

## DMBA로 유발한 Mouse 피부암에 대한 AstaxanthinO 함유된 난황의 항암효과

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

<sup>1</sup>해태제과 중앙연구소, <sup>2</sup>중앙대학교 식품공학과, <sup>3</sup>생명공학연구소 응용미생물연구부, 경상대학교 농화학과  
(1997. 8. 13 접수)

## Inhibition of DMBA-Induced Mouse Epidermal Carcinogenesis by Astaxanthin-Containing Egg Yolks

Sang H. Lee<sup>1</sup>, Cherl W. Park, Young C. Lee<sup>2</sup>, Eui S. Choi<sup>3</sup>, Mu N. Kim 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, Ahnsung 456-756, Korea,

<sup>3</sup>Applied Microbiology Research Division, Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology (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 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced two stage mouse epidermal carcinogenesis. Female ICR mouse (6-7 weeks of age) were house in a humidity-and-temperature-controlled facility and subjected to feed and water *ad libitum*. AEY (10 mg/0.2 ml acetone) was painted on the back of mice 7 days, 3 days and 5 min before DMBA treatment (50 nmole/0.2 ml acetone). One week later after DMBA treatment, 6 µg tetradecanoyl 12-phorbol 13-O-acetate (TPA) dissolved in 0.2 ml acetone was applied on the mouse twice weekly over a period of 22 weeks. No sample was given to control mice. Control egg yolk (CEY) and astaxanthin-containing oil (designate AO) from *Phaffia rhodozyma* were used as positive controls. Mouse treated with AEY exhibited 10 tumors per mouse whereas control mouse exhibited 15 tumors per mouse, the fact that 33% reduction of tumor per mouse by AEY treatment. Tumor incidence was also reduced to 15% by AEY treatment when compared to that of control group. Such effects were also seen in CEY and AO treatment groups, but leaser extent. AO gave reduction of food intake and body weights relative to those of AEY and CEY, indicating toxicity of AO. These results suggest that AEY exhibits anticarcinogenic activity for DMBA-induced mouse epidermal carcinogenesis.

**Key words**: Astaxanthin-containing egg yolk, DMBA, anticarcinogen

## 서 론

Astaxanthin (Figure 1)은 vitamin A의 전구체로 carotenoid계에 속하는 색소로 자연계에 널리 분포되어 있다(Fang and Cheng, 1993; Jyonouchi *et al.*, 1995). Astaxanthin은 13개의 공역이중결합을 갖는 구조상의 특징으로 주홍색을 띠어 연어의 근육에 특유의 분홍색을 나타내는 주성분이며(Park, 1996;

Schiedt *et al.*, 1981) 또한 뱀장어지느러미의 주요 carotenoid임이 보고되었다(Kralow, 1975). 따라서 astaxanthin을 주로 화학적으로 합성하여 담수어 및 해수어에 착색효과를 나타내기 위해 주로 연어와 송어류의 물고기 류에 대해 급이 사료에 첨가하여 근육의 착색효과용으로 많이 이용되어왔다(Hata and Hata, 1973; Park, 1996; Schiedt *et al.*, 1985; Storebakken and Choubert, 1991).

\*To whom Correspondence should be addressed.

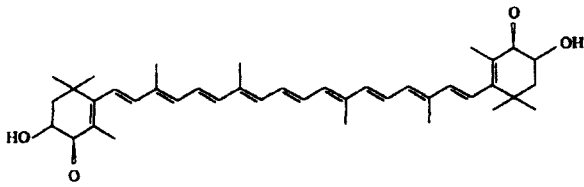


Fig. 1. Chemical structure of astaxanthin.

최근 이 색소에 대한 산업적 활용의 인식 고조에 힘입어 효모인 *Phaffia rhodozyma*의 변이주를 개발하여 상당량의 astaxanthin을 생산할 수 있게 되었다(3.5 mg/g yeast) (Fang and Cheng, 1993). 따라서 이 효모에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 astaxanthin 함유 난황(AEY)을 생산하고 있다. 이 난황을 직접 또는 간접적으로 기능성 식품소재나 의약품의 소재로 사용하기 위하여 여러 가지 생리활성특히 항암성을 검증할 필요가 있다.

