

## 황금(黃芩, *Scutellariae Radix*)의 지방축적억제 효능연구

김경선 · 차민호 · 이수원\* · 윤유식\*\*

한국한의학연구원, \* 성균관대학교 식품생명공학과, \*\* 교신저자

### Abstract

#### A Study on the Inhibitory Effects of *Scutellariae Radix* on Fat Accumulation

Kim Kyeongseon, Cha Minho, Lee Soowon\*, Yoon Yoosik\*\*

Korea Institute of Oriental Medicine

Dept. of Food and Life Science, Sungkyunkwan University

\* Corresponding Author

Obesity is caused by unbalance of energy intake and expenditure, which results in extra accumulation of adipose tissue. Obesity is directly related to metabolic diseases such as diabetes, hyperlipidemia, fatty liver and so on. To investigate the anti-obesity effects of *Scutellariae Radix*, 70% EtOH extract and water extract of it were tested by in vitro and in vivo studies of fat accumulation.

3T3-L1 preadipocyte cell line was used in a in vitro study of fat accumulation. After 3T3-L1 cells were induced to differentiate into adipocytes, S. radix extract were added and fat accumulation was measured by oil red O staining. In vivo study showed that weight and epididymal/ retro-peritoneal adipose tissues were significantly reduced in mice fed *Scutellariae Radix* extract compared with control group. Especially, mice fed *Scutellariae Radix* extract showed reduced serum triglyceride and glucose levels. When adipose tissues were analyzed by microscope, mean adipocyte size was significantly reduced in *Scutellariae Radix* extract-fed mice. Therefore, this study showed inhibitory effects of *Scutellariae Radix* on in vitro and in vivo fat accumulation.

**Keywords** : obesity, *Scutellariae Radix*, 3T3-L1, adipocyte, fat accumulation

## I. 서론

최근 국내에서는 비만이 전체 인구의 약 10%로, 생활 수준의 향상으로 인하여 영양소 섭취량은 증가하고 운동 부족에 의한 에너지 소비량은 감소됨에 따라 비만은 증가 추세에 있다. 구미에서는 비만이 전체인구의 20%로 미국에서 3,500만명 이상이고, 서유럽과 그 밖의 지역을 포함하면 훨씬 많은 수에 달한다<sup>1)</sup>. 비만의 원인으로서는 칼로리 섭취 과다의 장기간 지속에서 오는 식이성 원인과 개개인의 유전자의 차이에서 오는 유전적 원인으로 나누어 볼 수 있고, 일반적으로는 두 가지 원인의 복합된 작용으로 이루어지리라고 생각되어지고 있다. 사람은 각자 자신에게 알맞은 표준체중이 있는데, 각 개인의 표준체중보다 120%이상의 증가가 있을 때 비만이라고 정의하며 구체적으로는 지방의 무게가 체중에서 차지하는 체지방 비율이 남자의 경우 25%이상일 때, 여자의 경우 30%이상일 때를 말한다. 비만은 고혈압, 동맥경화증, 관상동맥질환, 제 2형 당뇨병, 지방간, 고지혈증, 퇴행성 관절염, 일부 암질환 등 다양한 만성퇴행성 질환들을 유발하는 원인이 됨으로써 장기적인 관리가 필요한 만성질환중 하나이다. 천연물 황금(黃芩, Scutellariae Radix)은 동아시아에서 널리 이용되는 한약재로 생화학 또는 약물학적으로 넓은 범위에서 그 작용을 나타낸다. 현재까지 황금은 지질을 낮추는 작용과 화농성 피부염, 설사, 고지혈증, 면역성 질환에 대한 효능이 보고 되고 있다<sup>2,4,5)</sup>. 또한 황금은 흰 쥐의 간에서 지질 산화 작용을 억제함으로써 혈청 중 중성지방과 유리 지방산의 함유량을 감소시키는 것으로 보고되었다<sup>3)</sup>.

