

점안마취제 성분인 Proparacaine Hydrochloride의 세포독성에 대한 Epigallocatechin-Gallate의 효과

서 은 선*

동신대학교 안경광학과, 나주 520-714

투고일(2013년 7월 31일), 수정일(2013년 12월 9일), 게재확정일(2013년 12월 14일)

목적: 점안마취제 성분인 proparacaine hydrochloride (PPC)에 의한 결막세포주의 세포자연사와 이에 대한 epigallocatechin-gallate (EGCG)의 보호효과를 알아보고자 하였다. **방법:** 동일한 조건으로 배양된 결막세포주에 Alcaine® 0.5%, PPC 0.5%, 그리고 0.01% benzalkonium chloride (BAC)을 각각 15분간 처리한 후, 추가적으로 12시간과 24시간 배양한 후 세 군으로 나누어 MTT assay와 LDH assay를 실시하였다. 배양된 결막세포주에 EGCG를 10 µM의 농도로 3시간 동안 전 처리한 후 0.5% PPC를 15분간 추가 배양한 다음 유세포분석기를 이용한 세포자연사 정도를 측정하였다. **결과:** Alcaine® 0.5%, PPC 0.5%, BAC 0.01%를 15분 동안 처리한 직후와 다시 12시간과 24시간 추가 배양한 결과 모든 군에서 세포생존율이 증가하지 않았다($p < 0.05$). 0.5% PPC 단독처리군($32.2 \pm 2.0\%$)에 비해 10 µM의 EGCG 3시간 전 처리하고 PPC 0.5% 후 처리한 군(68.2%)에서 세포 생존율은 더 높아졌다. 또한 PPC 0.5% 처리한 군에서 유도된 세포자연사는 EGCG 첨가로 감소되었다. **결론:** 점안마취제인 PPC에 EGCG를 전처리함으로써 세포생존율을 증가시키고, 세포자연사를 억제함으로써 EGCG는 세포보호 효과가 있는 것으로 나타났다.

주제어: Conjunctival cell line, Proparacaine hydrochloride (PPC), Epigallocatechin-gallate (EGCG)

서 론

점안 마취제로 널리 사용되고 있는 Alcaine®은 마취제인 proparacaine hydrochloride (PPC) 0.5%와 보존제로 benzalkonium chloride (BAC) 0.01%를 함유하고 있다. PPC는 0.5% 용액과 0.25% sodium fluoracaine의 복합제가 있으며, sodium fluoracaine이 없는 용액이 일반적으로 점안 마취제로 널리 사용된다.^[1] PPC의 마취는 비교적 빠른 20초 이내에 효과가 나타나며 지속시간은 10-15분 정도이다.^[2] 점안 마취제는 각막 부종을 일으킬 수 있고, 각막 상피의 탈피화,^[3,4] 각막 내피 세포의 대사 억제^[5] 및 각막 내피 세포에서 Na^+ - K^+ pump의 기능에 변화^[6]를 가져올 수 있다. 점안마취제 중 cocaine은 가장 심한 각막상피 독성을 나타내며, PPC, tetracaine과 cocaine은 각막 상피의 상처 치유를 지연시키므로 장기간 사용은 반드시 피해야 한다. 알레르기 반응은 각막과 결막에 마취제를 점안한 후 5~10분 후에 실질에 부종이 나타나고, 결막 충혈과 부종, 눈꺼풀 부종과 눈물 분비 등의 증상을 나타내었다.^[7]

녹차(*camellia sinensis*)에 함유된 성분은 주로 폴리페놀(polyphenol)이며 이는 카테킨(catechin)으로 흔히 알려져 있다. 카테킨은 epicatechin 형태로서 여러 flavanol, flavandiol,

flavonoid, phenolic acid를 포함한 폴리페놀성 화합물로서, 에피카테킨(epicatechin; EC), 에피카테킨갈레이트(epicatechingallate; ECG), 에피갈로카테킨(epigallocatechin; EGC) 및 에피갈로카테킨갈레이트(epigallocatechingallate; EGCG)가 있으며^[8,9] 이 중 EGCG가 67%를 차지한다.^[10] 이러한 카테킨은 항산화성,^[11] 항발암성,^[12] 항균성,^[13] 항돌연변이유발물질(antimutagenic), 항염증성, 혈중 콜레스테롤 저하작용,^[14] 혈압강하작용,^[15] 혈당강하효과,^[16] 혈소판 응집억제,^[17] 새로운 혈관형성 억제작용,^[18] 충치예방^[19] 등의 약리작용이 보고되고 있어서 그 활용에 대한 관심이 증가되고 있다.^[20] 그럼에도 불구하고 눈과 관련된 세포보호 작용에 대한 연구는 드문 실정이어서 본 연구에서 결막세포주를 대상으로 점안 마취제인 PPC로 유발되는 세포독성에 대해 녹차 폴리페놀의 하나인 EGCG의 보호효과에 대해서 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