Carotenoids 중에서  $\beta$ -carotene의 위암, 폐암, 피부암, 백혈암에 대한 항암효과에 대해서 많은 연구가 수행되었지만(Singh, 1992), astaxanthin의 항암효과에 대한 연구는 드물다. 천연 astaxanthin의 항암효과는 Tanaka(1995a; 1995b) 등이 4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO)를 수컷 쥐에 경구투여한 다음 32주간 사육하여 colon carcinogenesis와 oral carcinogenesis에 대한 항암성이 있음을 보고하였다. 또한 astaxanthin은 항암효과와 관련되는 면역증강효과가 있다고 보고되었다(Christiansen *et al.*, 1995; Jyonouchi *et al.*, 1995). 그러나 천연 astaxanthin의 피부암 억제효과에 대한 연구는 아직 문헌상에 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구에서는 astaxanthin 함유 난황이 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)로 유발한 mouse 피부암을 억제하는 효과가 있었기에 그 결과를 보고하고자한다.

## 재료 및 방법

### 재료

AEY(108  $\mu$ g astaxanthin/g), control 난황(CEY: 0  $\mu$ g astaxanthin/g), astaxanthin oil (AO: 35 mg astaxanthin/g)은 해태제과연구소 (서울)에서 공급받았다. DMBA, tetradecanoyl 12-phorbol-13-O-acetate (TPA)등은 Sigma (USA)사에서 구입하였다. 그 외 사용된 시약은 reagent급 이상이였다.

### 동물실험

AEY의 two-stage mouse epidermal carcinogenesis에 대한 연구 효과는 Ha 등<sup>3)</sup>의 방법에 준하였다. ICR 암컷 mouse (6~7주, 대구 Life Science 사)를 처리 당 20마리 (5/cage: cage당

mice의 평균무게가 동일)로 나누었다. 온도와 습도가 조절되는 시설에서 물과 사료 (Chow 사료: 대구 Life Science 사)를 자유롭게 먹도록 하면서 1주간 사육하여 적응시켰다. DMBA를 처리하기로 예정한날 10일 전에 각 mouse의 등 부위 피부털을 깎고 시료(10 mg AEY/0.2 ml acetone, 10 mg CEY/0.2 ml acetone, 10 mg AO/0.2 ml acetone)를 DMBA 처리 7일전, 3일전 그리고 5분전에 각각 0.2 ml씩 털을 깎은 mouse 등에 처리하였다. 피부암은 DMBA (50 nmole/0.2 ml acetone)로 유발하였다. Control group mouse에는 시료 대신 0.2 ml acetone만 처리하였다. DMBA 처리 일주일 후부터 TPA (6  $\mu$ g/0.2 ml acetone)를 DMBA 처리한 곳에 실험종료시까지 매주 금요일과 화요일에 각각 처리하였다. Papillomas의 발생을 DMBA처리 시기를 기점으로 매주 일회씩 기록하고 사료섭취량과 몸무게의 변화를 매주 1회 조사하였다.

## 결 과

AEY를 DMBA (50 nmole)로 피부암을 유발하기 7일, 3일, 5분전에 각각 10 mg씩 처리하고, 매주 2회씩 TPA 6  $\mu$ g을 처리하여 two-stage mouse skin carcinogenesis에 대한 AEY의 항암효과를 조사하였다. 각 mouse에는 총 30 mg의 시료 (AEY 처리에는 3.24  $\mu$ g astaxanthin; AO 처리에서는 1.05 mg astaxanthin)와 50 nmole의 DMBA 그리고 264  $\mu$ g의 TPA가 투여되었다. CEY와 AO 처리는 AEY에 대한 비교 처리구로 사용되었고, 대 control 처리는 시료 없이 DMBA와 TPA만 처리하였다.

Figure 2에서는 DMBA로 유발된 전형적인 mouse 피부암을 보여주고 있다. 암들은 사마귀와 유사한 papilloma였다. AEY 처리는 control 처리에 비하여 papilloma의 수나 발병율(tumor incidence)을 저하시켰다.

