

## Sarcoma-180 Cell로 유발한 Mouse 복수암에 대한 Astaxanthin 함유 난황의 효과

이상호\* · 박철우 · 박경아 · 이영춘\*\* · 최의성\*\*\* · 하영래†

경상대학교 농화학과, \*해태제과 중앙연구소

\*\*중앙대학교 식품공학과, \*\*\*생명공학연구소 응용미생물연구부

### Inhibition of Sarcoma-180 Cell-induced Mouse Ascites Cancer by Astaxanthin-containing Egg Yolks

Sang-Ho Lee\*, Cherl-Woo Park, Kyung-Ah Park, Young-Choon Lee\*\*,  
Eui-Sung Choi\*\*\* and Yeong Lae Ha†

Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

\*Institute of Hatai Confectionary Co., LTD, Seoul 140-721, Korea

\*\*Dept. of Food Technology, Chungang University, Ahnsung 456-756, Korea

\*\*\*Applied Microbiology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience  
and Biotechnology(KRIBB), Daejeon 305-600, Korea

#### Abstract

Anticarcinogenic activity of astaxanthin-containing egg yolk(designate AEY) was investigated for mouse ascites carcinogenesis induced by mouse Sarcoma-180(S-180) cells. Female ICR mice(8 mice/treatment, 7~8 weeks of age,  $25\pm1$ g) were injected, i.p. with S-180 cells( $1\times10^7$ cell/ml PBS). Two days later, each mouse was given 0.1ml PBS containing AEY(10, 25 or 50 $\mu$ g/g body weight) or control egg yolk(CEY; 50 $\mu$ g/g body weight) every other day for 7 times. Control mice were only given 0.1ml S-180 cells and 0.1ml PBS. Mice treated with 25 $\mu$ g/g body weight of AEY showed 24.8 days of life, which was equivalent to 138% of control mice's life(18.0 days). Based on dose-dependant experiment of AEY, mice treated with 10 $\mu$ g/g body weight showed slightly longer life(19.4 days) relative to mice treated with control mice, and mice treated with 50 $\mu$ g/g body weight exhibited 21.9 days of life. Mice treated with any dose of AEY exhibited longer life than mice with CEY 50 $\mu$ g/g body weight. Body weight of mice treated with AEY was reduced relative to that of control mice or CEY-treated mice. These results suggest that AEY inhibits the carcinogenesis of mouse ascites induced by S-180 cells.

**Key words:** astaxanthin-containing egg yolk, Sarcoma-180, ascites carcinogenesis

#### 서 론

달걀은 양질의 고단백질 식품으로 그 소비량이 많은 식품 중의 하나이다. 그러나 달걀의 난황에는 콜레스테롤의 함량이 높아 최근 소비량이 감소하는 추세에 있는 실정이다. 따라서 난황 중의 콜레스테롤 함량을 줄이면서 품질을 향상시키기 위한 많은 연구가 수행되고 있다(1-4). 이와 같은 연구에서는 주로 항산화성, 항암성 또는 면역증강성을 지닌 생리활성물질을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 난황에 그 생리활성물질을 보

장시키는 방법을 사용하고 있다(5-8). 이들 생리활성물질로는 주로 식품 및 약초 부산물, 지방 추출물, 합성화학물질 등이 이용되고 있다. 그러나 그 사용량이 제한되어있고 가격도 다소 높은 편이다.

최근 항암성 및 항산화성을 동시에 갖는 astaxanthin(Fig. 1)은 효모인 *Phaffia rhodozyma*의 변이주를 개발하여 상당량을 생산할 수 있게 되었다(3.5mg/g yeast)(9). 본 연구진에서는 이 효모에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 astaxanthin을 함유하는 난황 즉 astaxanthin-containing egg yolk(AEY)

\*To whom all correspondence should be addressed

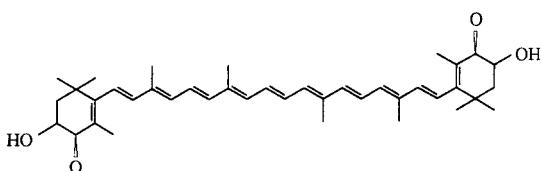


Fig. 1. Chemical structure of astaxanthin.

