

H₂O₂에 의한 결막 세포주의 세포고사에서 녹차추출물 EGCG의 보호효과

박수경 · 채수철 · 고은경 · 유근창* · 김재민** · 나명석*** · 이종빈

전남대학교 생물학과, *동신대학교 안경광학과,
건양대학교 안경광학과, *광주여자대학교 미용과학과
투고일(2008년 7월 24일), 수정일(2008년 8월 15일), 게재확정일(2008년 9월 10일)

목적: 활성산소종의 하나인 H₂O₂는 DNA, RNA에 직접적인 손상을 주어 유전자를 변형시키고 세포고사를 일으켜 각종 질환을 일으키는 발병원자로 알려져 있다. 본 연구는 결막 세포주에서 일어나는 H₂O₂에 의한 세포고사에서 EGCG의 보호효과를 알아보고자 실험하였다. **방법:** 세포의 생존율은 MTT assay로 확인하였고, 세포고사의 형태적인 특징은 DNA 단절화를 통해 확인하였으며, EGCG의 자유라디칼 제거능력을 측정하기 위해 DPPH free radical 소거능을 실시하고, 세포내 활성산소량의 평가를 위한 DCFH-DA assay를 시행하였다. 세포내의 mRNA 발현은 RT-PCR을 시행하여 밴드 양상을 확인하였다. **결과:** 세포생존율과 프리라디칼 소거능은 EGCG의 처리 농도 의존적으로 증가하였고, DNA 분절화와 세포내 활성산소량은 감소하였다. mRNA 합성에서 *bcl-2*, *bcl-xL*의 발현은 증가하였고, *bax* 발현은 감소되었다. **결론:** EGCG는 H₂O₂로 세포고사를 유도한 결막 세포주에서 항산화효과를 나타냈으며, EGCG가 anti-apoptosis 관련한 mRNA의 발현을 증가시켜 결막 세포주의 산화적 손상을 억제함으로써 세포보호효과를 나타냈음을 확인할 수 있었다.

주제어: Conjunctival cell line, Cytotoxicity, EGCG, H₂O₂, ROS

서 론

활성산소는 superoxide radical($\cdot\text{O}_2^-$), hydroxy radical ($\cdot\text{OH}$), hydrogen peroxide(H₂O₂) 등이 있으며 인체 내의 각 장기와 조직 및 호기성 세포의 산소대사과정 중 부산물로서 생성되는데 이 활성산소는 뇌질환, 심혈관계질환, 퇴행성관절염 등 여러 가지 퇴행성질환 등의 발병원자로 인식되고 있으며¹, 노년 백내장, 녹내장, 황반변성 등의 안과질환과 각종 암을 유발하고, 피부 등의 노화를 촉진시키는 기작으로 인해 의학적인 관심이 증대되고 있다^{2,3}. 결막 세포는 외부의 환경적 요인에 쉽게 노출될 수 있는 안구 외안부에 위치하고 있다. 결막세포에서 나타나는 질환 중 검열반이나 익상편은 자외선이나 먼지 등의 자극으로 인해 유발된다고 알려져 있으며, 이외에 악성흑색종과 같은 암도 보고되어 있어⁴ 결막세포와 활성산소의 관계는 중요한 의미를 갖는다. 활성산소로 인한 산화스트레스를 완화 및 억제시키는 방법으로서 항산화 물질의 첨가가 효과가 있는 것으로 알려지면서 천연 또는 합성 항산화 물질을 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다^{5,6}.

녹차에서 추출한 여러 가지 구성성분 중에서 epigallocatechin gallate(EGCG)는 가장 강력한 생물학적 작용을 가진 것으로 알려졌고, 그 작용이 여러 가지 질환들에서 증명되어 왔다⁷. 대표적인 질환으로서 여러 종류의 악성암^{8,9}, 심혈관질환¹⁰, 퇴행성 질환들^{11,12}에서의 연구 결과들이 보고되었다. 한편으로 암조직에서는 EGCG가 암세포의 세포자연사를 촉진한다고 알려져 있는 반면¹³, 신경병성질환이나 피부질환에서는 오히려 해로운 외부 자극들에 의한 세포자연사를 방지하는 것으로 보고되었다^{11,12}. 이러한 상반된 현상은 EGCG가 세포 종류와 그 농도에 따라 정반대의 생물학적인 효과를 나타내기 때문인 것으로 생각되고 있다. EGCG는 항산화제로 잘 알려진 비타민 C보다 항산화 효과가 10배나 높다고 알려져 있다¹⁴. 최근에는 앞 내용의 여러 가지 생물학적 활성효과가 고전적으로 생각했던 항산화제로서의 효과 뿐만 아니라 EGCG와 그것의 여러 가지 대사물들이 세포 내에서 신호 전달 체계에 관여하고 그러한 것들을 변화시킴으로써 다양한 효과를 보인다고 알려져 있다¹⁵.