실험에 사용한 세포는 사람의 결막세포주인 clone 1-5c-4를 한국 세포주 은행(Korean cell line bank, Korea)으로부터

*Corresponding author: Eun-Sun Seo, TEL: +82-61-330-3550, E-mail: eunsun111@hanmail.net

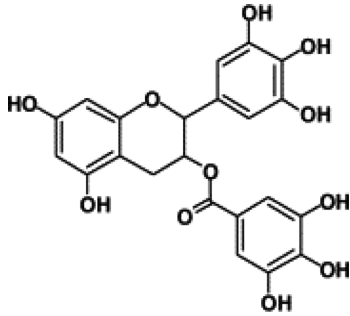


Fig. 1. Chemical structure of EGCG.

분양 받아 사용하였다. 10%의 fetal bovine serum (FBS; Cambrex, USA)와 fungizone 및 antibiotics를 함유한 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배양액을 사용하였다. 점안마취제는 PPC (5.0 mg/ml)와 benzalkonium chloride (BAC, 0.1 mg/ml)로 조제된 Alcaine® (Alcon, USA)을 사용하였고, PPC와 BAC 그리고 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))는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. EGCG의 화학식은 $C_{22}H_{18}O_{11}$ 이고, 분자량은 FW 458.4 이며 구조식은 Fig. 1과 같다(Fig. 1).

2. 세포배양 및 처리

세포 배양은 75 cm²의 배양용 플라스크(Nunc, USA)에 일정량의 배양액을 넣어 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기(Forma Scientific, USA)에서 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% trypsin-EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid)로 부유 시킨 후 0.4% trypan-blue로 염색하여 혈구계산기로 세포수를 산정하였다. 세포생존을 실험은 배양된 세포를 96 well plate (Nunc, USA)에 1×10⁶ cells/well의 세포 부유액을 200 μl씩 분주하여 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 배양된 결막세포주를 Alcaine® 0.5%, 배양액의 용적에 대해 PPC 0.5% 와 BAC 0.01% 농도로 15분 처리한 군, 15분 처리 후 phosphate buffered saline (1×, pH 7.2)로 헹군 후 새로운 배양액을 넣고 12시간과 24시간 추가 배양한 군으로 구분하였다. 대조군은 세포배양 후 아무것도 처리하지 않았다. 배양세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 6 well plate에 멸균된 plastic Thermanox® coverslips (Nunc, USA)를 넣은 후 5×10⁴ cell/well 세포를 24시간 배양하였다. 배양된 세포는 EGCG 3시간 처리군, 0.5% PPC 15분 처리군, 그리고 EGCG 3시간 처리 후 0.5% PPC 15분 처리군으로 구분하였다.

3. 세포 생존율 측정

1) MTT assay

MTT assay는 Mosmann 방법에 따라 시행하였다.^[21]

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma, USA) assay는 세포소기관 중 미토콘드리아 효소의 활성도를 측정하여 세포사 진행과정의 초기 세포의 생존율을 측정하는 방법이다. 세포 배양액을 MTT 200 μg/ml가 포함된 배양액으로 교환하고 3시간 반응시킨 후 배양액을 DMSO 200 μl/well로 교체하여 5분간 실온 방치시켰다. 그런 다음 formazan을 용해시켜 microplate spectrophotometer (Bio-Tech, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) Lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay

세포막 손상에 따라 배지로 유출된 LDH의 함량을 측정하는 방법으로 LDH kit (Inwha pharm, Korea)을 이용하여 사용 방법에 따라 처리한 후 분광광도계(Bio-Tech, USA)로 570 nm 에서 흡광도를 측정하였다.^[22]

3) EGCG의 세포독성 측정

EGCG의 세포독성을 확인하기 위해 배양액에 40 μM, 60 μM, 80 μM, 100 μM, 120 μM, 140 μM, 160 μM, 180 μM, 200 μM 첨가한 결막세포주를 24시간 배양하여 MTT assay를 실시하였다.

4. 세포주기 분석에 의한 세포자연사 판정

배양된 결막세포주의 세포주기 분석을 위해 유세포 분석기를 이용하여 세포의 핵 내 DNA양을 측정하는 Seifer 등^[23]의 방법을 이용하였다. Culture dish로부터 수확한 세포에 hypotonic fluorochrome solution을 첨가하여 4°C에서 6시간 동안 염색하였다. 유세포 분석에 방해가 되는 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 μm nylon mesh로 여과한 후, argon 레이저의 488 nm 파장에서 발기하여 610 nm의 파장으로 여기 되는 propidium iodide의 형광성에 따라 DNA양을 측정하였다.

