

## Benzo[a]pyrene으로 유발한 Mouse Forestomach Tumor 생성에 대한 Astaxanthin 함유 난황의 효과

이상호<sup>1</sup> · 박철우 · 박원석 · 이영춘<sup>2</sup> · 최의성<sup>3</sup> · 하영래\*

<sup>1</sup>해태제과 중앙연구소, <sup>2</sup>중앙대학교 식품공학과,  
<sup>3</sup>생명공학연구소 응용미생물연구부, 경상대학교 농화학과

**초 록 :** Benzo[a]pyrene (BP)으로 유발한 mouse의 전위암 형성에 대한 astaxanthin 함유 난황 (astaxanthin-containing egg yolk : AEY)의 영향을 연구하였다. Female ICR mouse (6-7 주령, 5 mice/cage, 20 mice/treatment)에게 물과 사료를 자유로이 공급하면서 일주일간 적응시킨 후 다음과 같이 처리를 하였다. BP (2 mg/0.2 ml corn oil)를 각 mouse에 경구투여하기 4 일과 2 일 전에 50 mg AEY, 100 mg AEY, 150 mg AEY, 또는 150 mg control egg yolk (CEY)을 함유하는 phosphate-buffered saline (PBS) 0.2 ml를 경구투여하였다. Control mouse는 0.2 ml PBS와 BP 만 경구투여하였다. 이 과정을 4회 반복하였다. BP를 경구투여 한 일주일 후부터 몸무게와 사료섭취량을 매주 기록하였으며 24주 후에 생존한 모든 mouse에 대해 전위암 생성을 조사하였다. AEY를 처리한 mouse에서는 control mouse나 CEY 처리 mouse에 비해 mouse 당 암의 수가 1/3 정도로 감소되었다. 이와 같은 AEY의 항암효과는 AEY의 처리량에 비례하였다. AEY 처리에 따른 암발생율은 control이나 CEY 처리에 비해 감소되었으나 150 mg AEY 처리에서만 유의성이 있는 감소를 보였다. AEY 처리에 따른 몸무게나 사료 소비량의 감소현상은 볼 수 없었다. 따라서 이 결과는 AEY가 BP로 유발한 mouse의 전위암 발생을 억제함을 암시한다. (1997년 9월 22일 접수, 1997년 10월 13일 수리)

### 서 론

달걀은 양질의 고단백질 식품으로 소비량이 많은 식품 중의 하나이다. 그러나 달걀의 난황에는 콜레스테롤 함량이 높아 최근 소비량이 감소하는 추세에 있는 실정이다. 따라서 난황 중의 콜레스테롤 함량을 줄이면서 품질을 향상시키기 위한 많은 연구가 수행되고 있다.<sup>1-4)</sup> 이와 같은 연구는 주로 항산화성, 항암성 또는 면역증강성을 지닌 생리활성물질을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 난황에 그 생리활성물질을 보강시키는 방법을 사용하고 있다.<sup>5-8)</sup> 이들 생리활성 물질은 주로 식품 및 약초 부산물, 지방 추출물, 합성화학물질 등이 이용되고 있다. 그러나 그 사용량이 제한 되어 있고 가격도 다소 높은 편이다.

최근 항암성 및 항산화성을 동시에 갖는 astaxanthin (Fig. 1)은 효모인 *Phaffia rhodozyma*의 변이주를 개발하여 상당량의 astaxanthin을 생산할 수 있게 되었다(3.5 mg/g

yeast).<sup>9)</sup> 따라서 본 연구진은 이 효모에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 astaxanthin을 함유하는 난황, 즉 astaxanthin-containing egg yolk (AEY)을 생산하였다. 따라서 이 난황을 직접 기능성 식품 소재로 사용하기 위하여 여러 가지 생리활성의 검증이 필요하며, 특히 항암성을 검증할 필요가 있다. AEY의 생리활성에 관한 보고는 이 등<sup>10)</sup>이 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)으로 유발한 two-stage mouse skin carcinogenesis의 initiation 단계를 저해한다는 보고가 있을 뿐 그 외 AEY의 항암성에 관한 보고는 아직 없다.