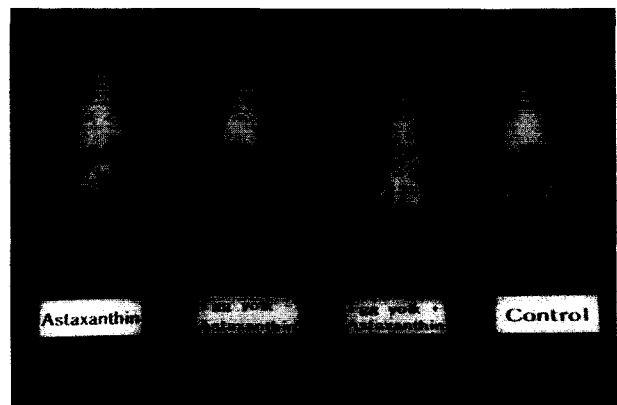


Fig. 2. Typical mouse skin papillomas induced by DMBA.

**Table 1.** Reduction of tumor incidence of DMBA-induced mouse skin carcinogenesis by AEY

Treatment <sup>1)</sup>	Mice in effective	Incidence(%) <sup>2)</sup>
Control	18	100
CEY	20	100
AEY	20	86
AO	20	95

<sup>1)</sup>Female ICR mouse (6~7 weeks of age) was used in Control, CEY (control egg yolks), AEY (astaxanthin-containing egg yolks) and AO (astaxanthin-containing oil). Mouse in control treatment group was received 50 nmole DMBA and 264 µg TPA only.

<sup>2)</sup>Incidence represented as the percentage of tumor-bearing mice to mice in effective in treatment group and was calculated from the data 22 weeks post DMBA treatment.

Tumor는 처리 7일째부터 발생하기 시작하였다(Fig. 3). AEY 처리구에서의 mouse당 tumor의 수는 control 처리구에 비해 전 실험기간 동안 30% 이상 감소되었고, CEY나 AO의 처리구보다도 훨씬 낮았다. 처리후 22주 째의 mouse당 tumor의 수는 DMBA만 처리한 control 처리구에서 15개의 암이 발생하였지만 AEY처리구는 10개로서 약 33%가 감소되었고 이 숫자는 CEY나 AO의 감소효과가 각각 11.5, 12.5개 보다 컸다(Fig. 2). 암 발병율은 Table 1에서 보는 바와 같이 control 처리구에는 100%였으나, AEY의 처리구에서는 86%로 감소되었다. 또한 CEY처리구에서는 100%, AO처리구에서는 95%로 나타났다. 따라서 암 발병율은 AEY 처리구에서 control 처리구나 CEY 처리구 또는 AO 처리구보다 훨씬 낮아 AEY의 암 발병을 감소효과를 볼수 있었다.

AEY 시료 처리에 의한 사료섭취량(95 Kcal/week/mouse)은

**Table 2.** Food intake and body weight of the mice treated with AEY

Treatment <sup>1)</sup>	Food intake <sup>2)</sup> (Kcal/week/mouse)	Body weight <sup>3)</sup> (g/mouse)
Control	89.1±3.0 <sup>4)</sup>	30.5±2.2
CEY	90.9±3.5	35.5±3.0
AEY	95.0±4.7	34.4±2.9
AO	85.2±3.4 <sup>5)</sup>	26.7±1.2 <sup>5)</sup>

<sup>1)</sup>Female ICR mouse (6~7 weeks of age) was used in Control, CEY (control egg yolks), AEY (astaxanthin-containing egg yolks) and AO (astaxanthin-containing oil). Mouse in control treatment group was received 50 nmole DMBA and 264 µg TPA only. Mouse of other treatment group was given 30 mg sample, 50 nmole DMBA and 264 µg TPA.

<sup>2)</sup>Mean food intake over a period of 22 weeks.

<sup>3)</sup>Mean body weight over a period of 22 weeks.