유세포 분석기의 histogram에서 Ao (Go/G1보다 DNA 형광성이 낮은 구역의 세포군집), Go/G1 (DNA 합성전기), S (DNA 합성기), G2/M (DNA 합성 후 유사분열기)의 각각의 구역을 얻은 후, 세포분석 프로그램(Coulter)을 이용하여 계산하였다. DNA 검사에 요구되는 정확한 alignment를 위해 calibrated fluorescent bead standard (DNA-CHECK Coulter cytometry, Hialeah, FL)를 이용하여 50% peak height에서 coefficient of variation 값을 1.9% 이하로 유지하였다.

5. 통계학적 분석

결과값의 분석은 one-way ANOVA 방법에 따라 실시하였으며, 유의수준 p<0.05 의 범위 내에서 그 결과들은 평균에 대한 표준 편차로 분석하였다.

결 과

1. 점안마취제의 세포독성 평가

1) MTT assay

Alcaine® 0.5%, PPC 0.5%, BAC 0.01%를 작용시간인 15분 동안 처리한 직후와 다시 PBS로 헹군 후 새로운 배양액을 넣고 12시간과 24시간 추가 배양하여 회복효과를 조사한 결과 Alcaine® 0.5%를 15분 처리 후 세포 생존율은 대조군 대비 16.6%였으며, 12시간, 24시간 추가 배양한 후에는 각각 12.5%, 11.7%였다($p < 0.05$)(Fig. 2). PPC 0.5%를 15분 동안 처리한 후에 세포 생존율은 대조군 대비 32.2%였고, 추가 배양한 후 세포 생존율은 12시간에서는 30.1%, 24시간 추가 배양한 군에서는 19.7%였다($p < 0.05$). 그리고 BAC 0.01%를 15분 처리한 군에서는 대조군 대비 31.5%, 12시간, 24시간 추가 배양한 군에서는 각각 11.1%, 9.6%의 세포 생존율을 보였다($p < 0.05$)(Fig. 2).

2) LDH assay

세포질 내의 효소인 lactate dehydrogenase가 세포막의 손상에 의해 배양액으로 유출되는 정도로 세포 독성을 비교한 결과, Alcaine® 0.5%를 시간별(15분, 15분 처리 후 12시간 배양, 15분 처리 후 24시간 배양)로 처리하였을 때 대조군과 비교하여 LDH 유출 정도가 3.98배($p < 0.05$) 이상으로 나타났으며, 12시간, 24시간 추가 배양한 군에서는 대조군의 1.88배($p < 0.05$)로 나타났다(Fig. 3). PPC 0.5%를 15분 처리한 군에서는 대조군과 거의 유사하였고, 15분 처리 후 추가 배양한 군에서는 대조군과 비교해서 LDH 유출 정도가 1.49배로 나타났으며($p < 0.05$), BAC 0.01%를 15분 처리한 군에서는 대조군에 비해 2.36배, 추가 배양한 군에서는 3.78배($p < 0.05$)

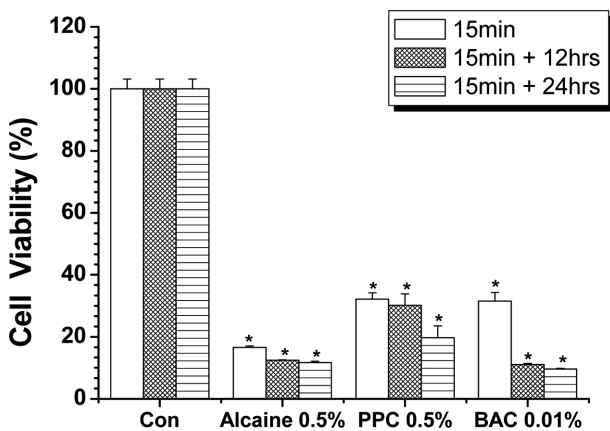


Fig. 2. Cytotoxicity of Alcaine®, PPC, BAC on clone 1-5c-4 cell line assessed with the MTT assay. * $p < 0.05$; significantly different compare to control, Con; control, PPC; proparacaine hydrochloride, BAC; benzalkonium chloride

