

Astaxanthin처리 산란계로부터 생산된 난황이 Mouse의 마크로파지 활성과 응집소가 및 용혈소가에 미치는 영향

김홍출* · 박숙자 · 김정곤 · 김영림 · 박원석 · 조용운* · 조현중** · 김정한 · 하영래†

경상대학교 응용화학식품공학부

*진주산업대학교 미생물공학과

**농협중앙회 식품연구소

Effect of the Egg Yolks from Laying Hens Intubated Astaxanthin on the Macrophage Activity, Hemagglutinin-titer and Hemolysin-titer

Hong-Chul Kim*, Sook-Jahr Park, Jeong-Kon Kim, Young-Rim Kim, Won-Seck Park,
Yong-Un Cho*, Hyeon-Jong Cho**, Jeong-Hwan Kim and Yeong-Lae Ha†

Division of Applied Life Sciences and Institute of Agriculture and Life Sciences,
Graduate School, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

*Dept. of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju 660-758, Korea

**Food Research Institute, National Agricultural Cooperative Federation, Goyang 412-707, Korea

Abstract

Effect of the egg yolks from laying hens intubated, p.o., astaxanthin (designated AEY) on mouse humoral immunity was investigated using male ICR mouse (6~7 weeks of age). Mice were adapted in a temperature- and humidity-controlled house for one week and randomly divided into 5 treatment groups (9 mice/cage/treatment). Mice were intubated p.o., AEY (100, 250 and 500 µg) or control egg yolks (CEY, 250 µg), dissolved in 0.1 mL DMSO, for consecutive 4 days. At day 5, carbon suspension (pilot drawing ink 3 mL + 3% gelatine 3 mL) was injected 3 µL per 1 g body weight through tail vein. Carbon clearance time was measured at 5 and 35 minutes post the injection of carbon suspension. Another two experiments were conducted to determine the hemagglutinin-titer (HGT) and hemolysin-titer (HLT) with male ICR mouse (8 mice/cage/treatment). Mice treated with AEY were induced immune activity with SRBC. HGT and HLT were measured from the blood at day 1 and 3 after treatment of SRBC. AEY treatment reduced the carbon clearance time. Especially the carbon clearance time by 500 µg AEY treatment was 5.00 minutes, which was very short time compared with 9.42 minutes by control and 9.01 minutes by CEY. AEY group showed slightly higher values of HGT and HLT than CEY group and control. At day 1, HGT in control, 250 µg CEY and 250 µg AEY groups was 5.50, 5.63, and 6.00, respectively. Similarly, HLT in control, 250 µg CEY and 250 µg AEY groups was 4.75, 5.38, and 5.50, respectively, at day 1. These results suggest that AEY exhibited immunity-enhancing effect.

Key words: astaxanthin, egg yolk, macrophage, hemagglutinin-titer, hemolysin-titer

서 론

Astaxanthin(3,3'-dihydroxy-β,β'-carotene-4,4'-dione, Fig. 1)은 vitamin A의 전구체로 carotenoid계에 속하는 색소이며 자연계에 널리 분포되어 있다. 또한 13개의 공역 이중결합을 갖는 구조상의 특징으로 항암성 및 항산화성 등의 생리활성을 나타낸다.

Astaxanthin은 천연산 연어(1), 뱀장어 지느러미(2), 담수어 및 해수어(3-6)등에서 착색효과를 나타내는 물질로 근육 내에서 대사되어 여러 가지 대사산물로 변환된다. Schiedt 등(7)은 무지개 송어에 astaxanthin을 급여한 결과, 간장에서

β-carotene을 거쳐 vitamin A₁ alcohol로 전환되고, 다시 vitamin A₂ alcohol로 환원적 대사를 이룬다고 보고하였다. Park(5)은 선천어와 뱀장어에 astaxanthin을 급여한 결과 astaxanthin이 triol을 거쳐 zeaxanthin으로 변환됨을 확인하였고, Davies와 Davies(8)는 은어에 astaxanthin을 투여한 결과 vitamin A₂ alcohol로 전환된다고 보고하였다.