본 연구에서는 benzo[a]pyrene (BP)으로 유발한 mouse forestomach carcinogenesis에 대한 AEY의 효과를 연구하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

AEY (108 µg astaxanthin/g), control egg yolk (CEY : 0 µg astaxanthin/g)은 해태제과연구소 (서울)에서 공급받았다. BP는 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 그 외 사용된 시약은 reagent급 이상이였다.

#### 동물실험

Mouse forestomach carcinogenesis에 대한 연구는 Ha

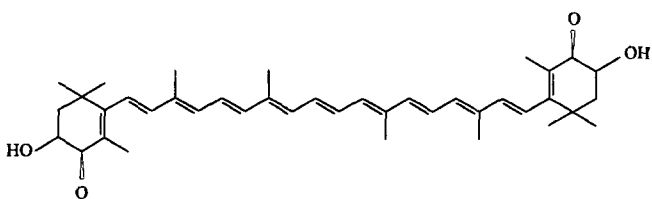


Fig. 1. Chemical structure of astaxanthin.

찾는말 : anticarcinogenic activity, astaxanthin-containing egg yolk, benzo[a]pyrene, mouse forestomach tumorigenesis

\*연락처

등<sup>11)</sup>의 방법에 준하였다. ICR 암컷 mouse(6~7 주령, 대구 Life Science 사)를 처리 당 20마리(5 mice/cage)로 나누었다. 온도와 습도가 조절되는 시설에서 물과 사료(Chow 사료: 대구 Life Science 사)를 자유롭게 먹도록 하면서 1주간 사육시키면서 적응시켰다. 그 다음 월요일과 수요일에 시료 AEY 150 mg을 함유하는 phosphate-buffered saline (PBS) 0.2 ml, AEY 100 mg을 함유하는 PBS 0.2 ml, AEY 50 mg을 함유하는 PBS 0.2 ml, CEY 150 mg 함유하는 PBS 0.2 ml를 각 mouse에 경구 투여하고 금요일에 BP 2 mg을 함유한 corn oil 0.2 ml를 경구투여하였다. Control mouse에는 PBS와 BP만 경구투여하였다. 이 과정을 4주간 반복하였다. 첫 번 BP 투여 후부터 몸무게와 음식의 섭취량을 1주일에 1회씩 각각 기록하였다.

### Tumor 조직염색

BP 처리 24주 후에 mouse를 scarifice하여 stomach을 제거한 다음 4% formalin 완충용액으로 24시간 팽창시킨 다음 생성된 tumor(직경 1 mm 이상) 수를 dissecting microscope로 조사하였다. Tumor 조직을 Lillie와 Fullmer의 방법<sup>12)</sup>으로 염색하여 조사하였다.

### 통계분석

얻어진 data에 대한 유의성은 최소유의성 검정(LSD), 분산분석(ANOVA) 또는 Tuckey  $\omega$  test에 의해 검정하여 분석하였다.

## 결 과

Fig. 2는 BP로 유발한 mouse forestomach tumor의 형태를 나타낸 것이다. 좌측의 mouse forestomach은 BP의 영향을 받지 않아 tumor가 발생되지 않았지만, 우측의 forestomach은 BP에 의해 tumor가 발생되었음을 알 수 있다. BP 처리 24주 후에 발생한 tumor의 크기는 지름이 0.3 mm부터 4 mm 사이에 분포되어 있었다.

BP에 의해 유발된 forestomach tumor를 Lillie와 Fullmer의 방법<sup>12)</sup>으로 조직 염색하여 조사한 결과 Fig. 3에 보는



Fig. 2. Typical mouse forestomach tumors induced by BP. Left is a normal forestomach and right is a forestomach bearing tumors.