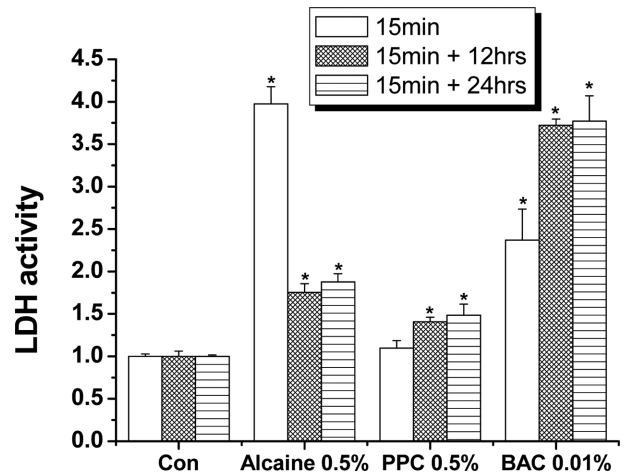


Fig. 3. Cytotoxicity of Alcaine®, PPC, BAC on clone 1-5c-4 cell line assessed with the LDH assay. * $p < 0.05$; significantly different compare to control, Con; control, PPC; proparacaine hydrochloride, BAC; benzalkonium chloride

정도 높은 LDH 유출율을 보였다(Fig. 3).

2. EGCG의 세포독성

배양된 결막세포주를 96 well plate에서 24시간 배양한 후 EGCG를 처리하여 24시간 재배양한 결과, 100 μM 이하의 EGCG 농도에서는 70% 이상의 세포생존율을 보였고, 100 μM 에서는 $74.8 \pm 6.6\%$, 200 μM 에서는 $53.5 \pm 0.7\%$ 의 세포생존율을 보였다(Fig. 4).

3. PPC 세포독성에 대한 EGCG의 보호효과

배양된 결막세포주를 96 well plate에서 24시간 동안 배양한 후 0.5% PPC를 처리하기 전에 10-100 μM 의 EGCG를 3시간 전 처리하고, 0.5% PPC를 후 처리한 다음 15분 추가 배양 후 세포 생존율을 측정된 결과, 무처리 대조군

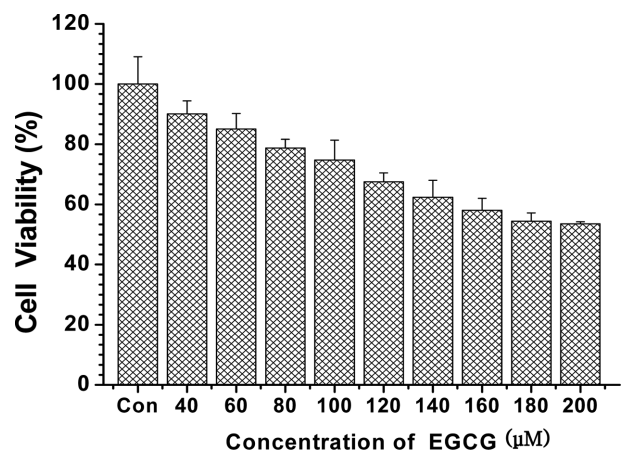


Fig. 4. Effects of concentration of EGCG on the viability of clone 1-5c-4 cell line assessed with the MTT assay at 24hrs. Con; control, EGCG; epigallocatechin-gallate

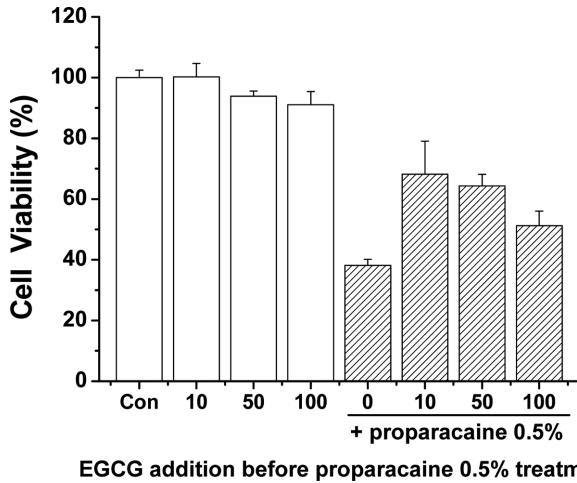


Fig. 5. Protective effects of EGCG on against PPC induced cytotoxicity of clone 1-5c-4 cell line. Cells were incubated with EGCG 0, 10, 50, 100 μM for 3 hrs. After incubation, cells were treated with 0.5% PPC for 15 mins. Con; control, EGCG; epigallocatechin-gallate, PPC; propracaine hydrochloride