본 연구에서는 황금의 열수 추출물 및 에탄올 추출물에 대한 지방축적억제효능을 살펴보고자 하였다. 3T3-L1 세포를 이용하여 지방세포의 분화과정을 살펴본 in vitro 실험과 C57BL/6 쥐에 고지방식을 섭취시

켜 비만을 유도한 후 지방조직을 관찰한 in vivo 실험을 수행하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 3T3-L1 세포를 이용한 in vitro 실험

#### 세포 배양

한국 세포주 은행으로부터 분양받은 mouse 유래 3T3-L1 세포를 10% FBS(Fetal bovine serum)를 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL26140-079)배지로 배양하였으며, 2일 간격으로 세포가 포화상태를 이루기 전에 subconfluent monolayer로 유지하면서 인산염완충식염수(phosphate buffered saline : PBS)용액으로 세포표면을 세척하고 trypsin-EDTA(Gibco BRL25300-054) 0.25% 용액을 처리한 뒤, trypsin 용액을 버리고 DMEM 배양액으로 세포를 탈착시켜 계대배양하였다. 탈착된 세포는 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액에 현탁시킨 뒤, 1:10의 희석배율로 계대배양하면서 전지방세포(preadipocyte) 상태를 유지하였다.

#### 분화 유도

배양 중인 3T3-L1 세포를 10% FBS를 첨가한 DMEM 배양액으로 24well plate에 접종하였다. 세포가 포화상태(confluency)되면 배양액에 분화유도물질인 0.25 $\mu$ M dexamethazone(DEX ; sigma), 0.5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine(MIX ; sigma), 5 $\mu$ g/mL insulin(sigma)을 첨가하여 2일간 배양하였다. 그 후에는 5 $\mu$ g/mL insulin만을 첨가하여 2일마다 새로운 배양

액으로 교환해 주었다.

3T3-L1 세포의 분화에 미치는 황금 추출물의 효과를 관찰하기 위해서 여러 가지 농도의 황금 추출물을 분화 유도물질 처리시 동시에 첨가하였다.

### 지방 축적도 측정

3T3-L1 세포내에 축적된 큰 지방적(lipid droplet)을 oil red O 염색법<sup>6,7,8)</sup>으로 염색하여 측정하였다. 세포 배양 후 세포표면을 PBS로 2회 세척하고 6% formaldehyde를 함유한 PBS로 1시간 고정한 후 oil red O 용액으로 1시간 염색하였다. 염색후 70% 에탄올로 세척하고 isopropanol로 염색된 oil red O를 용출하여 510nm에서 흡광도를 측정하여 지방축적정도의 지표로 설정하였다.

### 세포독성 검사

3T3-L1 세포에 첨가한 황금 추출물의 독성을 알아보기 위하여 MTT assay로 독성실험을 실시하였다. 세포를 96well plate에서 추출물과 함께 2일간 배양한 후 배양액을 제거하고, MTT 용액 1mg/mL을 100 μl 첨가하여 3-6시간동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 반응시켰다. MTT 용액을 제거한 후 DMSO 용액을 100-200 μl 첨가하여 녹여내어 540nm의 파장에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

## 2. 고지방 식이 유발 비만쥐를 이용한 in vivo 실험

### 동물 실험 설계

평균 체중 28.36±0.67g인 5주령의 수컷 C57BL/6

mouse(대한바이오링크, 음성)를 1주간의 적응기간 후 6주동안 고지방식이를 공급하여 비만을 유도하여 실험을 실시하였다. 실험동물은 대조군(12수), 황금 70% 에탄올 추출물 투여군(10수), 황금 열수추출물 투여군(9수), 가르시니아·캄보지아 투여군(10수), L-카르니틴 투여군(10수)으로 구분하였으며 매일 일정시간에 관리하였다. 사육실의 온도는 22±2℃로 유지하였으며, 물과 실험식은 자유로이 섭취하도록 하였다.

### 실험식이 제조

실험식은 AIN-93에 근거하여 식이를 제조하였고 (Table 3) 고지방식은 전체 열량 중 지방으로부터 60%의 열량을 얻도록 하였다. 고지방식에 L-카르니틴을 제외한 4개군은 각각 3%를 첨가하고, L-카르니틴은 0.375%를 첨가하여 6주간 섭식시켰다.

실험 기간 중 실험동물의 체중은 매주 측정하였으며, 식이 섭취량은 매일 오전 사료간량을 측정하여 산출하였다.