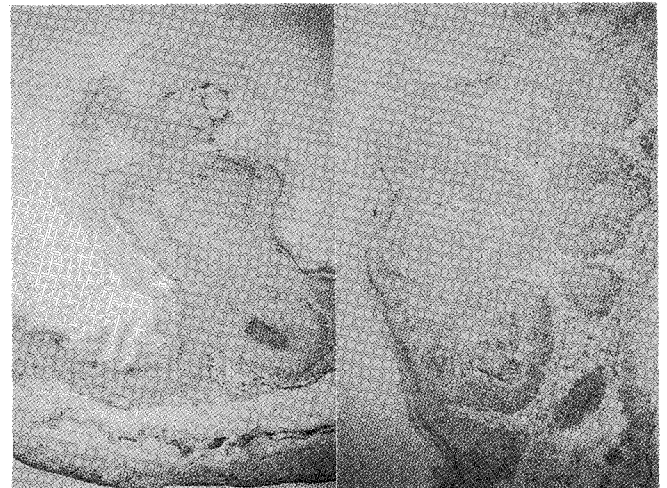


Fig. 3. Histochemical analysis of mouse forestomach tumors (12). Left is a papilloma and right is a squamous cell carcinoma.

바와 같이 tumor의 크기가 작은 것(지름 1 mm 정도)은 유두종(papilloma) (좌) 또는 hyperplasia인 것으로 밝혀졌지만(data not shown), tumor의 크기가 큰 것(3 mm 이상)은 편평상피암종(squamous cell carcinoma)이 형성되었다 (우).

Fig. 4는 AEY의 처리로 mouse forestomach에서 tumor의 생성이 강하게 억제되었음을 보여주고 있다. control 인 PBS 처리구에서는 마리 당 7.3개의 tumor가 발생되었고 control 난황인 CEY 150 mg 처리구에서는 마리 당 6.1개의 tumor가 발생되었다. AEY 150 mg, AEY 100 mg, AEY 50 mg 처리구에서 각각 2.0, 2.2, 3.4개가 발생되어 처리량에 따른 감소를 보였고, AEY 50 mg, AEY 100 mg, AEY 150 mg 처리구에서는 PBS나 CEY 150 mg 처리구에 비해 마리 당 tumor 수가 각각 5%, 1% 및 1%에서 유의성 있는 감소 효과를 보였다. 또한 AEY 150 mg 처리구와 AEY 50 mg 처리구 사이의 tumor 수에는 5%에서 유의성이 있었다. 본 연구에서 CEY 처리는 AEY의 최대량인 150 mg 만 처리하여 그 효과를 AEY의 효과와 비교하였다. 각 처리구에서 생성된 tumor는 대부분 3 mm 이하였고 3 mm 이상인 tumor는 control 처리구에서 8.5%, CEY 처리구에서 5.5% 그리고 모

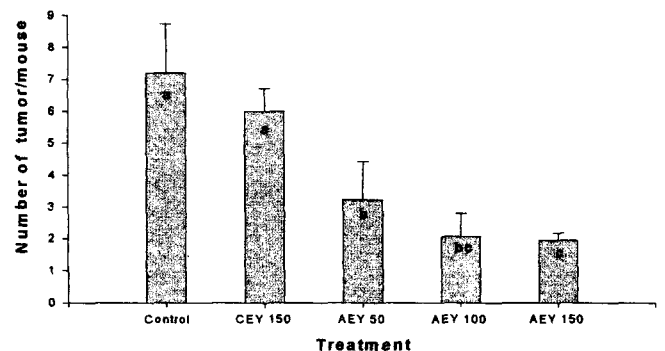


Fig. 4. Reduction of BP-induced mouse forestomach neoplasms by AEY. Different letters among treatments mean significantly different at least at  $p < 0.05$  by LSD test.

Table 1. Effects of AEY on the incidence of mouse forestomach tumor induced by BP

Treatment <sup>1)</sup>	Mice in effective	Incidence (%) <sup>2)</sup>
Control	20	100
CEY 150 mg	20	100
AEY 50 mg	20	100
AEY 100 mg	20	83 <sup>3)</sup>
AEY 150 mg	19	82 <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Amount shown in given treatments was contained in 0.2 ml PBS. Each mouse of given treatments was received 4 times of given sample amount and 8 mg BP. Control mouse was given 0.8 ml PBS plus 8 mg BP.

<sup>2)</sup>Incidence was represented as percentage of number of tumor-bearing mouse against number of mice in effective.

<sup>3)</sup>Significant difference at  $p < 0.05$  by  $\chi^2$  test.

든 AEY 처리구에서는 5% 미만으로 나타났다.