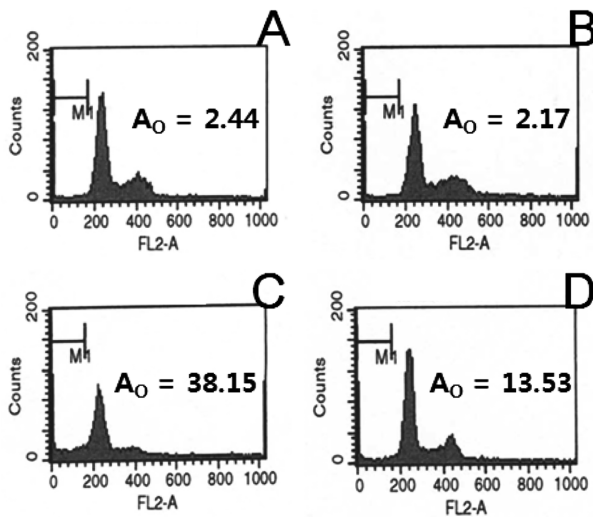


Fig. 6. DNA histogram from cultured clone 1-5c-4 cell line treated with EGCG and PPC. A: Control, B: Cells were incubated with EGCG 10 μM for 3 hrs, C: Cells were incubated with 0.5% PPC for 15 mins, D: Cells were incubated with EGCG 10 μM for 3 hrs + after incubation, cells were treated with 0.5% PPC for 15 mins, EGCG; epigallocatechin-gallate, PPC; propracaine hydrochloride

의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 전 처리하지 않은 실험군은 $38.2 \pm 2.0\%$, EGCG 10, 50, 100 μM 처리 실험군에서는 농도별로 각각 $68.2 \pm 10.86\%$, $64.3 \pm 3.76\%$, $51.2 \pm 4.78\%$ 생존율을 나타내어 고농도 보다 저농도에서 더 많은 세포생존율이 증가되었다(Fig. 5).

4. 세포주기 분석에 의한 세포자연사 관찰

배양된 결막세포주에 10-100 μM의 EGCG를 3시간 전

처리하고, 0.5% PPC를 후 처리한 다음 15분 추가 배양 후에 수확한 세포들의 주기를 분석한 결과, 세포핵이 propidium iodide에 약하게 염색되어 세포자연사를 보이는 A_0 기의 경우 대조군에서는 2.44%로 나타났고, EGCG 10 μM 처리한 군과 PPC 0.5% 단독 처리했을 때 각각 2.17%와 40.15%로 나타났다. EGCG 10 μM를 3시간 전 처리하고 PPC 0.5%를 후 처리한 군에서는 11.20%로 나타났다 (Fig. 6).

고 찰

점안마취제 중에서 자극이 제일 적다고 알려져 있는 PPC의 독성을 세포수준에서는 아직 연구가 거의 되고 있지 않다. 인간의 각막 세포에 PPC 독성을 조사한 결과 0.1%에서는 37%, 0.25%에서는 18%의 세포 생존이 나타났으며, 독립위상차 현미경으로 형태 관찰 시 0.1%와 0.25%에서 가장 심한 세포독성을 나타냈는데,^[24] 본 연구 결과 PPC 0.5%를 15분 동안 처리한 후에는 32.2% 세포 생존율을 보였다. 세포막 손상에 따라 배지로 유출된 LDH량을 측정하였더니 15분 처리한 군에서는 대조군과 거의 유사하였으며, 15분 처리 후 추가 배양시에는 LDH 유출 정도가 1.5배를 넘지 않는 것으로 조사되었다. 각막 세포주 보다 본 연구에 사용된 결막세포주에서 덜 민감하게 나타났다. Alcaine[®]과 PPC, BAC 처리군에서도 마찬가지로 세포에 세포자연사나 세포괴사와 같은 조직의 손상을 유도할 수도 있다. 세포자연사는 유전적으로 프로그램된 세포사멸의 과정으로 정상세포의 생리학적, 발생학적, 면역학적 과정에 중요한 역할을 한다. 각막에서도 세포자연사가 각막의 구조를 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 탈락과 재생을 반복하는 상피 세포에서 비정상적인 세포사멸이 일어나면 실질에 영향을 미치게 되어 각막의 구조에 변화가 올 수 있다. Seo 등^[25]의 연구결과에서 세포괴사의 현상은 Alcaine[®] (0.25, 0.5%)의 높은 농도와 BAC 0.01%에서 일어났으며, 저농도 Alcaine[®] 처리군과 PPC, BAC 저농도에서는 세포자연사의 경로를 취한다는 것을 알 수 있었다. 이러한 독성은 보존제가 포함된 마취제나 점안제의 장기적인 사용이 눈의 표면에 손상을 준다는 것을 의미한다. Nam 등^[26]은 PPC과 oxybuprocaine 점안 5분 후 중심 각막 두께 변화를 측정된 결과 중심 각막 두께의 불안정성이 관찰되었고, 향후 중심 각막 두께 측정시 마취제 점안으로 인한 중심 각막 두께의 변화에 대해 고려해 볼 필요가 있다고 하였다.