<sup>4)</sup>Mean±SEM

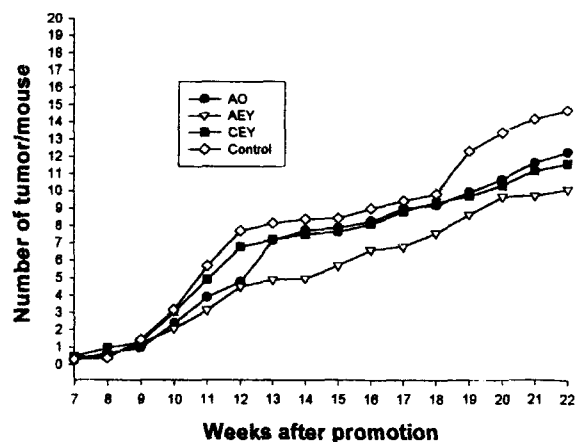
<sup>5)</sup>significantly different from the other values at P<0.05 (Tuckey's w test) for food intake and body weight.

control 처리구의 사료섭취량(89.1 Kcal/week/mouse)보다 높았으나, AO의 처리는 사료섭취(85.2 Kcal/week/mouse)을 감소시켰다(Table 2). 또한 AEY 처리구의 mouse 몸무게(34.4 g/mouse)는 control 처리구의 mouse 몸무게 (30.5 g/mouse) 보다 증가하였지만 AO 처리구의 mouse 몸무게(26.7 g/mouse)는 감소하였다(Table 2).

## 고 찰

AEY는 DMBA로 유발한 two stage mouse epidermal carcinogenesis에서 control과 비교할 때 약 33%의 발암을 억제하였고, 발병율도 15% 억제하였다(Fig. 3와 Table 1). 이 효과는 CEY(23% 발암억제효과, 0% 발병을 억제효과)나 AO(17% 발암억제효과, 5% 발병을억제)의 효과보다 훨씬 높았다(Fig. 3와 Table 1). 또한 주어진 조건하에서 AEY는 독성을 나타내지 않았지만 AO는 상당한 독성을 나타내었다(Table 2). AO가 독성을 나타낸 것은 mouse에 처리된 astaxanthin의 양 1.05 mg이 다소 과다하였기 때문인 것으로 생각된다.

30 mg AEY(mouse 당 처리량)에 함유된 astaxanthin은 3.24 µg으로 AO의 1.05 mg에 비하면 아주 적은 량이다. 그러나 AEY의 항암효과를 astaxanthin을 함유하지 않은 CEY 효과와 비교할 때 AEY가 더 강한 항암효과를 보였는데, 그것은 astaxanthin의 효과로 생각된다. Two-stage mouse epidermal carcinogenesis model에서 사용할 수 있는 최대의 시료의 양은 mouse 당 30 mg 정도이다(Ha *et al.*, 1987; Wattenberg, 1983). 만약에 난황중의 astaxanthin의 농도를 높일 수만 있다면 AEY



**Fig. 3.** Effect of AEY on the cumulative numbers of mouse skin tumor induced by DMBA. Mouse was painted either 30 mg AEY, CEY, or AO plus 50 nmole DMBA plus 264 µg TPA. Mouse of the control group was given only DMBA plus TPA.

의 항암성을 더 높일 수 있을 것으로 생각된다.

DMBA로 유발한 two-stage mouse epidermal carcinogenesis에서 AEY에 함유된 astaxanthin의 항암성 기작에 관한 구체적인 연구는 본 연구에서 수행되지 않았고 또한 문헌에서도 찾아보기 어렵다. 그러나 많은 항산화제가 항암성 물질이다 (Wattenberg, 1983). 따라서 astaxanthin의 singlet oxygen quenching 작용(Nobuyoshi *et al.*, 1996; Oshima *et al.*, 1993; Schroeder and Johnson, 1995), 항산화작용(Kralow, 1975; Lee and Ding, 1995; Miki *et al.*, 1995; Schroeder and Johnson, 1995), 동물의 근육이나 간에 항산화제 vitamin인 retinol이나  $\alpha$ -tocopherol의 축적을 촉진하는 능력, 면역작용(Christiansen *et al.*, 1995; Jyonouchi *et al.*, 1995) 등의 복합적인 작용이 astaxanthin의 항암성에 기인하는 것으로 생각된다. 그러나 정확한 기작에 관한 연구가 수행되어야 한다고 믿는다.