따라서 본 연구는 H₂O₂에 의하여 결막세포주 내에서 일

어란 손상정도를 확인하고 이러한 과정 중에 세포고사를 조절하는 유전자들의 변화를 관찰함으로써 활성산소에 의한 결막 세포주에서의 반응을 알아보려고 하였고, 천연항산화제로 알려져 있는 EGCG의 보호효과 및 기전을 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

본 실험에 사용된 사람의 결막세포인 clone 1-5c-4 세포주를 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, Korea)으로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 10%의 fetal bovine serum(FBS), fungizone, antibiotics를 함유한 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배양액을 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기(Forma Scientific, USA)에서 배양하였다.

2. EGCG의 처리농도

EGCG ((-)-epigallocatechin-3-gallate, (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate: Sigma, USA)은 배양액에 녹인 후 일정량으로 분주된 clone 1-5c-4 세포주에 40 µM부터 200 µM까지 농도별로 처리 후 24시간 배양하여 대조군과 처리군의 세포독성 정도를 비교하였다.

3. 세포생존율 분석

Clone 1-5c-4 세포주를 1×10⁴ cells/well 세포수로 plate에 분주하여 24시간 동안 배양 후 무혈청 배지로 교체하여 농도별로 EGCG를 첨가하여 2시간 전처리 하고 100 µM의 H₂O₂를 후처리 하여 6시간 배양하였다. 배양 후 MTT(200 µg/ml)가 포함된 배양액으로 교환하여 3시간 동안 반응시켰다¹⁶. Formazan이 형성되면 배양액을 버리고 DMSO(dimethylsulfoxide: Sigma, USA)를 200 µl/well씩을 넣어 15분간 실온 방치하여 formazan을 용해시킨 후 ELISA plate reader(Bio-Tech, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다¹⁷.

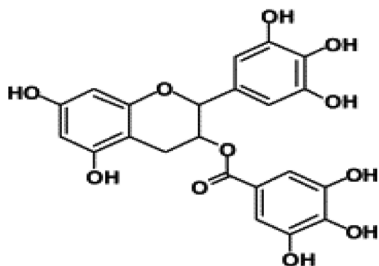


Fig. 1. Chemical structure of EGCG.

4. DNA 분절화

DNA extraction은 Bioneer Co.(Chungbuk, Korea)의 Accu-Perp® Genomic DNA extraction kit를 사용하였다. H₂O₂에 의해 세포사멸이 유도된 세포에서 EGCG의 세포보호에 대한 생화학적 변화는 DNA 분절화를 통해 확인하고자 아갈로스 겔 전기영동을 시행하여 밴드 양상을 관찰하고 사진을 촬영하였다.

5. DPPH 자유라디칼 소거능 측정

EGCG의 자유라디칼 제거효과를 알아보기 위한 항산화 활성 검정은 Abe¹⁸의 방법에 의하여 안정한 라디칼인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH: Sigma, USA)에 대한 소거능을 측정하였다. 여러 농도의 시료를 메탄올에 용해한 후, 1.5 mM의 DPPH 메탄올 용액 1 ml를 첨가한 후 암실에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 활성산소종(ROS) 측정

Clone 1-5c-4 세포주를 1×10⁴ cells/well 세포수를 분주하여 24시간 배양 후 EGCG를 농도별로 처리하여 2시간 동안 배양하였다. 세포내 활성산소를 측정하기 위해 25 µM의 DCFH-DA를 첨가하여 15분 배양하고, 100 µM H₂O₂ 처리한 후 0분, 15분 30분에 걸쳐 흥분파장을 485 nm, 방출파장을 535 nm로 고정하여 형광분광광도계(Fluoroskan Ascent FL600, UK)를 이용하여 fluorescence를 측정하였다. 실험결과는 DCFH-DA를 처리하지 않은 well에서 측정된 fluorescence 값으로 보정하였다¹⁹.