본 연구결과와 마찬가지로 Park 등^[27]의 연구에서도 결막세포주에 EGCG 자체의 세포독성을 측정된 결과 100 μM 이하의 EGCG 농도에서는 세포증식 저해가 30%를

넘지 않는 것으로 나타났으며, 100 μM 에서는 74.8%의 세포 생존율로 EGCG 처리농도가 높을수록 세포 독성이 더 강해지는 것을 보여주었다. EGCG의 보호효과를 알아보기 위해 EGCG를 농도별로 전 처리한 결과 EGCG의 처리 농도가 높을수록 세포생존율이 증가하였고, H_2O_2 의 단독 처리군인 58%의 생존율을 비교했을 때, H_2O_2 로 유도된 세포손상에 대하여 보호효과를 나타냈으나,^[27] 본 연구결과에서는 PPC만 단독으로 처리시 38.2% 세포생존율을 나타낸 반면, EGCG를 10, 50, 100 μM 농도로 전 처리시 각각 68.2, 64.3, 51.2% 생존율을 나타내어 고농도 보다 저농도에서 더 많은 세포생존율이 증가되었음을 알 수 있었다. 인유두종 바이러스 E6/E7 유전자를 발현하는 TC-1 세포주에서 시스플라틴, GTP, EGCG의 농도가 증가함에 따라 세포성장 억제 비율이 증가됨을 확인하였다.^[28] EGCG는 농도 의존적으로 A549 세포의 생존율을 현저하게 감소시켰으며, 이 세포사멸은 DNA 분절 현상으로 확인된 세포자연사 신호전달기전에 의해서 매개됨을 확인할 수 있었다.^[29] 유세포 분석기에 의해 세포 주기의 분석 결과, Ao기는 세포자연사에 의해 propidium iodide에 대한 세포 핵의 약한 염색성을 보이는 시기인데 대조군에서는 2.44%를 차지하여 세포자연사가 거의 일어나지 않았음을 관찰 할 수 있었다. EGCG와 PPC를 단독 처리시 Ao기의 세포가 2.17%, 40.15%로 나타났으나, EGCG 전 처리하고 PPC를 후 처리한 군에서는 11.20%로 오히려 감소됨을 관찰할 수 있었다. 정상세포와 암세포에 미치는 효과를 비교한 보고에서는 정상조직에 손상을 입히지 않고 직장암^[30]과 유방암^[31]의 성장을 억제하며 강력한 화학적 예방효과를 나타낸다고 보고된 반면 신경변성질환이나 피부질환에서는 오히려 해로운 외부자극들에 의한 세포자연사를 방지하는 것으로 보고되어있다.^[32-34] 이러한 상반된 현상은 EGCG가 세포종류와 그 농도에 따라 정반대의 생물학적인 효과를 나타내기 때문인 것으로 생각되고 있다. EGCG가 PI3K/Akt 체계를 변화시켜 세포의 세포자연사를 억제한다는 것이 몇몇 연구들에서 알려져 왔다.^[32-34] 결막세포주에서 H_2O_2 에 의한 EGCG의 보호효과를 알아보기로 농도별 EGCG를 처리하였더니 세포고사를 억제시키는 *bcl-2*와 *bcl-xL*의 mRNA는 발현이 증가되었으나, 이와 반대로 항진시키는 *bax* mRNA의 발현은 감소하였다.^[27]

일반적으로 사용되고 있는 PPC 점안 마취제에는 0.01% BAC라고 하는 방부제라고 하는 보존제를 포함하고 있으며, 눈물층에 불안정성을 유발할 수 있다고 조사되었으며,^[35,36] BAC를 생쥐 섬유모세포인 L929 세포주에 세포 독성을 검정한 결과 0.01%에서는 65%의 독성이 나타났으며, DNA 분절화 현상과 Ao기의 세포가 대조군인 5.06%에서 27.1%로 증가하였고, Hoechst 33342 형광염색에서

는 거의 모든 세포에서 작은 조각으로 응축되어 쪼개진 세포자연사의 전형적인 모양이 관찰되었다.^[37]

본 연구결과는 결막세포주에 점안마취제 성분인 PPC에 EGCG를 추가함으로 세포자연사가 억제하여 세포생존율을 증가시키는 효과를 확인하였고, 천연보존제로서의 EGCG 활용을 위해 의미있는 자료를 제시하였다고 사료된다.