Mouse forestomach tumor 발병율은 Table 1에서 보는 바와 같이 control, CEY 150 mg, AEY 50 mg 처리에서는 100% 발병율을 보였지만 AEY 100 mg과 150 mg 처리구의 mouse에서는 각각 83, 82%의 발병율을 보이고 있다. 특히 AEY 100 mg과 150 mg 처리구의 발병율은 control 처리구의 발병율에 비해 5% 수준에서 유의성이 있는 감소를 보였다.

발암물질이나 시료를 경구투여하는 경우 사료의 섭취량이나 몸무게가 줄어지는 현상이 종종 나타나기 때문에 AEY의 처리에 따른 사료섭취량과 몸무게의 변화를 조사하였다. Table 2와 Table 3에서는 BP 처리 후 10주와 20주에서의 사료섭취량과 몸무게를 각각 비교하였다. 사료섭취량

Table 2. Effect of AEY on food intake (g/mouse/week)

Treatment <sup>1)</sup>	Week 10	Week 20
Control	27.45±2.3 <sup>2)</sup>	28.39±2.1 <sup>3)</sup>
CEY 150 mg	31.71±2.0	28.00±4.8
AEY 50 mg	33.13±1.3 <sup>4)</sup>	28.90±3.5
AEY 100 mg	29.83±2.9	29.42±1.8
AEY 150 mg	27.68±3.1	28.18±2.9

<sup>1)</sup>Amount shown in given treatments was contained in 0.2 ml PBS. Each mouse of given treatments was received 4 times of given sample amount and 8 mg BP. Control mouse was given 0.8 ml PBS plus 8 mg BP.

<sup>2)</sup>Mean±SD.

<sup>3)</sup>No significant difference observed among all treatment by ANOVA.

<sup>4)</sup>Significant difference from PBS treatment at  $p < 0.05$  by ANOVA and LSD test.

Table 3. Effect of AEY on cumulative body weight (g/mouse/week)

Treatment <sup>1)</sup>	Week 10	Week 20
Control	28.74±2.9 <sup>2,3)</sup>	32.20±2.8 <sup>3)</sup>
CEY 150 mg	31.57±3.2	34.19±1.9
AEY 50 mg	30.56±3.1	33.74±3.0
AEY 100 mg	29.17±3.0	33.40±3.5
AEY 150 mg	29.61±2.9	33.30±3.9

<sup>1)</sup>Amount shown in given treatments was contained in 0.2 ml PBS. Each mouse of given treatments was received 4 times of given sample amount and 8 mg BP. Control mouse was given 0.8 ml PBS plus 8 mg BP.

<sup>2)</sup>Mean±SD.

<sup>3)</sup>No significant difference observed among all treatment by ANOVA.

(Table 2)은 BP 처리 10주 후에 AEY의 처리는 control 처리보다 증가하였고, 그 순서는 AEY 50 mg, 100 mg, 150 mg 순으로 AEY 50 mg 처리에서는 control에 비해 5% 수준에서 유의성 있는 증가를 보였다. 그러나 BP 처리 20주에는 AEY 처리에 따른 사료섭취량의 증가효과는 볼 수 없었다. AEY의 처리에 따른 몸무게도 사료섭취량과 비슷한 경향을 보여 BP 처리 10주와 20주에서 AEY의 처리에 의한 유의성이 있는 몸무게의 감소는 없었다 (Table 3).

## 고 찰

Astaxanthin (Fig. 1)은 vitamin A의 전구체로 carotenoid계에 속하는 색소로 자연계에 널리 분포되어 있다.<sup>9)</sup> Astaxanthin은 13개의 공역이중결합을 갖는 구조상의 특징으로 항암성,<sup>10,13,14)</sup> 항산화성<sup>15-18)</sup> 및 면역증강 효과<sup>15,19,20)</sup>를 갖는다고 보고되었다. 최근 이 색소에 대한 산업적 활용에 대한 인식의 고조에 힘입어 효모인 *Phaffia rhodozyma*의 변이주를 개발하여 상당량의 astaxanthin (3.5 mg/g yeast)을 생산할 수 있게 되었다. 따라서 본 연구진은 이 효모에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 AEY를 생산하였다.