7. RT-PCR

세포고사에 관련된 mRNA 변화를 관찰하기 위해 역전사 중합효소반응(RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction)을 실시하였다. cDNA를 합성은 reverse transcription kit(Promega, USA)를 사용하였고 사용된 primer는 *bcl-2*, *bcl-xL*, *bax* 이다.

8. 자료의 통계처리

통계학적 유의성 검정은 Student t-test 방법을 사용했으며, 유의수준 p<0.05의 범위 내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준편차로 나타내었다.

결 과

1. 세포생존율 검정

1) EGCG 자체의 세포독성 측정

Clone 1-5c-4 세포주를 96-well plate에서 24시간 동안 배양한 후 EGCG을 농도로 처리하여 24시간 동안 배양한

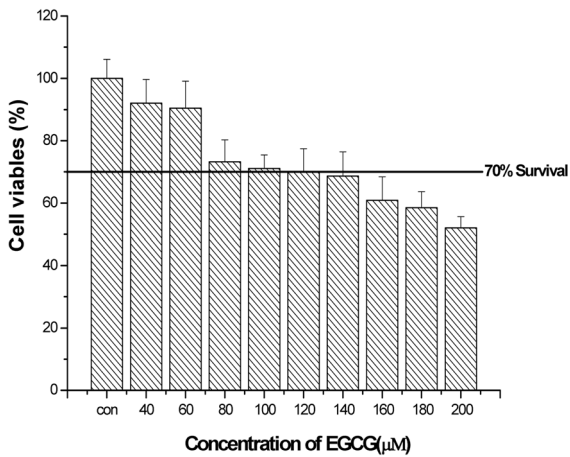


Fig. 2. Effects of concentration of EGCG on the viability of clone 1-5c-4 cell line assessed with the MTT assay that was determined by measuring optical density at 570 nm.

후 MTT assay를 실시하였다. 그 결과 100 μM 이하의 EGCG 농도에서는 세포증식 저해가 30%를 넘지 않는 것으로 나타났으며, 100 μM에서는 71.1±4.3%의 세포 생존율을 나타냈다. EGCG의 처리농도 의존적으로 세포 독성이 더 강해지는 것을 관찰하였다(Fig. 2).

2) H₂O₂에 의한 세포독성에 대한 EGCG의 보호효과

Clone 1-5c-4 세포주에 IC₅₀값에 가까운 농도인 100 μM의 H₂O₂를 6시간 처리 하였을 때 생존율이 IC₅₀값 이하로 나타났기 때문에 EGCG의 보호효과 유무를 알아보기 위해 clone 1-5c-4 세포주를 24시간 동안 배양한 후 100 μM

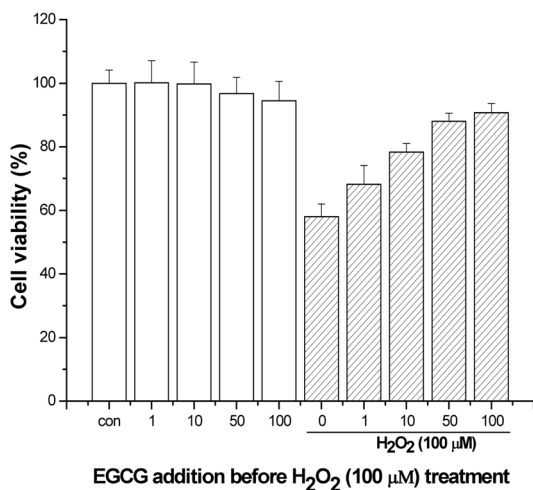


Fig. 3. Protective effects of EGCG on against H₂O₂-induced cytotoxicity of clone 1-5c-4 cell line. Cells were incubated with EGCG 0, 1, 10, 50, 100 μM for 2 hrs. After incubation, cells were treated with 100 μM H₂O₂ for 6 hrs. Cell viability was assayed by using MTT as described in Material and Methods.