을 생산하였다. 따라서 이 난황을 직접 기능성 식품소재로 사용하기 위하여 여러 가지 생리활성 특히 항암성을 검증할 필요가 있었다. AEY의 생리활성에 관한 보고는 Lee 등(10)이 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(D-MBA)으로 유발한 two-stage mouse skin carcinogenesis의 initiation 단계를 저해한다는 보고(10)와 benzo[a]pyrene(BP)으로 유발한 mouse forestomach tumorigenesis의 initiation 단계를 저해한다는 보고(11)가 있을 뿐 그 외 AEY의 항암성에 관한 보고는 아직 없다.

본 연구에서는 S-180 cell로 유발한 mouse ascites cancer에 관한 AEY의 효과를 연구하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

AEY(108 $\mu$ g astaxanthin/g)과 control 난황(CEY: 0  $\mu$ g astaxanthin/g)은 해태제과연구소(서울)에서 공급 받았다. ICR mouse(male, 6~7주령), mouse-용 pellet 사료,  $\beta$ -chip은 Life Science사(대구)로부터 구입하였다. S-180 세포(KTCC: ATCC No. TIB 64)는 한국세포주은행으로부터 분양받았다. Penicillin-streptomycine, horse serum, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)는 모두 Gibco BRL사에서 구입하였다. 그 외 사용된 일반시약은 특급 내지 1급 이상이었다.

### 세포독성 실험

Female ICR mouse(8~12주령)의 복강에서 7일마다 계대 배양한 S-180 세포는 10% horse serum이 함유된 DMEM(pH 7.4) 배지에서 배양하였다.

암세포( $2\sim3\times10^5$  cell/ml)를 48시간 배양(logarithmic phase:  $0.8\sim1.0\times10^6$  cell/ml)하여  $37^\circ\text{C}$ 로 가온한 배지로 희석( $15\times10^4$  cells/ml)하였다. Cell culture plate(24-well plate: Nunc, Denmark)의 각 well에 희석된 세포 액 1.0ml와 시료(10mg AEY/ml PBS, 10mg CEY/ml PBS)를 배지로 10배 희석한 일정량(30, 60, 90, 120 $\mu$ l)을 가하고 전체 용량이 3ml가 되게 배지를 가하였다. Con-

trol은 희석된 세포현탁액(1.0ml)과 PBS 일정량에 배지를 첨가하여 3ml로 조절하였다. 세포의 배양은  $\text{CO}_2$  incubator(5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ )에서 48시간 행하였다. 시료의 세포독성은 처리된 세포액 50 $\mu$ l에 0.2% trypan blue-용액(50 $\mu$ l)을 가하여 염색하고 hemacytometer로 생존한 세포수를 측정하여 median effective dose( $\text{ED}_{50}$ ,  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 값으로 표시하였다.  $\text{ED}_{50}$ 은 처리군의 각 농도에 대한 성장을  $Y(\%)=(T-\text{Co})/(C-\text{Co})\times 100$ [Co는 배양 초기 ml당 평균 세포수, T와 C는 각각 처리와 대조군의 48시간 배양 후 ml당 평균 세포수]로 나타내었다(12).

### 동물실험

Female ICR mouse는  $\beta$ -chip이 깔린 polycarbonate cage(8 mice/cage)에서 mouse-용 pellet 사료로 1주일 동안 예비 사육하여 체중이  $25\pm 1\text{g}$ 인 것을 실험에 사용하였다. 물과 사료는 자유로이 제공하였고, 조명은 12시간 간격의 light-and-dark cycle을 유지하여 자연조명에 가깝게 하였으며, 사육실의 온도는  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , 습도는 60%로 조절하였다.

Mouse의 복강 내에 배양된 S-180 세포는 복강액을 0.85% ammonium chloride-용액에 혼합한 다음 원심분리(1,500rpm, 5min)하여 분리하였다. 분리된 S-180 세포에 PBS-용액을 가하여 조제한 세포 부유액( $1\times10^7$  cells/ml) 0.1ml( $1\times10^6$  cell)을 mouse의 복강에 주사하여 복수암을 유발시켰다. 복수암 유발 후 매 2일마다 PBS에 용해된 시료 0.1ml(CEY 50 $\mu$ g/g body weight, AEY 10 $\mu$ g/g body weight, AEY 25 $\mu$ g/g body weight, AEY 50 $\mu$ g/g body weight)을 mouse의 복강에 투여하였다. Control mouse에게는 PBS 0.1ml를 투여하였다. S-180 세포를 복강 투여한 후 3일 간격으로 mouse의 무게와 약 40일 동안 생존한 mouse의 수와 생존일을 조사하였다.

