myoepithelial cells로 세포 type이 변환되면서 Cx43의 역할을 대신하는 것으로 추측된다(Fig. 4).

위의 결과를 종합해 볼 때, gap junction proteins는 RMEC 각 세포 타입의 성장과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되어진다. 특히 Cx26은 세포 배양 초반의 luminal epithelial cells의 성장에 관련이 있다고 생각되어지고, Cx32는 luminal epithelial cells 뿐만 아니라 세포 배양 후반으로 들어 myoepithelial cells로 변환된 luminal epithelial cells에도 관련 있는 것으로 보여진다. Cx43은 myoepithelial cells의 성장과 분화에 관련이 있는 것으로 생각되어진다.

결 론

본 실험에서는 랫드 유선 상피 세포의 배양법의 확립 및 특징을 확인하고, RMEC 세포에서 아직 밝혀지지 않은 gap junction 단백질의 발현 양상을 밝히고자 하였다. RMEC는 luminal epithelial cells와 myoepithelial cells 2가지 type으로 나눌 수 있음을 확인하였다. gap junctional intercellular communication이 발현 양상은 RMEC에서 각 세포의 타입에 따라서 Cx26은 세포 배양 후반에 줄어들고, Cx32는 발현이 거의 일정하고, Cx43은 세포 배양 중반까지 늘어나다가 이후로는 점차 감소하는 경향을 보였다. 따라서 gap junction은 RMEC 각 세포타입의 성장과 분화에 영향을 주며, 복잡한 발현 양상을 보이므로 앞으로 gap junction과 RMEC의 상관관계에 대해 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bruzzone, R., White, T. W. and Paul, D. L. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur. J. Biochem.* 1996, **15**, 238, 1-27.
2. Cho, J. H., Cho, S. D., Hu, H., Kim, S. H., Lee, S. K., Lee, Y. S. and Kang, K. S. 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* 2002, **23**, 1163-1169.
3. Dulbecco, R., Allen, W. R., Bologna, M. and Bowman, M. Marker evolution during the development of the rat mammary gland: stem cells identified by markers and the role of myoepithelial cells. *Cancer Res.* 1986, **46**(5), 2449-2456.
4. El-Fouly, M. H., Trosko, J. E. and Chang, C. C. Scrape-loading and dye transfer. A rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. *Exp. Cell. Res.* 1987, **168**, 422-430.
5. Friend, D. S. and Gilula, N. B. Variations in tight and gap junctions in mammalian tissues. *J. Cell Biol.* 1972, **53**, 758-776.
6. Hayashi, T., Matesic, D. F., Nomata, K., Kang, K. S., Chang, C. C. and Trosko, J. E. Stimulation of cell proliferation and inhibition of gap junctional intercellular communication by linoleic acid. *Cancer Lett.* 1997, **112**, 103-111.
7. Hollman, K. H. Lactation: A Comprehensive Treatise. pp. 3-37, Academic Press, New York, 1974.
8. Kang, K. S., Kang, B. C., Lee, B. J., Che, J. H., Li, G. X., Trosko, J. E. and Lee, Y. S. Preventive effect of epicatechin and ginsenoside Rb(2) on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA and H₂O₂. *Cancer Lett.* 2000, **152**, 97-106.
9. Kang, K. S., Morita, I., Cruz, A., Jeon, Y. J., Trosko, J. E. and Chang, C. C. Expression of estrogen receptors in a normal human breast epithelial cell type with luminal and stem cell characteristics and its neoplastically transformed cell lines. *Carcinogenesis* 1997, **18**, 251-257.
10. Kang, K. S., Yun, J. W., Yoon, B., Lim, Y. K. and Lee, Y. S. Preventive effect of germanium dioxide on the inhibition of gap junctional intercellular communication by TPA. *Cancer Lett.* 2000, **152**, 97-106.
11. Kumar, N. M. and Gilula, N. B. The gap junction communication channel. *Cell.* 1996, **84**, 381-388.
12. Loewenstein, W. R. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol. Rev.* 1981, **61**, 829-913.
13. Monaghan, P., Perusinghe, N., Carlile, G. and Evans, W. H. Rapid modulation of gap junction expression in mouse mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *J. Histochem Cytochem.* 1994, **42**, 931-938.
14. Nam, D. K. and Kelly, H. C. Characterization of Rat Mammary Epithelial Cell Subpopulations by Peanut Lectin and Anti-THT-1.1 Antibody and Study of Flow-Sorted Cells *in Vivo*. *Exp. Cell Res.* 1993, **207**, 74-85.
15. Pozzi, A., Risek, B., Kiang, D. T., Gilula, N. B. and Kumar, N. M. Analysis of multiple gap junction gene products in the rodent and human mammary gland. *Exp. Cell Res.* 1995, **220**, 212-219.
16. Rudland, P. S. and Barraclough, R. Stem cells in mammary gland differentiation and cancer. *J. Cell. Sci. Suppl.* 1988, **10**, 95-114.
17. Saez, J. C., Connor, J. A., Spray, D. C. and Bennett, M. V. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, **86**, 2708-2712.
18. Vorherr, H. The Breast, Morphology, Physiology, and Lactation. pp. 1, Academic Press, New York, 1974.
19. Yamanaka, I., Kuraoka, A., Inai, T., Ishibashi, T. and Shibata, Y. Differential expression of major gap junction proteins, connexins 26 and 32, in rat mammary glands during pregnancy and lactation. *Histochem. Cell Biol.* 2001, **115**, 277-284.

20. **Yamanaka, I., Kuraoka, A., Inai, T., Ishibashi, T. and Shibata, Y.** Changes in the phosphorylation states of connexin43 in myoepithelial cells of lactating rat mammary glands. *Eur. J. Cell Biol.* 1997, **72**, 166-173.