의 EGCG를 2시간 동안 전처리하고, 100 μM의 H₂O₂를 후처리한 다음 6시간 후에 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 전처리 하지 않은 실험군은 58±3.99% 이하의 세포생존율을 나타낸 반면, EGCG를 각각의 농도 1, 10, 50, 100 μM 처리한 실험군에서는 농도별로 각각 68.2, 78.3, 88, 90.7% 생존율을 나타내어 농도 의존적으로 세포생존율이 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 3).

2. DNA 분절화

H₂O₂에 의한 세포고사 정도와 EGCG의 세포 보호효과를 아갈로스 겔 전기영동을 통해 DNA 분절화 현상을 관찰하였다. 100 μM의 H₂O₂를 6시간 단독 처리했을 때 DNA 분절화가 일어났으나 EGCG를 첨가한 실험군에서는 EGCG의 처리농도 의존적으로 DNA 분절화 현상이 점차 억제되었다(Fig. 4).

3. DPPH 자유라디칼 소거능 측정

H₂O₂로 유발된 세포사멸을 대해 보호효과를 나타낸

H ₂ O ₂ (100 μM)	-	+	+	+	+	+
EGCG (μM)	-	-	1	10	50	100

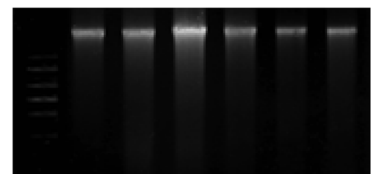


Fig. 4. Analysis of DNA fragmentation in the clone 1-5c-4 cell lines. Cells were incubated with EGCG 0, 1, 10, 50, 100 μM for 2 hrs. After incubation, cells were treated with 100 μM H₂O₂ for 6 hrs.

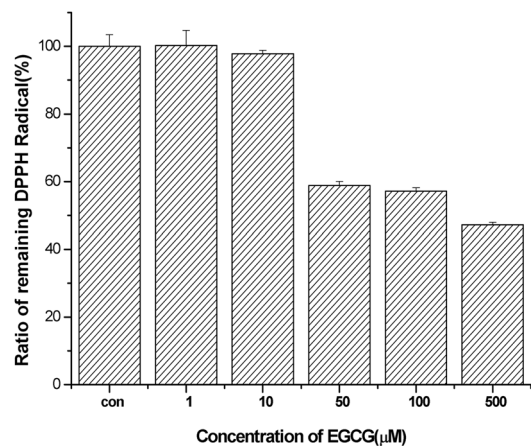


Fig. 5. Free radical scavenging activity of EGCG measured with DPPH assay. EGCG of 1, 10, 50 and 100 μM was treated to 100 μM DPPH solution at room temperature about 30 minutes.

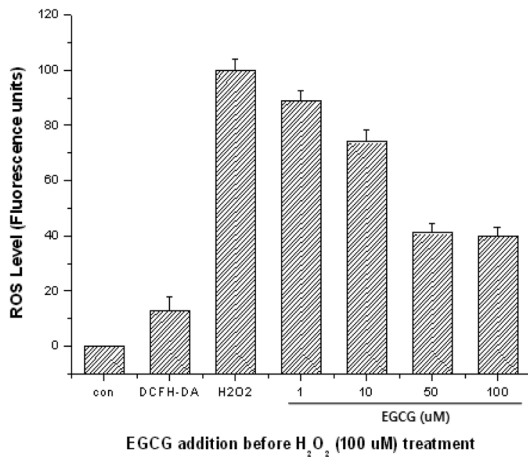


Fig. 6. Inhibitory effect of EGCG on ROS production by H₂O₂ treatment with EGCG in clone 1-5c-4 cell line measured by DCFH-DA assay. ROS levels are represented by relative fluorescence units.

EGCG의 항산화 활성도를 측정하였다. EGCG의 농도별로 각각 1, 10, 50, 100, 500 μM씩 반응시켰을 때, 남아있는 라디칼의 양은 농도에 따라 각각 100.23, 97.85, 58.81, 57.14, 47.23%를 나타내었으며 EGCG의 농도 의존적인 자유 라디칼의 소거효과가 관찰되었다(Fig. 5).