Astaxanthin을 포함한 carotenoids는 활성산소를 불활성화시키는 항산화 효과 및 항암효과가 있는 것으로 알려져 있다. Carotenoids 중에서 α-, β-carotene은 위암, 폐암, 피부암, 백혈암, 간암에 대한 항암효과에 대해서 가장 많은 연구가 수행된 화합물이다(1,9-12). Tanaka 등(13,14)은 astaxan-

†Corresponding author. E-mail: ylha@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5471, Fax: 82-55-757-0178

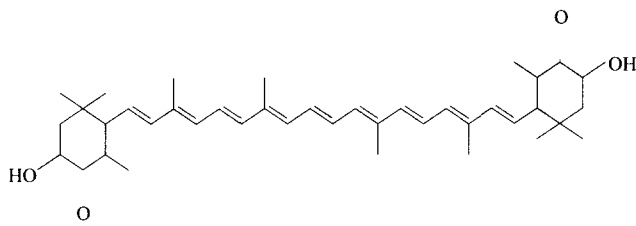


Fig. 1. Chemical structure of astaxanthin.

thin이 4-nitroquinoline 1-oxide(4-NQO)에 대한 항암성을 발표하였고, Kobayashi 등(15-17)은 활성산소인 singlet oxygen quenching 함으로써 항산화 효과를 가진다고 보고하였다.

본 연구진은 Fang과 Cheng(18)에 의해 개발된 *Phaffia rhodozyma*에서 얻어진 astaxanthin을 산란계의 사료첨가제로 사용하여 생산된 난황(AEY)이 7,12-dimethylbenz[a]anthracene(DMBA)으로 유발한 mouse 피부암(19), benzo[a]pyrene (BP)으로 유발한 mouse의 전이암(20), S-180으로 유발한 mouse 복수암(21)을 억제하였다고 보고하였다. 그러나 AEY가 면역 기능에 미치는 영향에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 astaxanthin을 산란계에 경구 투여하여 얻어진 AEY가 면역 기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 mouse의 마크로파지의 활성과 응집소가 및 용혈소가를 조사하였다.

재료 및 방법

재료

부화 후 85일 경과한 산란계인 하이라인 브라운에 매일 1회씩 7일 동안 astaxanthin(Sigma, St. Louis, USA) 4 mg씩을 경구 투여하여 7일째에 얻은 난황을 acetone(1 g/10 mL)으로 추출하고 용매제거 후 AEY로 사용하였다. 무처리 산란계의 난황은 acetone(1 g/10 mL)으로 추출하고 용매제거 후 control egg yolk(CEY)로 사용하였다. 실험에 사용한 AEY 중의 총 carotenoids 함량은 2.88 mg%이었고 그 조성은 총 carotenoid 함량을 100%로 봤을 때, lutein 32.8%, zeaxanthin 24.5%, β -carotene 10.7%, β -cryptoxanthin 8.3%, α -cryptoxanthin 7.6%, cynthiaxanthin 4.1%, canthaxanthin 2.8%, astaxanthin 2.7%, triol 2.6% 및 unidentified carotenoid 3.9%였다(22). CEY의 총 carotenoids 함량은 2.58 mg%이었고 그 조성은 lutein 41.3%, zeaxanthin 31.3%, β -cryptoxanthin 12.3%, β -carotene 10.6%, astaxanthin 2.2% 및 unidentified carotenoid 2.3%였다(22). 실험동물은 male ICR mouse(6~7주령)를 효창 Science사(Daegu, Korea)에서 구입하였다. Dimethylsulfoxide(DMSO)는 Kanto사(Tokyo, Japan), EDTA와 gunia pig serum은 Gibco사(Rockville, USA), dextrose와 sodium chloride는 Shinyo pure chemicals사(Osaka, Japan)에서 구입

하였다. 그 외 사용된 시약은 1급 이상이였다.

Mouse 처리

온도($20 \pm 2^\circ\text{C}$)와 습도(60%)가 조절되는 시설에서 물과 chow diet(Daegu, Korea)를 자유롭게 먹도록 하면서 1주일 간 사육하여 적응시킨 mouse를 5개의 처리구(9 mice/cage/treatment; cage당 평균무게가 동일)로 나누었다. Mouse의 몸무게 g 당 100, 250, 500 μg 의 AEY와 CEY(250 μg)를 100 μL 의 DMSO에 용해하여 1일 1회 4일간 복강 투여하였다.