### 해부 및 조직 처리

실험동물을 에테르로 전신마취시킨 후 개복하여 간과 피하지방조직(subcutaneous adipose tissue), 부고환 지방조직(epididymal adipose tissue), 신장후 복막하 지방조직(retro-peritoneal adipose tissue)의 세 부위의 지방조직을 적출하여 무게를 평량하였다.

### 혈액채취 및 생화학 검사

실험종료일인 6주째 되는 날에 해부하여 심장에서 채혈한 후 원심분리한 후 얻어진 혈장을 시료로 사용하여 자동 혈액생화학 분석기를 사용하여 생화학 검사를

수행하였다. 모든 혈장시료는 분석직전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 의 저온냉동고에서 보관하였다.

### 부고환 지방조직의 평균면적 측정

적출하여 급속동결한 부고환 지방조직을 동결박절기를 이용하여  $40\mu\text{m}$  두께의 조직절편을 만들어 Mayer's hematoxylin 염색법<sup>9)</sup>으로 염색을 하고 광학 현미경과 image analysis program을 이용하여 부

고환 지방조직내의 지방세포의 평균 단면적을 측정하였다.

### 통계처리

실험결과의 통계처리는 모든 측정값을 Mean $\pm$ SE로 표시하였으며 분석치에 대한 유의성 검증은 t-test를 실시하였다.

Table 1. Inhibitory effects on fat accumulation in 3T3-L1 preadipocytes

$\mu\text{g/mL}$	Scutellariae radix 70% EtOH extract	Scutellariae radix water extract	L-carnitine
0	100 $\pm$ 2.696	100 $\pm$ 6.966	100 $\pm$ 5.156
10	99.63 $\pm$ 3.027	107.26 $\pm$ 0.273	103.80 $\pm$ 12.013
50	79.08 $\pm$ 7.452*	104.18 $\pm$ 11.223	88.25 $\pm$ 12.399
100	74.51 $\pm$ 2.639***	106.78 $\pm$ 7.385	92.59 $\pm$ 15.212
200	48.70 $\pm$ 5.506***	84.31 $\pm$ 0.761*	87.34 $\pm$ 14.926
IC50( $\mu\text{g/mL}$ )	192	>200	>200

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  compared with 0 concentration

## III. 연구결과

### 1. 3T3-L1 세포를 이용한 in vitro 실험

#### 세포내 지방축적 억제효능

3T3-L1 세포의 분화를 유도하면서 각각 시료를 농도별로 처리하여 oil red O 염색으로 지방축적억제효과를 살펴보았다. 황금 70% 에탄올 추출물은 대조군에 비해  $50\mu\text{g/mL}$ 에서 약 20%,  $100\mu\text{g/mL}$ 에서 약 25%,  $200\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 51% 정도의 감소효과를 나타내었다. 황금의 열수추출물은  $200\mu\text{g/mL}$ 에서 16% 정도의

감소효과를 보였다. 또한 L-카르니틴은  $100\mu\text{g/mL}$ 농도에서 약 7.4%,  $200\mu\text{g/mL}$ 에서 약 13% 정도의 감소효과를 나타내었다(Table 1).

#### 세포독성 검사

3T3-L1 세포에서 각 시료를 농도별로 처리하여 MTT assay로 세포독성실험을 수행하였다. 황금의 70% 에탄올 추출물, 황금 열수추출물, L-카르니틴 모두 IC50이  $200\mu\text{g/mL}$ 으로 나타나 세포독성이 없는 것으로 판명되었다(Table 2).

Table 2. Effects on cell viability in 3T3-L1 preadipocytes

$\mu\text{g/mL}$	Scutellariae radix 70% EtOH extract	Scutellariae radix water extract	L-carnitine
0	100±2.824	100±8.078	100±12.594
10	111.104±5.503	96.20±6.678	103.28±12.299
25	103.29±8.866	90.42±2.065	100.99±17.806
50	100.36±11.026	92.24±4.494	103.90±5.628
100	91.58±6.876	97.62±3.820	111.494±31.949
200	55.94±7.046	103.68±10.740	97.30±4.780
IC50( $\mu\text{g/mL}$ )	>200	>200	>200