### 통계분석

얻어진 data에 대한 유의성은 최소 유의성 검정(LSD)으로 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### S-180세포에 대한 AEY의 독성

Table 1에서는 AEY의 S-180세포에 대한 세포 독성을 나타내고 있다. AEY의 S-180에 대한 독성은  $\text{ED}_{50}$  값이 58.78 $\mu$ g/ml이었다. 그러나 대조구인 CEY의 S-180 세포에 대한 독성은  $\text{ED}_{50}$  78.25 $\mu$ g/ml이었다. 따라서 AEY

Table 1. Cytotoxicity of AEY for mouse S-180 ascites cancer cells

Treatment <sup>1)</sup>	ED <sub>50</sub> (ug/ml) <sup>2)</sup>
CEY <sup>3)</sup>	78.25
AEY	58.78

<sup>1)</sup>DMEM was used for culture of S-180 cells as a medium<sup>2)</sup>Values were the average of three experimental data and standard deviation(SD) was less than 10% of the average value<sup>3)</sup>CEY and AEY stand for control egg yolk and astaxanthin-containing egg yolk, respectively

의 복수암 S-180 세포에 대한 독성은 CEY보다 강하였다.

## Mouse 복수암에 대한 AEY의 항암효과

AEY가 S-180에 대한 세포독성이 있었기에 AEY의 S-180 복수암 세포로 유발한 mouse 복수암에 대한 수명연장(평균 생존일 수) 및 생존율에 미치는 효과를 조사하였다. Table 2와 Fig. 2에서는 AEY의 S-180 세포로 유발한 mouse 복수암에 대한 수명 연장효과를 나타내고 있다. AEY의 mouse에 대한 수명 연장효과는 25 µg/g body weight 처리에서 가장 긴 24.8일이었으며, 이는 control에 비해 38% 수명 연장효과를 볼 수 있었다. 그러나 10µg/g body weight 처리나 50µg/g body weight 처리의 수명 연장효과는 25µg/g body weight 처리보다 다소 짧은 19.4일과 21.9일로 이는 control에 비해 각각 108%와 122%의 수명 연장효과였다. CEY 50µg/g body weight를 처리한 경우의 평균 수명은 AEY 10µg/g body weight의 경우와 비슷한 18.8일로 이는 control에 비해 104%의 수명 연장효과였다.

AEY의 처리에 따른 몸무게의 변화를 조사하였다 (Fig. 3). AEY 처리 mouse의 몸무게는 control구의 mouse 몸무게에 비해 처리 9일부터 감소되었다. 또한 AEY의 처리 농도에 따른 몸무게의 감소는 일정한 경향은

Table 2. Effects of AEY on mouse ascites carcinogenesis induced by S-180 cells

Treatment <sup>1)</sup>	Mean survival day	Survival rate <sup>2)</sup>
Control <sup>3)</sup>	18.0	100
CEY 50µg <sup>4)</sup>	18.8	104
AEY 10µg	19.4	108
AEY 25µg	24.8	138
AEY 50µg	21.9	122

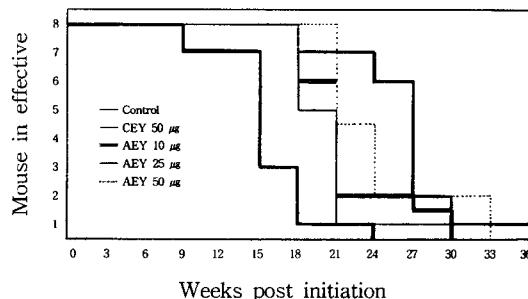
<sup>1)</sup>Each treatment was consisted of 8 mice<sup>2)</sup>Survival rate=[mean survival days of treatment mice/ mean survival day of control mice]×100<sup>3)</sup>Control mice were given only S-180 cells and PBS<sup>4)</sup>CEY and AEY stand for control egg yolk and astaxanthin-containing egg yolk, respectively

Fig. 2. Survival days of tumor-bearing mice induced by S-180 cancer cells and 2 days later, given i.p. AEY (10, 25, 50 µg/g body weight), CEY (50 µg/g body weight), or 0.1ml PBS for control group. Each treatment group was consisted of 8 mice. Survival day was counted for 40 days after initiation of tumor. The dark solid line, indicating that all mice died within 24 days post treatment, represents control.