4. 활성산소종(ROS) 측정

처리 즉시 측정값은 EGCG의 처리군과 무처리군의 값이 큰 차이를 나타내지 않았지만, 15분 경과 시 EGCG의 처리농도 별로 1, 10, 50, 100 μM의 경우 대조군에 비해 각각 89%, 74.1%, 41.1%, 40%로서 농도별로 ROS 생성량이 점차 감소되었다. 즉, EGCG의 처리농도 의존적으로 ROS 생성량은 감소되었고, 산화적 스트레스 억제 효과를 보여주었다(Fig. 6).

5. 역전사중합연쇄반응(RT-PCR)

H₂O₂만 단독 처리된 실험군에서는 *bax* mRNA가 활성화되고 *bcl-2*와 *bcl-xL* mRNA는 활성이 억제되었으나, EGCG의 농도가 증가할수록 이와는 반대로 *bcl-2*와 *bcl-xL* mRNA의 활성이 증가되었으며 *bax* mRNA 양은 점차 억제되었다. 이는 *bcl-2*의 증가로 인하여 *bax*의 발현이 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 7).

고 찰

본 연구는 활성산소가 결막 세포주에 미치는 영향 정도를 평가하고 천연물인 녹차추출물 EGCG의 항산화 작용과 자유라디칼 소거작용 및 이에 의한 산화적 세포독성 억제효과 등을 검토하였다. 활성산소는 인체의 대사과정

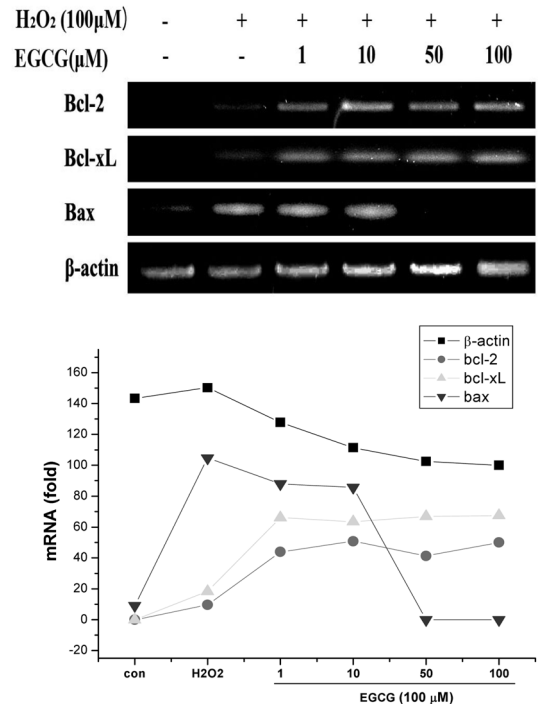


Fig. 7. RT-PCR for the *bcl-2*, *bcl-xL*, *bax*, β -actin mRNA in expression of clone 1-5c-4 cell line. Cells were incubated with EGCG 0, 1, 10, 50, 100 μM for 2 hrs. After incubation, cells were treated with 100 μM H₂O₂ for 6 hrs.

중 미토콘드리아 내에서 전자전달계에 의해 소량 생성되며, 또는 세포질, 대식세포, 백혈구에서도 생성되며²⁰ 이외에도 세포 호흡과정이나 여러 종류의 호르몬, 성장인자, 사이토카인 및 신경전달물질 등이 세포막 수용체를 통해, 신호를 전달하는 과정에서 발생한다²¹. 활성산소는 세포내 항산화체계에 영향을 주어 세포막의 지질과산화 반응을 촉진시키며, 리포푸신(lipofuscin)이나 malondialdehyde (MDA) 및 카르보닐기 등을 세포나 조직에서 증가시킴으로서 세포손상을 가속화시킨다. 또한 메타보트립 수용체는 양이온의 이동과는 관련이 없으나, 이의 활성화는 G-protein을 통해 phospholipase C를 활성화시키며 이는 PIP2(phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate)를 IP3(inositol triphosphate)과 DAG(diacylglycerol)로 분해 시켜 세포내 칼슘 증가와 protein kinase C를 활성화시키고 나아가 *c-fos*나 *c-myc* gene의 발현을 통해 결국 세포를 퇴화시킨다. 또, 활성산소는 항산화계에 영향을 주어 superoxide dismutase(SOD)나 catalase(CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) 등과 같은 항산화효소의 활성을 저해함으로써 세포의 산화적 손상을 초래하게 된다²². 부분적으로는 외부에서 항산화제를 투여함으로 산화적 스트레스를 조절할 수 있는데, 항산화제는 천연물질로부터 얻거나, 화합물의 합성에 의해 얻어질 수 있어 외인성 활성산소에 의한 생