Table 3. Composition of high fat diet

high fat diet (%)	
Casein	20
Sucrose	10
Corn starch	14.95
Dyetrose	5
Lard 80%	36.5
Soybean oil	3.55
Cellulose	5
Vitamin mix	1
Mineral mix	3.55
Choline bitartara	0.25
L-cystein	0.3
BHQ	0.0014
Energy from fat (%)	60

## 2. 고지방 식이 유발 비만쥐를 이용한 in vivo 실험

고지방식으로 비만 유도 후 쥐의 무게 및 지방조직 변화

고지방 식이로 6주간 비만을 유도한 후 무게를 1주일 간격으로 고지방식에만 섭취시킨 대조군과 고지방식이

에 각 시료를 첨가하여 섭취한 쥐들을 6주 동안 비교하였다. 이 결과 약 2주동안 쥐들의 무게가 점차로 증가하다가 2주후부터 약간의 감소를 보이기 시작하였으며, 대조군은 4주후터 다시 증가하였으나 황금 추출물을 섭취한 쥐들은 무게변화가 크게 나타나지 않았다. 반면 가르시니아 캄보지아 섭취군에서는 약 4주후부터 급격한 무게 감소가 나타났다(fig 1).

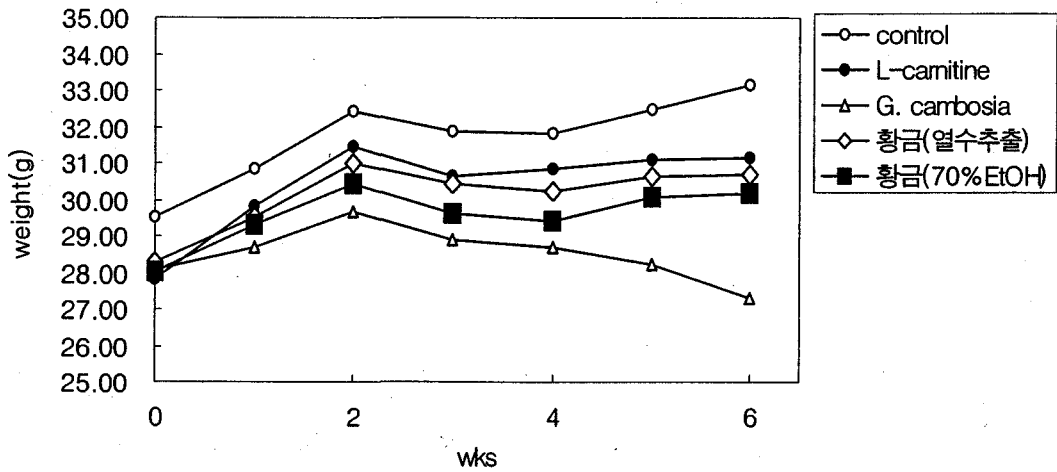


Fig 1. Growth curve of mouse during 6weeks

6주후 부검시의 체중에서는 대조군에 비해 L-카르니틴군을 제외한 추출물 섭취군에서 유의적인 감소효과가 나타났다(Table 4). 또한 복강내의 백색지방조직인 부고환 지방조직(epididymal adipose tissue), 신장후복막하 지방조직(retro-peritoneal)과 간(liver)의 무게를 측정하였다(Table 4). 그 결과 부고환 지방조직에서도 L-카르니틴을 제외한 다른 추출물 섭취군에서 유의적인 감소효과를 관찰할 수 있었다. 신장후복막하 지방조직에서는 황금 열수추출물을 제외한 추출물 섭취군에

서 유의적인 감소효과를 보였다. 특히 무게과 부고환지방조직, 신장후복막하 지방조직 모두에서 황금의 70% 에탄올 추출물과 가르시니아 캄보지아의 두드러진 감소효과를 관찰할 수 있었다.