마크로파지의 탐식능 측정

시료 최종투여 1일 후에 carbon suspension(pilot drawing ink 3 mL+3% gelatine 3 mL)을 3 $\mu\text{L}/\text{g}$ 의 농도로 꼬리 정맥에 주사하고 5분과 35분 후에 안정맥총에서 heparin 처리된 모세관으로 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액 20 μL 를 0.1% Na_2CO_3 용액 2 mL에 현탁시켜 675 nm에서 흡광도를 측정하고 carbon clearance($t_{1/2}$, min)를 계산하여 마크로파지의 활성을 측정하였다. Carbon clearance는 다음과 같이 계산하였다. Carbon clearance($t_{1/2}$, min) = $(t_2 - t_1) / 1/2 \times (OD_{t_1} - OD_{t_2})$. 단, $t_{1/2}$ 는 carbon clearance의 평균시간(min), t_1 는 5 min, t_2 는 35 min, OD_{t_1} 는 5분 후에 채취한 혈액으로 측정된 흡광도 값, OD_{t_2} 는 35분 후에 채취한 혈액으로 측정된 흡광도 값을 의미한다.

적혈구 응집소가 및 용혈소가의 측정

항원 SRBC의 조제: Heparin 처리된 멸균 주사기로 응성 면양의 경동맥에서 채혈하여 EDTA 처리된 vial에 옮기고 같은 양의 alserver용액(pH 6.7) [1M citrate에 20.5 g dextrose (114 mM), 7.9 g sodium citrate \cdot 2H₂O(27 mM), 4.2 g NaCl (71 mM)을 첨가]을 가하여 4°C에 보관하면서 항원 sheep red blood cell(SRBC)로 사용하였다. 이 항원의 사용기간은 2주 이내로 하였다.

응집소가의 측정

시료(AEY 혹은 CEY) 최종투여 1일 후에 SRBC 0.1 mL을 꼬리정맥에 주사하였다. SRBC 주사 후 1일과 3일째에 mouse의 안와에서 채혈하여 원심분리로 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 56°C에서 30분간 방치하여 보체를 비동화시킨 후 25 μL 를 microtitration tray의 well에 점적하여 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)로 2배 계열 희석하였다. SRBC 용액(2×10^8 cell/mL) 25 μL 를 각 well에 첨가하여 37°C에서 2시간 방치시켜 적혈구의 응집여부를 관찰하고 50% 이상 응집을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 \log_2 로 나타내었다.

용혈소가의 측정

시료(AEY 혹은 CEY) 최종투여 1일 후에 SRBC 0.1 mL을 꼬리정맥에 주사하였다. SRBC 주사 후 1일과 3일째에 mouse의 경동맥을 절단하여 채혈하고 원심분리로 혈청을 분리하였다. 혈청은 56°C에서 30분간 방치하여 보체를 비동화시킨 후 25 μL 를 microtitration tray의 well에 점적하여 PBS

(pH 7.4)로 2배 계열 희석하였다. SRBC 용액(2×10^8 cell/mL) 25 μ L를 각 well에 첨가하여 각 well에 PBS용액으로 20배 희석한 gunia pig serum을 25 μ L씩 가하여 37°C에서 1시간 방치하였다. 50%이상 용혈을 일으키는 혈청의 최고 희석도를 \log_2 수치로 나타내었다.

결과 및 고찰

AEY가 mouse의 마크로파지 활성에 미치는 영향

AEY가 mouse의 마크로파지 활성에 미치는 영향은 Fig. 2와 같다. 처리 3일 후에 control과 250 μ g CEY 및 AEY의 carbon clearance time이 각각 9.42, 9.01, 8.90 분으로 AEY 처리구가 control이나 CEY 처리구에 비해 carbon clearance time이 짧았다. 특히 AEY 500 μ g/g 처리구에서는 carbon clearance 시간이 5분으로 대조구의 9.42분, CEY의 9.01분보다 유의성있는 감소를 보였다. 따라서 마크로파지의 활성이 AEY의 농도가 증가할수록 촉진됨을 알 수 있었고 이것은 AEY가 면역효과를 증진시킨 것으로 추측된다.

AEY가 mouse의 적혈구의 응집소가 및 용혈소가에 미치는 영향

AEY가 mouse 적혈구의 응집소가에 미치는 영향은 Table 1과 같다. AEY 농도가 100, 250, 500 μ g/g으로 증가함에 따라 응집소가가 1일에는 각각 5.38, 6.00, 5.98로, 3일에는 각각 5.28, 5.50, 6.25로 나타났다. 즉, AEY처리 농도가 증가함에 따라 응집소가가 점차 증가하였다. SRBC 처리 1일과 3일째에 250 μ g 처리구를 비교해 보면, control, CEY, AEY의 응집소가가 각각 5.50, 5.63, 6.00 및 5.25, 5.38, 5.50으로 control이나 CEY에 비해 AEY가 높은 응집소가를 나타내었다.