체의 산화를 효과적으로 줄일 수 있다.

세포내 존재하는 라디칼의 양은 EGCG의 농도에 따라 감소하여 EGCG의 농도 의존적으로 자유라디칼의 소거 효과가 있음을 알 수 있었다. H₂O₂의 농도와 노출 시간에 따른 세포생존정도는 처리농도 100 μM(24시간)일 때 65.62%의 세포생존율을 나타내었다. 동일 시간동안 H₂O₂를 노출시킨 각각의 세포에 대해 망막색소상피세포에서는 400 μM일 때 60%의 생존율을²³, 뇌신경세포에서는 약 400 μM일 때 50%의 생존율을²⁴, 난소세포에서는 500 μM일 때 51%의 세포생존율을²⁵ 나타내어 상대적으로 결막 세포주는 저농도에서 산화적 손상을 많이 받았음을 알 수 있었다. EGCG의 보호효과를 알아보기 위해 EGCG를 농도별로 전 처리한 결과 처리농도 의존적으로 세포생존율이 증가하였다. H₂O₂의 단독 처리군인 58%의 생존율을 비교했을 때, H₂O₂로 유도된 세포손상에 대하여 보호효과를 나타냈음을 관찰하였다. 세포내 존재하는 ROS양은 EGCG 구조상 특징과 관련이 있다. EGCG는 flavan-3 구조의 페놀 화합물로서 특히 B ring에 존재하는 최소한 한 개의 ortho-dihydroxy기와 3번 위치에 있는 gallate와의 에스테르에서 3개의 수산화기는 이들의 라디칼 소거활성의 효과를 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그리고 B ring의 5번 위치에 추가된 수산기 또한 이들의 소거활성에 기여하고 있다²⁶. 무처리군을 100%로 환산하였을 때, EGCG의 처리 농도가 1, 10, 50, 100 μM일 경우 각각 103.59%, 100.72%, 55.49%, 57.85%를 자유라디칼 소거능을 나타내었다. 세포손상정도는 DNA 분절화 현상을 통해 관찰할 수 있었다. 본 실험결과 H₂O₂에 의해 DNA 분절화 현상을 나타냈었으며 EGCG의 처리 농도 의존적으로 DNA 분절화 현상이 점차 감소함을 관찰할 수 있었다.

활성산소종은 세포고사의 과정에서 중요한 요소로 작용되어지므로 EGCG의 처리로 인한 세포고사를 억제하는 작용기전을 mRNA 발현수준에서 확인하였다. *bcl-2* 계열의 단백질은 세포고사를 조절하는 중요한 인자로, 구조적으로 유사하지만 생물학 기능에 따라 세포고사를 억제시키는 군(*bcl-2*, *bcl-xL*)과 항진시키는 군(*bax*)으로 나뉜다. *Bcl-xL*은 23kDa이며, *bcl-2* 유전자는 26kDa 정도의 단백질로 여포림프종에서 t(14:18)염색체 전좌와 관련이 있으며, 세포고사 시 발생하는 cytochrome C의 세포질 방출을 억제하여 세포의 수명을 연장시켜 세포고사를 억제한다²⁷. *Bax*는 *bcl-2*와 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에 기능이 억제하는데, 분리되면 직접 혹은 간접적인 경로를 통해 세포고사를 촉진하는 것으로 알려져 있다²⁸. 본 실험결과 역시 EGCG의 농도별 처리에 의해 *bcl-2*와 *bcl-xL*의 mRNA는 발현이 증가되었으나, 이와 반대로 *bax* mRNA의 발현은 감소하였다. 따라서 EGCG는 자유라디칼에 의

한 노화 및 암에 관련된 안과질환의 예방제로서, 또는 약물로서 첨가하는데 있어 응용가능성이 높은 물질로 판단된다.