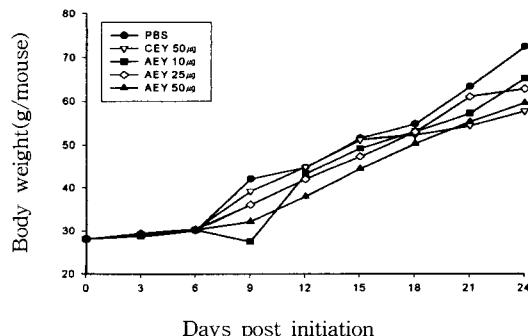


Fig. 3. Cumulative body weight of tumor-bearing mice induced by S-180 and 2 days later, given i.p. AEY (10, 25, 50 µg/g body weight), CEY (50 µg/g body weight), or 0.1ml PBS for control group. Each treatment group was consisted of 8 mice. Each point represents the average body weight of survived. Body weight of mice from AEY (50 µg/g body weight) treatment groups from day 9 to day 24 was significantly different ( $p < 0.05$ , LSD test) from that of control group mice.

없었으나 처리 18일까지 50µg/g body weight, 25µg/g body weight, 10µg/g body weight의 순으로 그 정도가 커졌다. CEY 처리 mouse의 몸무게는 control구 mouse보다는 다소 감소되었지만 AEY 처리 mouse의 몸무게보다는 증가되었다.

AEY가 처리된 mouse의 평균 수명은 CEY가 처리된 mouse의 평균 수명보다 길어(Table 2, Fig. 2), AEY의 수명 연장효과는 AEY에 함유된 astaxanthin의 효과로 생각된다. AEY의 처리 농도에 따른 수명 연장효과는 25µg/g body weight 처리에서 가장 컸으며, 50µg/g body weight 처리에서는 다소 감소되어 25µg/g body weight에 비해 독성효과가 있는 것으로 판단된다. AEY

50 $\mu\text{g/g}$  body weight로 처리된 mouse의 몸무게가 전 실험기간 동안 다른 처리에 비해 낮았다는 사실(Fig. 3)이 50 $\mu\text{g/g}$  body weight 처리 농도가 독성이 있다는 사실을 암시할 수도 있지만, 몸무게의 감소는 복수암의 억제에 의해 감소될 수도 있고 독성에 의해서도 감소될 수 있기 때문에 이 연구에서는 그 구분이 분명하지 않다.

Astaxanthin은 vitamin A의 전구체로 13개의 공연이 중결합을 갖는 구조상의 특징으로 항암성(10,13,14), 항산화성(15-18) 및 면역증강효과(15,19,20)를 갖는다고 보고되었다. 최근 이 색소의 산업적 활용에 대한 인식의 고조에 힘입어 *Phaffia rhodozyma*의 변이주를 개발하여 상당량의 astaxanthin(3.5mg/g yeast)을 생산할 수 있게 되어(9) 이 효모에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 기능성 식품첨가제로 사용할 목적으로 AEY을 생산하고 있다. 하지만 비록 astaxanthin의 생리활성을 밝혀졌지만 AEY의 생리활성에 대한 연구는 아직까지 미흡하다.

AEY의 항암성에 관한 연구는 DMBA로 유발한 two-stage mouse skin carcinogenesis의 initiation을 감소한다는 보고(10)와 BP으로 유발한 mouse forestomach tumorigenesis의 initiation을 억제한다는 보고(11)가 있을 뿐 아직 그 외 다른 보고는 없다. 천연 astaxanthin의 항암효과는 Tanaka 등이 azoxymethane을 수컷 쥐에 경구 투여한 다음 32주간 사육하여 colon carcinogenesis(13)와 oral carcinogenesis(14)에 대한 항암성이 있음을 보고하였다. 또한 astaxanthin은 항암효과와 관련되는 면역증강효과 있다고 보고되었지만(15,19,20), S-180 세포로 유발한 mouse ascites carcinogenesis를 억제한다는 보고는 없다. 따라서 본 연구는 AEY의 mouse ascites carcinogenesis 억제효과를 밝혀 AEY의 생리활성을 밝혔을 뿐만 아니라 astaxanthin이 mouse ascites carcinogenesis 발생을 억제한다는 사실을 간접적으로 구명하였다.

그러나 AEY를 기능성 식품소재나 의약품의 소재로 사용하기 위해서는 azoxymethane 등과 같은 여러 가지 발암물질에 대한 항암성은 물론 항산화성과 면역증강효과 등에 관한 연구가 더욱 필요하다.