결 론

1. Alcaine® 0.5%, PPC 0.5%, BAC 0.01%를 마취제 작용시간인 15분 동안 처리한 직후와 다시 새로운 배양액을 넣고 12시간과 24시간 추가 배양하여 회복효과를 조사한 결과 세포 생존율은 증가하지 않았다.
2. 10 μM 의 EGCG를 3시간 전 처리하고, 0.5% PPC를 후 처리한 다음 15분 추가 배양 후 세포 생존율은 PPC 단독처리시보다 36% 증가하였다.
3. 세포주기 분석에 의한 세포자연사는 EGCG 10 μM 처리한 군과 PPC 0.5% 단독 처리시 Ao기의 세포가 2.17%, 40.15%로 나타났으나, EGCG 10 μM 를 3시간 전 처리하고 PPC 0.5%를 후 처리한 군에서는 11.20%로 오히려 감소함을 관찰할 수 있었다.

REFERENCES

- [1] Webster RB. Local anesthetics for ophthalmic use. *Aust J Optom.* 1974;57: 399-401.
- [2] Greenbaum S. *Ocular anesthesia*, 1st Ed. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1997;57-89.
- [3] Wilson G, Fullard RJ. Cell sloughing with proparacaine. *J Am Optom Assoc.* 1988;59(9):701-702.
- [4] Brewitt H, Bonatz E, Honegger H. Morphological changes of the corneal epithelium after application of topical anaesthetic ointments. *Ophthalmologica.* 1980;180(4):198-206.
- [5] Penna EP, Tabbara KF. Oxybuprocaine keratopathy: a preventable disease. *Br J Ophthalmol.* 1986;70(3):202-204.
- [6] Asensio I, Rahhal SM, Alonso L, Palanca-Sanfrancisco JM, Sanchis-Gimeno JA. Corneal thickness values before and after oxybuprocaine 0.4% eye drops. *Cornea.* 2003; 22(6):527-532.
- [7] Leopold IH. *Ocular therapy: complications and management*, 1st Ed. St Louis: Mosby Co, 1, 1966;35-42.
- [8] Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med.* 1992;21(3):334-350.
- [9] Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M. General chemical composition of tea and its infusion. In: *Chemistry and applications of green tea*, New York: CRC Pree, 1997;13-22.
- [10] Fassina G, VenR, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan

- DM et al. Mechanisms of inhibition of tumor angiogenesis and vascular tumor growth by epigallocatechin-3-gallate. *Clin Cancer Res.* 2004;10(14):4865-4873.
- [11] Xie D, Liu G, Zhu G, Wu W, Ge S. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects cultured spiral ganglion cells from H₂O₂-induced oxidizing damage. *Acta Otolaryngol.* 2004;124(4):464-470.
- [12] Yu HN, Yin JJ, Shen SR. Growth inhibition of prostate cancer cells by epigallocatechin gallate in the presence of Cu²⁺. *J Agric Food Chem.* 2004;52(3):462-466.
- [13] Sharquie KE, al-Turfi IA, al-Salloom SM. The antibacterial activity of tea in vitro and in vivo (in patients with impetigo contagiosa). *J Dermatol.* 2000;27(11):706-710.
- [14] Suzuki H, Ishigaki A, Hara Y. Long-term effect of a trace amount of tea catechins with perilla oil on the plasma lipids in mice. *Int J Vitam Nutr Res.* 1998;68(4):272-274.
- [15] Duarte J, Prez Vizcano F, Utrilla P, Jimnez J, Tamargo J, Zarzuelo A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol.* 1993;24(4):857-862.
- [16] Hara Y. Physiological functions of tea polyphenols: Part 2. *Am Biotechnol Lab.* 1994;12(9):18
- [17] Polette A, Lemaitre D, Lagarde M, Vricel E. N-3 fatty acid-induced lipid peroxidation in human platelets is prevented by catechins. *Thromb Haemost.* 1996;75(6):945-949.
- [18] Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature.* 1999;398(6726):381.
- [19] Yu MO, Chun JW, Oh KH. Effect of tea catechin, EGCG on killing of oral bacteria. *The Kor J Microbiol.* 2004;40(4):364-366.
- [20] Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):564-582.
- [21] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
- [22] Sinensky MC, Leiser AL, Babich H. Oxidative stress aspects of the cytotoxicity of carbamide peroxide: in vitro studies. *Toxicol Lett.* 1995;75(1-3):101-109.
- [23] Seifer DB, Honig J, Penzias AS, Lavy G, Nadkarni PM, Jones EE et al. Flowcytometric analysis of deoxyribonucleic acid in human granulosa cells as a function of chronological age and ovulation induction regimen. *J Clin Endocrinol Metab.* 1992;75(2):636-640.
- [24] Moreira LB, Kasetsuwan N, Sanchez D, Shah SS, LaBree L, McDonnell PJ. Toxicity of topical anesthetic agents to human keratocytes in vivo. *J Cataract Refract Surg.* 1999;25(7):975-980.
- [25] Seo ES, Lee JB, Ryu GC, Kim JM. The effect of topical anesthetics on the conjunctiva cell. *Korean J Vis Sci.* 2002;4(1):65-76.
- [26] Nam SM, Lee HK, Kim EK, Seo KY. Comparison of central corneal thickness after the instillation of topical anesthetics: Proparacaine versus Oxybuprocaine. *Cornea.* 2006;25(1):51-54.
- [27] Park SK, Chae SC, Kho EG, Ryu GC, Kim JM, Na MS et al. The protective effects of EGCG extracted from green tea on apoptosis induced by H₂O₂ in conjunctival cell lines. *J Korean Oph Opt Soc.* 2008;13(3):95-101.
- [28] Kim HK, Kang YH, Kwak SY, Ding GH, Bae SM, Park EK et al. Effects of cell growth inhibition on the combination of cisplatin with green tea extracts. *J Gynecol Oncol.* 2005;16(4):347-353.
- [29] Park JS, Shin MK, Sohn HS, Park RK, Kim MS, Jeong WH. Green tea(-)EGCG induces the apoptotic death of lung cancer cell via activation of c-Jun N-terminal Kinase 1 and activating Protein-1. *Korean J Nutr.* 2002;35(1):53-59.
- [30] Fujiki H, Suganuma M, Okabe S, Sueoka N, Komori A, Sueoka E et al. Cancer inhibition by green tea. *Mutat Res.* 1998;402(1-2):307-310.
- [31] Tanaka H, Hirose M, Kawabe M, Sano M, Takesada Y, Hagiwara A et al. Post-initiation inhibitory effects of green tea catechins on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary gland carcinogenesis in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.* 1997;116(1):47-52.
- [32] Koh SH, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang KH et al. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3 mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal- differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology.* 2004;25(5):793-802.
- [33] Katiyar SK, Afaq F, Azizuddin K, 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. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;176(2):110-117.
- [34] Koh SH, Kim SH, Kwon H, Kim JG, Kim JH, Yang KH et al. Phosphatidylinositol-3 kinase/Akt and GSK-3mediated cytoprotective effect of epigallocatechin gallate on oxidative stress-injured neuronal differentiated N18D3 cells. *Neurotoxicology.* 2004;25(5):793-802.
- [35] Blades KJ, Murphy PJ, Patel S. Tear thinning time and topical anesthesia as assessed using the HIRCAL grid and the NCCA. *Optom Vis Sci.* 1999;76(3):164-169.
- [36] Cho P, Brown B. The effect of benoxinate on the tear stability of Hong Kong-Chinese. *Ophthalmic Physiol Opt.* 1995;15(4):299-304.
- [37] Koh EK, Lee JB, Kim JM. Evaluation of apoptosis induced by Benzalkonium chloride(BAC) of eye-drops. *Korean J Vis Sci.* 2001;3(2):175-186.