결 론

결막 세포주는 100 μM 농도의 H₂O₂에 의해 세포고사가 유도됐음을 확인하였다. 다른 세포주와 비교하였을 때 저농도에서의 세포고사 발생은 안구의 외안부에 위치한 결막세포가 자외선이나 각종 약물에 의해 발생하는 산소라디칼의 영향에 쉽게 노출될 수 있음을 의미한다. 천연 항산화제로 알려진 EGCG는 자유라디칼 소거작용을 통해, 세포내 ROS의 농도를 감소시키는 항산화 활성을 보여 이로 인해 산소 라디칼에 의한 산화적 손상에 대한 세포보호기능이 있음을 나타냈다. 따라서 EGCG를 첨가하는 사용허용범위와 이와 더불어 콘택트렌즈에서 소독제로 사용되는 H₂O₂의 허용범위농도를 조절할 수 있는 기초 자료로 활용될 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Feher J., Cosmos G., and Vereckei A., "The free radical theory of aging", *Mol. Cell Biochem.*, 84(2):155-161(1988).
2. Ferreira S. M., Lerner S. F., Brunzini, R., Evelson P. A., and Llesuy S. F., "Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients", *Am. J. Ophthalmol.*, 137(1): 62-69(2004).
3. Reiter R. J., "Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain", *J. FASEB.*, 9(7):526-533 (1995).
4. 윤동호, 이상욱, 최억, "안과학", 제6판, 일조각, pp. 124-127(2002).
5. Plastow S. R., Lovell C. R., and Young A. R., "UVB-induced collagen changes in the skin of the hairless albino-mouse", *J. Invest. Dermatol.*, 88(2):145-148(1987).
6. Branen A. L., "Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene", *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 52(1):59-63(1975).
7. Beecher G. R., Warden B. A., and Merken H., "Analysis of tea polyphenols", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220(4):267-70(1999).
8. Liang Y. C., Lin-shiau S. Y., Chen C. F., and Lin J. K., "Suppression of extracellular signals and cell proliferation through EGF receptor binding by (-)-epigallocatechin gallate in human A431 epidermoid carcinoma cells", *J. Cell Biochem.*, 67(1):55-65(1998).
9. Sachinidis A., Seul C., Seewald S., Ahn H., Ko Y., and Vetter H., "Green tea compounds inhibit tyrosine phosphorylation of PDGF β-receptor and transformation of A172 human glioblastoma", *FEBS. Lett.*, 471(1):51-55(2000).

10. Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A., Hakulinen T., and Aromaa A., "Flavonoid intake and risk of chronic diseases", *Am. J. Clin. Nutr.*, 76(3):560-8(2002).
11. Koh S. H., Kwon H., Kim K. S., Kim J., Kim M. H., Yu H. J., Kim M., Lee K. W., Do B. R., Jung H. K., Yang K. W., Appel S. H., and Kim S. H., "Epigallocatechin gallate prevents oxidative-stress-induced death of mutant Cu/Znsuperoxide dismutase (G93A) motoneuron cells by alteration of cell survival and death signals", *Toxicology*, 202(3): 213-225(2004).
12. Katiyar S. K., Afaq F., Azizuddin K., and Mukhtar H., "Inhibition of UVB-induced oxidative stress-mediated phosphorylation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate", *oxicol. Appl. Pharmacol.*, 176(2):110-117(2001).
13. Peng G., Wargovich M. J., and Dixon D. A., "Anti-proliferative effects of green tea polyphenol EGCG on Ha-Ras-induced transformation of intestinal epithelial cells", *Cancer Lett.*, 238(2):260-270(2006).
14. Williams R. J., Spencer J. P., and Rice-Evans C., "Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?", *Free Radic. Biol. Med.*, 36(7):838-849(2004).
15. Balasubramanian R., Efimova T., and Eckert R. L., "Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes", *J. Biol. Chem.*, 277(3):1828-1836(2002).
16. Mosmann T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application of proliferation and cytotoxicity assays", *J. Immunol. Methods.*, 55-63(1983).
17. Duarte J., Perez Vizcaino F., Utrilla P., Jimenez J., Tamarzo J., and Zarzuelo A., "Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle, Structure-activity relationships", *Gen. Pharmacol.*, 24(4):857-862(1993).
18. Abe N., Nemoto A., Tsuchiya Y., Hojo H., and Hirota A., "Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a-pyrone compound", *Biosci. Biotech. Biochem.*, 64(2):306-313(2000).
19. Rosenkranz A. R., Schmaldienst S., Stuhlmeier K. M., Chen W., Knapp W., and Zlabinger G. J., "A microplate assay for the detection of oxidative product using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate", 156(1):39-45(1992).
20. Oyanagui Y., "SOD and active oxygen modulators", *Nihon Igakukan Tokyo*, 17-36(1989).
21. Lavrovsky Y., Chatterjee B., Clark R. A., and Roy A. K., "Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age related diseases", *Exp. Gerontol.*, 35(5):521-532(2000).
22. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carlà V., and Moroni F., "Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation", *J. Neurochem.*, 51(6):1960-1963(1988).
23. 서종모, 유형곤, 김영주, 강라미, 김만호, 박규형, 정흠, "배양망막색소상피에서 다양한 손상에 대한 Ginkgo biloba Extract의 보호효과", *대한안과학회지*, 45(6):1017-1023(2004).
24. 안성훈, 구성태, 김선영, 김경식, 손인철, "H₂O₂로 유발된 뇌신경세포 상해에 대한 구진의 보호효과", *대한침구학회지*, 21(3):29-41(2004).
25. 윤미진, 엄현수, 윤병수, 유병선, "H₂O₂에 의한 CHO 세포 사멸에 대한 프로폴리스의 보호효과", *한국양봉학회지*, 19(2):69-74(2004).
26. Jacobson J. M., Michael J. R., Jafri M. H., and Gurtner G. H., "Antioxidants and actioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit", *J. Appl. Physiol.*, 68(3):1252-1259(1990).
27. Goldstein N. S. and Lewin K. J., "Gastric epithelial dysplasia and adenoma: historical review and histological criteria for grading", *Hum. Pathol.*, 28(2):127-133(1997).
28. Oltvai Z. N., Milliman C. L., and Korsmeyer S. J., "bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax that accelerates programmed cell death", *Cell*, 74(4):609-619(1993).

The Protective Effects of EGCG Extracted from Green Tea on Apoptosis Induced by H₂O₂ in Conjunctival Cell Lines

Su-Kyoung Park, Soo-Chul Chae, Eun-Gyeong Kho, Geun-Chang Ryu*,
Jai-Min Kim**, Myung-Suk Na*** and Jong-Bin Lee

Department of Biology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

*Department of Ophthalmic Optics, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

**Department of Ophthalmic Optics, Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

***Department of Beauty & Science, Kwangju Women's University, Gwangju 506-713, Korea

(Received July 24, 2008; Revised August 15, 2008; Accepted September 10, 2008)

Purpose: Hydrogen peroxide which is one of the reactive oxygen species has been seen to cause various diseases, various cellular disinfections, gene transformation and cell death. The goals of this study were to determine the protective effect of EGCG against H₂O₂-induced apoptotic death in conjunctival cell lines.

Methods: We measured cell viability by MTT assay and analyzed DNA fragmentation to check up a distinctive feature in cell death and measured the removal ability of free radicals by DPPH free radical scavenging assay and evaluated the oxygen free radical's quantity in the cell by DCFH-DA assay. The mRNA expression in the cell were examined by RT-PCR.

Results: Cell viability and free radical scavenging activities were significantly increased in dose dependently after cell was exposed to EGCG. And DNA fragmentation and intracellular ROS was decreased. It was showed the mRNA expression which increase of *bcl-2*, *bcl-xL* expression and decrease of *bax* expression.

Conclusions: From these results, it suggests that EGCG has an antioxidant effect and protects conjunctival cell lines from the H₂O₂-mediated apoptosis through the modulation of the mRNA expression.

Key words: Conjunctival cell line, Cytotoxicity, EGCG, H₂O₂, ROS