AEY가 mouse 적혈구의 용혈소가에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 용혈소가 역시 AEY의 처리농도가 100, 250, 500 μ g/g으로 증가함에 따라 SRBC 처리 1일에는 각각 5.25, 5.50, 5.88로 3일에는 각각 5.75, 5.63, 6.00으로 점차 증가하였다.

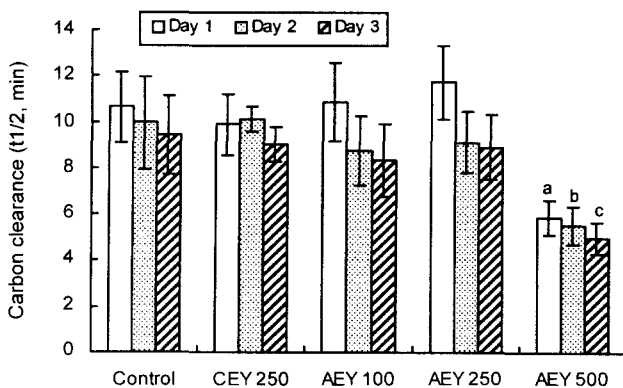


Fig. 2. Effect of the acetone extract of AEY on the phagocytic activity in mice.

The letters of a, b and c mean the significant difference at $p < 0.05$ from other treatment at day 1, 2 and 3, respectively, by t -test.

Table 1. Effects of the acetone extract of AEY on the hemagglutinin-titer to SRBC

Treatment ¹⁾ (μ g/g)	Hemagglutinin-titer (\log_2)	
	Day 1	Day 3
Control	5.50 \pm 1.91 ²⁾	5.25 \pm 0.96
CEY 250	5.63 \pm 1.49	5.38 \pm 0.48
AEY 100	5.38 \pm 1.70	5.28 \pm 0.48
AEY 250	6.00 \pm 1.14	5.50 \pm 1.00
AEY 500	5.98 \pm 1.18	6.25 \pm 0.50

¹⁾Sample was injected four consecutive days before SRBC injection.

²⁾Each value is mean \pm SD of 4 mice.

Table 2. Effects of the acetone extract of AEY on the hemolysin-titer to SRBC

Treatment ¹⁾ (μ g/g)	Hemolysin-titer (\log_2)	
	Day 1	Day 3
Control	4.75 \pm 0.96 ²⁾	4.25 \pm 0.50
CEY 250	5.38 \pm 0.48	5.63 \pm 0.48
AEY 100	5.25 \pm 0.50	5.75 \pm 0.96
AEY 250	5.50 \pm 1.00	5.63 \pm 0.48
AEY 500	5.88 \pm 0.85	6.00 \pm 0.82

¹⁾Sample was injected four consecutive days before SRBC injection.

²⁾Each value is mean \pm SD of 4 mice.

SRBC 처리 1일과 3일 후, 250 μ g 처리구에서 control, CEY, AEY의 용혈소가는 각각 4.75, 5.38, 5.50 및 4.25, 5.63, 5.63이었는데 응집소가와 마찬가지로 AEY가 가장 높은 수치를 나타내는 경향이였다.

결과를 종합하여 볼 때, Table 1과 2에서 보는 바와 같이 AEY 처리농도가 증가할수록 응집소가와 용혈소가가 증가함을 알 수 있었다. 이처럼 AEY가 control이나 CEY에 비해 높은 응집소가와 용혈소가를 가지는 것은 Kim 등(22)이 보고한 바와 같이 AEY에 함유된 astaxanthin의 대사산물인 α -cryptoxanthin, cynthiaxanthin, canthaxanthin, triol 등이 홍선이나 간 등에 영향을 미쳐 면역효과를 증진시켰기 때문인 것으로 추측된다. 따라서 정확한 기작에 대한 연구가 더 수행되어야 할 것이다.

요 약

마크로파지의 활성을 조사하기 위해 carbon clearance time을 조사한 결과 AEY 처리구가 control이나 CEY 처리구에 비해 짧았다. 특히 AEY 500 μ g 처리에서 carbon clearance 시간이 5분으로 control에서 9.42분, CEY(250 μ g 처리)에서 9.01분보다 유의성있는 감소를 보였다. AEY 처리에 의해 응집소가와 용혈소가가 다소 증가되었다. SRBC 처리 1일째와 3일째에 250 μ g 처리구를 비교해 보면, control, CEY, AEY의 응집소가는 각각 5.50, 5.63, 6.00 및 5.25, 5.38, 5.50로 용혈소가는 각각 4.75, 5.38, 5.50 및 4.25, 5.63, 5.63으로 AEY 처리구가 control, CEY 처리구에 비해 면역 활성이 있었지만

유의성은 없었다.