## 요 약

몸무게당 25 $\mu\text{g}$  AEY를 처리한 mouse는 24.8일의 수명을 보여 대조구에 비하여 약 38%의 수명이 연장되었으며, 10 $\mu\text{g}$  AEY를 처리한 mouse는 19.4일, 50 $\mu\text{g}$  AEY를 처리한 mouse는 21.9일간 생존하여 각각 8%, 22%

의 수명 연장효과를 볼 수 있었으나, CEY 50 $\mu\text{g}$ 을 처리한 mouse는 4%의 수명이 연장되었다. 따라서 AEY의 복수암에 대한 수명 연장효과는 25 $\mu\text{g}$  AEY의 처리농도에서 가장 큰 효과를 볼 수 있었다.

## 감사의 글

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

## 문 헌

- Beyer, R. S. and Jensen, L. S. : Overestimation of the cholesterol content of eggs. *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 917(1989)
- Byon, J. I., Park, S. J., Park, K. A., Ha, J. K., Kim, J. O. and Ha, Y. L. : Beneficial effects of dietary anti-carcinogenic conjugated linoleic acid(CLA) on the performances of laying hens and broilers. *J. Food Sci. Nutr.*, **1**, 99(1996)
- Hargis, P. S., Van Elswyk, M. E. and Hargis, B. M. : Dietary modification of yolk lipid with menhaden oil. *Poultry Sci.*, **70**, 874(1991)
- Naber, E. C. : The cholesterol problem, the egg and lipid metabolism in the laying hen. *Poultry Sci.*, **55**, 14(1976)
- Ha, Y. L., Joo, Y. G., Park, T. S., Lee, J. I., Kim, J. H. and Park, G. B. : 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.), p.95(1997)
- Luhman, C. M., Miller, B. G. and Beitz, D. C. : The effect of feeding lovastatin and colestipol on production and cholesterol content of eggs. *Poultry Sci.*, **69**, 852(1990)
- Reddy, R. V., Lightsey, S. F. and Maurice, D. V. : Research note: Effect of feeding garlic oil on performance and egg yolk cholesterol concentration. *Poultry Sci.*, **70**, 2006(1991)
- Qureshi, A. A., Abuirmileh, N., Din, Z. Z., Elson, C. E. and Burger, W. C. : Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polarfraction of garlic. *Lipids*, **18**, 343(1983)
- Fang, T. J. and Cheng, Y. S. : Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioengin.*, **75**, 466(1993)
- Lee, S. H., Park, C. W., Lee, Y. C., Choi, Y. S. and Ha, Y. L. : Inhibition of DMBA-induced mouse epidermal carcinogenesis by astaxanthin-containing egg yolks. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **17**, (in press, 1998)
- Lee, S. H., Park, C. W., Park, W. S., Lee, Y. C., Choi, E. S. and Ha, Y. L. : Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by astaxanthin-

- containing egg yolks. *Agric. Chem. Biotech.*, **40**, 490 (1997)
12. Bahn, K. N., Lee, E. J., Yang, M. S., Kim, J. O. and Ha, Y. L. : Potent anticarcinogenic action of Moutan radix for mouse ascites cancer induced by mouse Sarcoma 180 cells. *Agric. Chem. Biotech.*, **4**, 364(1995)
13. Tanaka, T., Kawamori, T., Ohnishi, M., Makita, H., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A. : Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis*, **16**, 2957(1995)
14. Tanaka, T., Makati, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K. and Hara, A. : Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res. Baltimore*, **55**, 4059(1995)
15. Christiansen, R., Glette, J., Lie, O., Torrisen, O. J. and Waagbo, R. : Antioxidant status and immunity in Atlantic salmon, *Salmon salar* L., fed semi-purified diets with and without astaxanthin supplementation. *J. Fish Diseases*, **18**, 317(1995)
16. Lalor, S. M. and O'Brien, M. N. : Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutr. Res.*, **15**, 1695(1995)
17. Oshima, S., Ojima, F., Sakamoto, H., Ishiguro, Y. and Terao, J. : Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**, 607(1993)
18. Palozza, P. and Krinsky, N. L. : Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**, 291(1992)
19. Jyonouchi, H., Sun, S., Tomita, Y. and Gross, M. D. : 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(1995)
20. Jyonouchi, H., Hill, R. J., Tomita, Y. and Good, R. A. : 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 (1991)

(1997년 9월 20일 접수)