### 추출물 섭취에 의한 쥐의 혈중 지질량 변화

추출물 섭취에 의한 쥐의 혈중 지질의 변화를 알아보기 위하여 각각 혈액을 채취한 다음, 이들의 혈액에서

Triglyceride(TG), Total cholesterol(T-chol), High density lipoprotein cholesterol(HDL-C), Free fatty acid(FFA) 그리고 glucose의 양을 측정하였다. 그 결과 TG의 양은 대조군에 비해 모두 유의적으로 감소하였고, T-chol의 양은 황금 70% 에탄올 추출물 섭취군을 제외한 다른 군에서 유의적인 감소효과가 나타났다. 반면 HDL-C의 양은 황금의 70% 에탄올 추출물 섭취군에서만 유의적으로 증가하였다. glucose는 황금의 70% 에탄올 추출물 섭취군과 가르시니아 캄보지아 섭취군에서만 유의적으로 감소하였다. FFA는 모든 군에서 유의적인 차이가 발견되지 않았다(Table 5).

**추출물 섭취에 의한 쥐의 간과 신장의 독성 검사 결과**

각 추출물의 간독성 및 신장독성을 알아보기 위하여 간 및 신장기능 검사를 실시한 결과 BUN, creatinine에서는 유의적인 변화가 관찰되지 아니하였다. 간기능과

관련하여서는 혈청 GPT에서 황금의 70% 에탄올 추출물, 가르시니아 캄보지아, L-카르니틴에 의한 유의적인 감소가 관찰되었다(Table 6).

**부고환 지방조직내 세포면적 측정**

지방조직 내에 위치한 지방세포의 크기를 평균적인 단면적으로 측정한 결과는 <Table 7> 및 <Fig 2>와 같다.

대조군에 비해 지방세포 면적에서 L-carnitine은 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, 황금의 70% 에탄올 추출물 섭취군에서 약 26.5%, 가르시니아 캄보지아 섭취군에서 약 27.4%, 황금의 열수추출물 섭취군에서 약 26% 감소하여 지방세포의 크기를 유의적으로 줄이는 것으로 관찰되었다. 지방세포의 평균적인 크기는 세포 내에 축적된 지방의 양에 비례하므로 이의 감소는 지방 축적의 감소를 반영한다.

**Table 4. Body, liver and adipose tissue weight of mice fed high fat diet**

	weight	liver	epididymal	retro-peritoneal
Control	33.15±0.746	1.03±0.083	2.19±0.104	0.63±0.022
S. radix 70% EtOH extract	30.20±0.376**	0.92±0.018	1.56±0.112***	0.48±0.027***
S. radix water extract	30.69±0.902*	0.91±0.024	1.72±0.165*	0.52±0.059
G. cambosia	27.32±0.442****	0.91±0.012	1.15±0.095****	0.33±0.027****
L-carnitine	31.16±0.729	0.907±0.020	1.68±0.158	0.50±0.053*

Mean ± SE

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.00001 compared with control group

S. radix : Scutellariae Radix

G. Cambosia : Garcinia Cambosia

Table 5. Serum lipid level of the mice fed high fat diet

	TG	T-chol	HDL-C	FFA	Glucose
Control	98.13 ±4.808	133.54 ±4.379	58.86 ±1.719	1024.79 ±49.97	167.29 ±12.257
S.radix 70% EtOH extract	73.75 ±1.742*	128.75 ±4.247	65.28 ±2.217*	932.188 ±47.789	137.81 ±7.739*
S. radix water extract	86.11 ±4.292*	114.72 ±6.030*	55.312 ±2.936	998.33 ±52.469	156.39 ±13.190
G. Cambosia	77.25 ±4.780**	108.50 ±2.640***	50.56 ±1.171	931.50 ±33.928	135.50 ±11.023*
L-carnitine	84.25 ±2.960**	115.5 ±2.321**	53.06 ±1.171	903.00 ±53.092	161.25 ±10.174

Mean±SE

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01, \*\*\*p&lt;0.001 compared with control group

TG : Triglyceride, T-chol : Total cholesterol,

HDL-C : High density lipoprotein cholesterol, FFA : Free fatty acid

S. radix : *Scutellariae radix*G. Cambosia : *Garcinia Cambosia*

Table 6. Effects on kidney and liver function

	BUN	Creatinine	GOT	GPT
Control	25±0.279	0.50±0.000	125.21±16.752	42.08±2.868
S. radix 70% EtOH extract	24.53±0.775	0.50±0.000	105.00±3.381	33.25±2.358*
S. radix water extract	23.92±0.977	0.50±0.000	110.56±12.422	34.44±2.595
G. Cambosia	23.23±0.469**	0.50±0.000	106.25±7.004	29.50±0.972**
L-carnitine	23.33±1.023	0.50±0.000	107.25±9.870	31.75±2.175*