AEY는 BP로 유발한 mouse forestomach tumor 발생을 억제하였다(Fig. 4, Table 1). AEY 처리에 의한 사료의 섭취량(Table 2)과 몸무게(Table 3)의 감소는 없었고, AEY의 mouse forestomach tumor 발생 억제효과는 control 처리나 CEY 150 mg 처리 보다 훨씬 컸다. 또한 AEY의 항암효과는 AEY의 처리량에 따라 증가하였다(Fig. 4). 따라서 AEY의 항암성은 AEY에 함유된 astaxanthin의 효과로 추정된다. AEY의 항암효과는 평편상피암종의 감소효과가 아니라 유두종의 수를 감소시키는 것이었다. 사료섭취량과 몸무게가 최저 처리량 50 mg 보다 150 mg 처리구에서 다소 감소되어 (유의성은 없었음) AEY 150 mg 이상의 처리량은 독성이 나타날 가능성이 있음을 암시한다.

AEY의 항암성에 관한 연구는 이 등<sup>10)</sup>이 DMBA로 유발한 two-stage mouse skin carcinogenesis의 initiation을 감소한다는 보고가 있을 뿐 아직 다른 보고는 없다. 천연 astaxanthin의 항암효과는 Tanaka 등이 azoxymethane을 male rat에 경구투여한 다음 32주간 사용하여 colon carcinogenesis<sup>13)</sup>와 oral carcinogenesis<sup>14)</sup>에 대한 항암성이 있음을 보고하였다. 또한 astaxanthin은 항암효과와 관련되는 면역 증강효과가 있다고 보고되었지만<sup>15,19,20)</sup> BP로 유발한 mouse forestomach tumor 발생을 억제한다는 보고는 없다. 따라서 본 연구는 AEY의 mouse forestomach tumor 발생 억제효과를 밝혔을 뿐만 아니라 astaxanthin이 mouse forestomach tumor 발생을 억제한다는 사실을 간접적으로 증명하였다.

그러나 AEY를 기능성 식품소재나 의약품의 소재로 사용하기 위하여 azoxymethane 등과 같은 여러 가지의 발암물질에 대한 항암성과 항산화성 및 면역 증강효과 등에 관한 연구가 필요하다.

## 감사의 글

이 연구는 과기처의 G-7 연구비에 의해 수행되었음을 감사 드립니다.