감사의 글

이 연구는 농림기술연구개발과제(299017-2)와 과기처의 G-7 연구비에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

문헌

- Schiedt, K., Leuenberger, F.J. and Vecchi, M. : Natural occurrence of enantiomeric and meso-astaxanthin 5. Ex wild salmon. *Helv. Chim. Acta.*, **64**, 449-457 (1981)
- Kralow, P.O. : Carotenoids in fish. *Acta. Hydrobiol.*, **17**, 311-317 (1975)
- Hata, M. : Studies on astaxanthin in some fresh-water fishes. *Tohoku J. Agric Res.*, **24**, 192-196 (1973)
- Kitahara, T. : Behavior of carotenoids in the chum salmon on corhynchus keta during development. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **50**, 531-536 (1984)
- Park, M.Y. : Metabolism of dietary carotenoids an bioconversion pathways of retinoids in Masu salmon, *Oncorhynchus macrostomus* and Eel, *Anguilla japonica*. *Ph.D thesis*, Gyeongsang National University (1996)
- Storebakken, T. and Choubert, G. : Flesh pigmentation of rainbow trout fed astaxanthin or canthaxanthin at different feeding rates in freshwater and saltwater. *Aquaculture*, **95**, 289-295 (1991)
- Schiedt, K., Leuenberger, F.J., Vecchi, M. and Grinz, M. : Absorption, retention, and metabolic transformation of carotenoids in rainbow trout, salmon, and chicken. *Pure Appl. Chem.*, **57**, 685-690 (1985)
- Davies, B.W. and Davies, B.H. : Retinol and 3,4-dehydroretinol formation from xanthophylls in the gold fish, *Carassius auratus*. *Biochem. Soc. Trans.*, **14**, 952 (1986)
- Lee, D.Y., Han, S.S. and Lee, S.M. : Immunopathology of spleen following 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene treatment in BALB/c mice. *Korean J. Toxicol.*, **8**, 179-189 (1992)
- Miki, W., Otaki, N., Shimidzu, N. and Yokoyama, A. : Carotenoids as free radical scavengers in marine animals. *J. Mar. Biotechnol.*, **2**, 35-40 (1995)
- Nobuyoshi, S., Masafumi, G. and Wataru, M. : Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Sci.*, **62**, 134-137 (1996)
- Gradelet, S., Le Bon, A.M., Berges, R., Suschetet, M. and Astorg, P. : Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B₁-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat : Role of the modulation of aflatoxin B₁ metabolism. *Carcinogenesis*, **19**, 403-411 (1998)
- 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**, 2957-2963 (1995)
- 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**, 4059-4064 (1995)
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nishio, N., Nagai, S., Kurimura, Y. and Tsuji, Y. : Antioxidant role of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 351-356 (1997)
- Lee, S.H. and Min, D.B. : Effects, quenching mechanisms, and kinetics of carotenoids in chlorophyll-sensitized photooxidation of soybean oil. *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1630-1634 (1990)
- Schroeder, W.A. and Johnson, E.A. : Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against singlet oxygen damage. *J. Ind. Micro.*, **14**, 502-507 (1995)
- 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**, 466-469 (1993)
- Lee, S.H., Park, C.W., Lee, Y.C., Choi, E.S., Kim, M.N. and Ha, Y.L. : Inhibition of DMBA-induced mouse epidermal carcinogenesis by astaxanthin-containing egg yolks. *Environmental Mutagens & Carcinogens*, **18**, 22-25 (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. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, **40**, 490-494 (1997)
- Lee, S.H., Park, C.W., Park, K.A., Lee, Y.C., Choi, E.S. and Ha, Y.L. : Inhibition of sarcoma-180 cell-induced mouse ascites cancer by astaxanthin-containing egg yolks. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 163-167 (1998)
- Kim, H.C., Park, S.J., Park, C.W., Kim, Y.R., Park, K.A., Choi, E.S., Cho, Y.U. and Ha, Y.L. : Overcome effect of catabolic response in mouse by the egg yolks from laying hens intubated astaxanthin. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 1278-1282 (2001)

(2001년 9월 6일 접수)