Mean±SE

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 compared with control group

S. radix : *Scutellariae radix*G. Cambosia : *Garcinia Cambosia*

Table 7. Mean area of adipocytes in epididymal adipose tissue

	Adipocyte area(μm <sup>2</sup> )
Control	3930.99±442.372
S. radix 70% EtOH extract	2889.41±217.903***
S. radix water extract	2911.36±507.217**
G. Cambosia	2855.90±455.636***
L-carnitine	3506.10±484.507

Mean± SE

\*\*p&lt;0.001, \*\*\*p&lt;0.0001 compared with control group

S. radix : *Scutellariae radix*G. Cambosia : *Garcinia Cambosia*



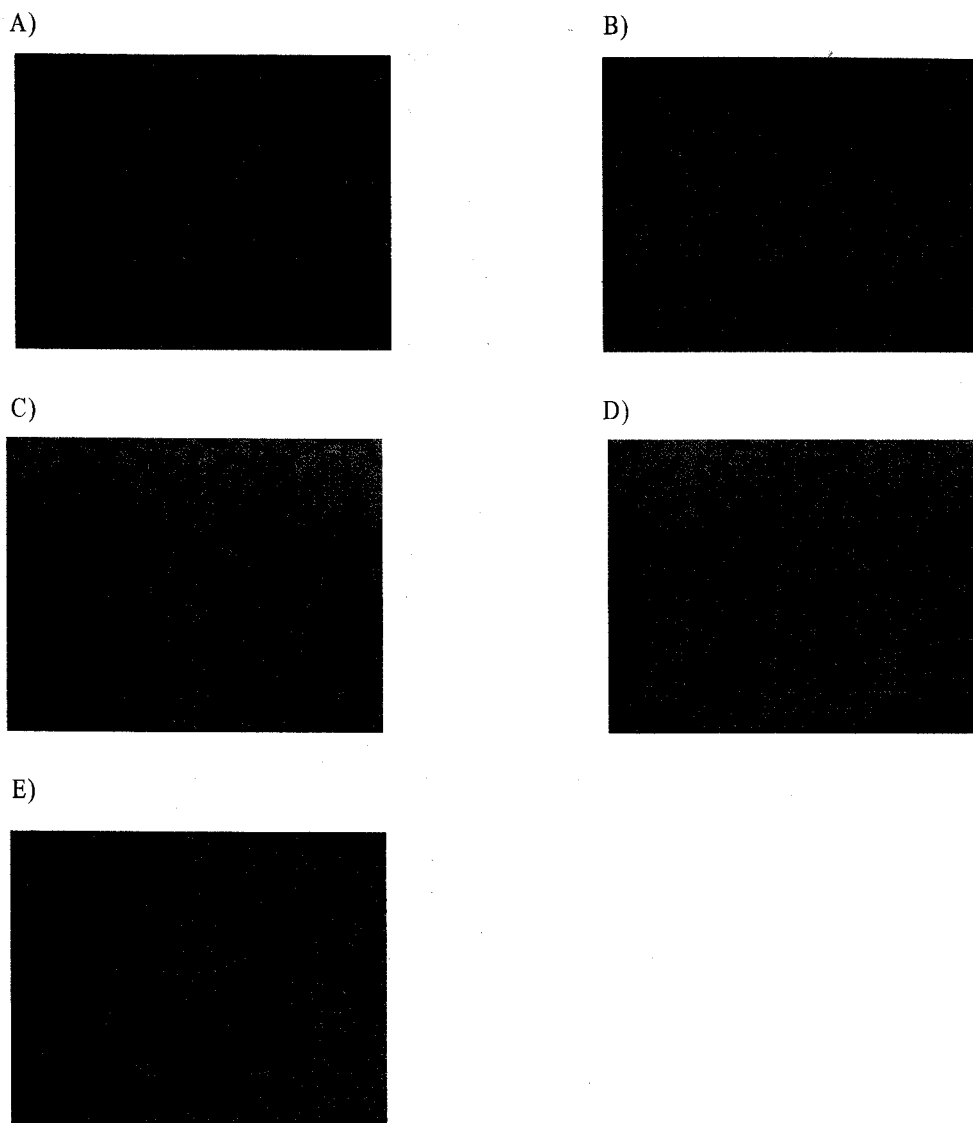


Fig 2. Epididymal adipose tissues of the mice fed high fat diet

- A) Control
- B) Scutellariae Radix 70% EtOH extract
- C) Scutellariae Radix water extract
- D) Garcinia Cambosia
- E) L-carnitine

## IV. 결론

비만은 과도한 체지방의 축적으로 고혈압, 동맥경화, 제2형 당뇨병, 고지혈증 등 만성 대사이상 질환의 원인이 된다<sup>10-12</sup>. 본 연구에서는 황금 추출물의 지방세포 및 지방조직에서의 체지방 축적 억제 개선효과를 알아보고자 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 수행하였다.

전지방세포인 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화에 따른 지방축적에 미치는 황금 추출물의 효능을 본 결과, 황금의 70% 에탄올 추출물에서 지방세포로의 분화 억제 효과가 나타났다.

실험동물에 고지방식을 섭취시켜 비만을 유도한 후 각 황금 추출물의 지방축적 억제효능을 살펴보았다. 체중증가에 있어서 70% 에탄올과 열수로 추출한 황금

의 추출물에서 모두 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다. 부고환 지방조직과 신장후복막하 지방조직에서 70% 에탄올 추출물의 현저한 감소효과가 관찰되었다. 열수 추출물은 부고환 지방조직에서만 유의적인 차이를 나타내었다.