## 참고문헌

1. Beyer, R. S. and L. S. Jensen (1989) Overestimation of the cholesterol content of eggs. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 917-920.
2. Byon, J. I., S. J. Park, K. A. Park, J. K. Ha, J. O. Kim and Y. L. Ha (1996) Beneficial effects of dietary anticarcinogenic conjugated linoleic acid (CLA) on the performances of laying hens and broilers. *J. Food Sci. Nutr.* **1**, 99-105.
3. Hargis, P. S., M. E. Van Elswyk and B. M. Hargis (1991) Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poultry Sci.* **70**, 874-883.
4. Naber, E. C. (1976) The cholesterol problem, the egg and lipid metabolism in the laying hen. *Poultry Sci.* **55**, 14-30.
5. Ha, Y. L., Y. G. Joo, T. S. Park, J. I. Lee, J. H. Kim, and G. B. Park (1997) Effects of dietary conjugated linoleic acid on cholesterol content of egg yolks. *88th AOCS Annual Meeting & Expo. Seattle WA, May 11-14, Session 58 (Abst.)*, p95.
6. Luhman, C. M., B. G. Miller and D. C. Beitz (1990) The effect of feeding lovastatin and colestipol on production and cholesterol content of eggs. *Poultry Sci.* **69**, 852-855.
7. Reddy, R. V., S. F. Lightsey and D. V. Maurice (1991) Research note: Effect of feeding garlic oil on performance and egg yolk cholesterol concentration. *Poultry Sci.* **70**, 2006-2009.
8. Qureshi, A. A., N. Abuirmeileh, Z. Z. Din, C. E. Elson and W. C. Burger (1983) Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fraction of garlic. *Lipids* **18**, 343-348.
9. Fang, T. J. and Y. S. Cheng (1993) Improvement of astaxanthin production by *Phaffiarhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioengin.* **75**, 466-469.
10. Lee, S. H., C. W. Park, Y. C. Lee, Y. S. Choi and Y. L. Ha (1997) Inhibition of DMBA-induced mouse epidermal carcinogenesis by astaxanthin-containing egg yolks. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **18** (in press).
11. Ha, Y. L., M. Storkson and M. W. Pariza (1990) Inhibition of benzo[a]pyrene induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* **50**, 1097-1101.
12. Lillie, R. D. and H. M. Fullmer (1976) *Histopathologic technique and practical histochemistry*, McGraw-Hill Book Co., New York p208-308.
13. Tanaka, T., T. Kawamori, M. Ohnishi, H. Makita, H. Mori, K. Satoh and A. Hara (1995) Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis* **16**, 2957-2963.
14. Tanaka, T., H. Makati, M. Ohnishi, H. Mori, K. Satoh and A. Hara (1995) Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res. Baltimore.* **55**, 4059-4064.
15. Christiansen, R., J. Glette, O. Lie, O. J. Torrissen and R. Waagbo (1995) Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish Diseases* **18**, 317-328.
16. Lalor, S. M. and M. N. O'Brien (1995) Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutr. Res.* **15**, 1695-1704.
17. Oshima, S., F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro and J. Terao (1993) Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **39**, 607-615.
18. Palozza, P. and N. L. Krinsky (1992) Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* **297**, 291-295.
19. Jyonouchi, H., S. Sun, Y. Tomita and M. D. Gross (1995) Astaxanthin, a carotenoid without vitamin A activity, augments antibody responses in cultures including T-helper cell clones and suboptimal doses of antigen. *J. Nutr.* **125**, 2483-2492.
20. Jyonouchi, H., R. J. Hill, Y. Tomita and R. A. Good (1991) Studies of immunomodulating actions of carotenoids. 1. Effects of beta-carotene and astaxanthin on murine lymphocyte functions and cell surface marker expression in in vitro culture system. *Nutr. Cancer* **16**, 93-105.

---

**Inhibition of Benzo[a]pyrene-Induced Mouse Forestomach Neoplasia by Astaxanthin-Containing Egg Yolks**

Sang H. Lee<sup>1</sup>, Cherl W. Park, Won S. Park, Young C. Lee<sup>2</sup>, Eui S. Choi<sup>3</sup>, and Yeong L. Ha\* (<sup>1</sup>*Institute of Hatai Confectionary Co., LTD, Seoul 140-721, Korea*, <sup>2</sup>*Department of Food Technology, Chungang University, Ahmsung 456-756, Korea*, <sup>3</sup>*Applied Microbiology Research Division, KRIBB, Daejeon 305-600, Korea*, *Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*)

**Abstract** : Anticarcinogenic activity of astaxanthin-containing egg yolks (designate AEY) was investigated for benzo[a]pyrene (BP)-induced mouse forestomach tumorigenesis initiating regimen. Female ICR mouse (6-7 weeks of age) were housed in polycarbonated cages (5 mice/cage; 20 mice/treatment) in a humidity-and-temperature-controlled facility and permitted free access to water and food. One week later, four and 2 days prior to p.o. treatment with BP (2 mg/0.2 ml corn oil), mice were given 0.2 ml PBS containing 50 mg AEY, 100 mg AEY, 150 mg AEY, or 150 mg CEY. Control mice were only given 0.2 ml PBS. Three days later this sequence was repeated for a total of 4 times. Beginning with the first intubation and continuing thereafter, body weight and food intake were recorded once weekly. All surviving mice were sacrificed 24 weeks after the first dose of BP. Mice treated with AEY developed only about one third as many neoplasms/animal as mice in control or CEY-treated group ( $p < 0.05$ ). Reduction effect of tumor development by AEY was dependent upon doses applied. Tumor incidence was also reduced by AEY treatments, but significantly reduced only by 150 mg AEY treatment when compared to that by control or CEY. Food intake and body weight were not affected by AEY treatment. These results indicate that AEY inhibits tumorigenesis of mouse forestomach induced by BP.

---

**Key words** : anticarcinogenic activity, astaxanthin-containing egg yolk, benzo[a]pyrene, mouse forestomach tumorigenesis

\* Corresponding author