Study on the Protective Effect of EGCG Against the Cytotoxicity Induced by Topical Anesthetic Proparacaine Hydrochloride

Eun-Sun Seo*

Dept. of Optometry and Optic Science, Dongshin University, Naju 520-714, Korea
(Received July 31, 2013; Revised December 9, 2013; Accepted December 14, 2013)

Purpose: To identify the apoptosis caused by Proparacaine hydrochloride (PPC), a topical anesthesia, applied to conjunctival cell lines and determine whether pigallocatechin-gallate (EGCG), has protective effects on. **Methods:** The conjunctival cell lines were treated with 0.5% of Alcaine®, 0.5% of PPC and 0.01% of Benzalkonium chloride (BAC) for 15 minutes, respectively in order to investigate the effects of topical anesthesia on cells, and followed by cultured for 12 and 24 hours. The recovery effects were investigated by measuring level of cellular proliferation inhibiting using MTT assay and LDH assay. The conjunctival cell lines were pre-treated with EGCG 10 μ M for 3 hrs and post-treated with 0.5% PPC for 15 mins in order to investigate whether EGCG has protective effects, flow cytometry were performed in order to observe apoptosis. **Results:** A result of the additional culture of 12 and 24 hours and again immediately after the treatment for 15 minutes 0.5% of Alcaine®, 0.5% of PPC, the 0.01% of BAC, cell viability was not increased in all groups ($p < 0.05$). The cell viabilities were higher than in cells 3 hours post-treated with 10 μ M of EGCG and pre-treated PPC 0.5% (68.2%), compared to cells ($32.2 \pm 2.0\%$) treated only with 0.5% of PPC. PPC 0.5% also induced apoptosis in the treated group was reduced by the addition of EGCG. **Conclusions:** It is considered that the EGCG has cell protective effects when it is added to PPC, a topical anesthesia, by improving cell viability and inhibiting apoptosis.

Key words: Conjunctival cell line, Proparacaine hydrochloride (PPC), Epigallocatechin-gallate (EGCG)