혈중 지질 농도의 변화를 알아본 결과, 70% 에탄올 황금 추출물에서 중성지방과 glucose 량의 감소 및 HDL cholesterol의 유의적인 증가가 관찰되었다. 황금 열수추출물은 중성지방과 총 cholesterol량을 유의적으로 감소시켰다. 부고환 지방조직 내 지방세포의 크기에서, 황금 추출물들을 섭취한 군에서 지방세포의 평균 단면적이 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 결과가 나타남으로써 황금 추출물이 지방축적억제에 그 효능이 있음이 입증되었다.

## 참고 문헌

1. 보건복지부, 1997
2. Yoshiyuki Kimura. (1981) 『Studies on *Scutellariae Radix*. III. Effect on Lipid Metabolism in Serum, Liver and Fat Cells of Rats』, Chem. Pharm. Bull. 29(8):2308~2312
3. 양재현. (1994) 『Baicalin 함유생약의 제제화 및 생체이용률 (제 1보) : 황금 및 황련 공침물의 확인 및 물리화학적 성질』, 약제학회지 vol. 24, No. 4, 233~243
4. Norimichi Nakahata. (1998) 『Analysis of Inhibitory Effects of *Scutellariae Radix* and Baicalein on Prostaglandin E2 Production in Rat C6 Glioma Cells』, No. 3-4, 311~323
5. Zhonghong Gao, Huibi Xu, Xiaojun Chen, Hao Chen (2003) 『Antioxidant status and mineral content in tissues of rutin and baicalin fed rats』, Life Sciences 73 :1599~1607
6. 『Methods in Molecular Biology』, vol 5. Animal cell culture 197~207
7. Green H, Kehinde O. (1974) 『Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid』, Cell 1, 113~116
8. Lillie RD, Asbum LL. (1936) 『Super-saturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by the Herxheimer technique』, Arch Pathol 36, 432
9. 전국임상병리교수협의회. (1992) 『조직검사학』, 151~160, 고려의학
10. 이흥규. (1992) 『비만과 관련된 질환』, 대한 비만학회지 1:34
11. Grundy SM, Barnett JP. (1990) 『Metabolic acid health complications of obesity』, In bone RC, ed. Disease-a-month. Mosby Year Book. 36(12):643~731
12. Rose G. (1991) 『Population distribution of risk and disease』, Nutr Metab Cardiovasc Dis 1:37~40