## 감사의 글

본 연구는 1996년도 과제처 G-7 연구비에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

## 참고문헌

- Christiansen, R., J. Glette, O. Lie, O.J. Torrissen and R. Waagbo: 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).
- Fang, T.J. and Y.S. Cheng: Improvement of astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* through mutation and optimization of culture conditions. *J. Ferment. Bioengin.*, **75**: 466 (1993).
- Ha, Y.L., N.K. Grimm and M.W. Pariza: Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.*, **8**: 1881 (1987).
- Hata, M. and M. Hata: Studies on astaxanthin in some freshwater fishes. *Tohoku J. Agric Res.* **24**: 192 (1973).
- Jyonouchi, H., S. Sun, Y. Tomita and M.D. Gross: 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).
- Kralow, P.O.: Carotenoids in fish. *Acta Hydrobiol.*, **17**: 311 (1975).
- Lalor, S.M. and M.N. O'Brien: Astaxanthin: Antioxidant effects in chicken embryo fibroblasts. *Nutr. Res.*, **15**: 1695 (1995).
- Lee, S.H. and D.B. Min: Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J. Agri. Food Chem.*, **38**: 1630 (1990).
- Lee, Y.K. and S.Y. Ding: Effect of dissolved oxygen partial pressure on the accumulation of astaxanthin in chimostat cultures of *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *J. Phycol.*, **31**: 922 (1995).
- Miki, W., N. Otaki, N. Shimidzu and A. Yokoyama: Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**: 35 (1995).
- Nobuyoshi, S., G. Masafumi and N. Wataru: Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Sci.* **62**: 134 (1996).
- Oshima, S., F. Ojima, H. Sakamoto, Y. Ishiguro and J. Terao: Inhibitory effect of beta-carotene and astaxanthin on photosensitized oxidation of phospholipid bilayers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**: 607 (1993).
- Palozza, P. and N.I. Krinsky: Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.*, **297**: 291 (1992).
14. Park, M.Y.: Metabolism of dietary carotenoids and bioconversion pathways of retinoids in Masu salmon, *Oncorhynchus macrostomus* and Eel, *anguilla japonica.*, Ph. D thesis Gyeongsang National University, (1996).
- Schiedt, K., F.J. Leuenberger and M. Vecchi: Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin 5. Ex wild salmon (*Salmosalar* and *oncorhyn* (US). *Helv. Chim. Acta.*, **64**: 449 (1981).
- Schedt, K., F.J. Leuenberger, M. Vecchi and M. Grinz: Absorption, retention, and metabolic transformation of carotenoids in rainbow trout, salmon, and chicken. *Pure Appl. Chem.*, **57**: 685 (1985).
- Schroeder, W.A. and E.A. Johnson: Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phaffia rhodozyma*. *J. Biol. Chem.*, **270**: 18374 (1995).
- Singh, V.N.: Role of  $\beta$ -carotene in disease prevention with special reference to cancer, In *Lipid-Soluble antioxidants: In Biochemistry and clinical applications* Ed. by A.S.H. Ong and L. Parker. Birkh user, (1992).
- Storebakken, T. and G. Choubert: Flesh pigmentation of rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. *Aquaculture.*, **95**: 289 (1991).
- Tanaka, T., T. Kawamori, M. Ohnishi, H. Makita, H. Mori, K. Satoh and A. Hara: Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by dietary administration of naturally occurring xanthophylls astaxanthin and canthaxanthin during the postinitiation phase. *Carcinogenesis.*, **16**, 2957 (1995a).
- Tanaka, T., H. Makati, M. Ohnishi, H. Mori, K. Satoh and A. Hara: Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.*, **55**: 4059 (1995b).
- Wattenberg, L.W.: Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. *Cancer Res. (Suppl.)*, **43**: 2448s (1983).