

(-)-Hydroxycitrate의 식이 투여가 흰쥐의 식이 섭취량, 체중, 지방 대사 및 합성에 미치는 영향

김상배 · 박하림 · 문수재* · 김정현* · 안경미* · 여익현
(주)풀무원 기술연구소, 연세대학교 생활과학대학 식품영양학과*

Influence of (-)-Hydroxycitrate on Food Intake, Body Weight and Lipogenesis in Rats

Kim, Sang Bae · Park, Ha Rim · Moon, Soo Jae*
Kim, Jung Hyun* · An, Kyung Mi* · Yeo, Ik Hyun
R & D Center, Pulmuone, Co., Ltd. Seoul Korea
Department of Food and Nutrition,* Yeonsei University, Seoul Korea

ABSTRACT

The influence of (-)-Hydroxycitrate(HCA), shown to be a competitive inhibitor of adenosine 5-triphosphate(ATP) citrate lyase, on food intake and body weight, serum triglyceride and cholesterol level, *in vivo* rates of fatty acid and cholesterol synthesis, and fat cell number and size was investigated. 3 groups of female, 5 weeks old Sprague Dawley rats, 8 animals each, were *ad libitum* meal-fed or pair-fed(3 hours from 10 : 00 to 13 : 00) AIN based high glucose diet for a total period of 8 weeks. Providing normolipidemic rats orally with 400mg of HCA formula containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule significantly depressed *in vivo* hepatic rates of fatty acid and cholesterol synthesis in the liver and adipose tissue. Serum triglyceride and cholesterol levels were significantly reduced by HCA. At the end of treatment period, the rats administered with HCA resulted in a significant reduction in body weight gain. The reduction in weights was attributable to a significant decrease in fat cell size with a smaller extent, but not significant, reduction in fat cell number. Rats receiving HCA demonstrated less food intake than the controls ; however, this decreased caloric intake was not fully responsible for the HCA induced depression of hepatic and adipocytic lipogenesis, since experiment using pair-fed control rats showed, less magnitude but similar results. Both an anorectic and an antilipogenic properties of HCA seem to be responsible for this weight reduction activity of HCA. The outcome of this study suggests that metabolic regulation may be a feasible approach to the control of obesity and hyperlipidemia. (*Korean J Nutrition* 30(2) : 123~131, 1997)

KEY WORDS : (-)-Hydroxycitrate · HCA · obesity · lipogenesis · weight reduction.

서 론

Hyperlipidemia증상 개선을 위한 접근 방법으로서의

채택일 : 1997년 2월 17일

*To whom all correspondence should be addressed

지질의 대사 조절(metabolic regulation)은 흔히 serum triglyceride와 cholesterol의 농도를 규정하는 지질의 합성, 저장, 사용 경로(pathway)를 중재하는 것으로 정의된다¹⁾. 이러한 대사조절에 의한 혈중 지방 농도의 저하 가능성을 연구 검증할 수 있는 물질 중에 잘 알려진 것이 (-)-Hydroxycitrate(이하 HCA라 명)이

다²⁾. 화학적으로 오렌지나 다른 모든 신맛의 과일에 함유되어 있는 구연산(citric acid)과 매우 유사한 구조를 가지는 HCA는 인도 등의 남아시아 지역에서 오래 전부터 음식의 신맛을 내는 양념류나 소화 장애 협심증 등을 치유하는 약재로 쓰여 온 *Garcinia cambogia*라는 과일의 외피에서 추출된다³⁾. 다른 많은 식물류에 존재하는 citric acid와는 달리 HCA, 특히 *Garcinia cambogia*에 함유되어 있는 erythro-, (-)-type HCA는 식물계의 다른 종류에는 아주 드물게 존재하는 물질로 알려져 있다⁴⁾. HCA의 지방 대사 관여에 관한 독특한 효능이 1960년대 말경 식물의 유용 물질을 탐색하는 서구 학자들에 의해 최초로 알려진 이후, 1980년대부터 미국의 제약회사들에 의해서 생리학적 기능을 정립하려는 노력이 시작되어 왔다. 현재까지 연구된 바에 의하면, 이 HCA는 mitochondria의 바깥쪽, 즉 세포 원형질 내에서 citrate를 oxaloacetate와 acetyl CoA로 분해하는 효소인 adenosine 5-triphosphate(ATP) citrate lyase의 competitive inhibitor로 작용한다고 보고되었다^{5,6)}.

당분이 에너지화 되기 위해 분해될 때, pyruvic acid가 생성된 후 mitochondrion에서 coenzyme A(CoA)와 결합하여 acetyl-CoA가 형성된다. 포도당 한 분자가 Krebs cycle을 거칠 때 두 분자의 acetyl-CoA가 생성되고 각각의 acetyl-CoA가 완전히 분해되면 고 에너지 물질인 ATP가 생성되어 각종 장기와 생합성 활동의 열량원으로 쓰여진다. 당분에 의한 칼로리 공급이 인체의 필요량보다 상회할 경우 acetyl-CoA는 mitochondria로부터 유출되어 지방산이나 콜레스테롤 합성의 기질로 이용된다⁷⁾. 섭취하는 칼로리의 양 혹은 생체가 요구하는 열량이 glycolysis pathway를 통한 분해 또는 간이나 근육에서 생산/저장할 수 있는 glycogen(저장 탄수화물)의 capacity를 초과할 경우, 이 잉여 당질이나 단백질은 acetyl-CoA로 전환된 후 Krebs cycle의 초기 단계에서 지방산이나 cholesterol로 변환된다고 알려져 있다⁸⁾. 생체 지방산 합성의 가장 주된 기질로서 작용하는 acetyl-CoA는 생체가 열량을 필요로 할 때 mitochondrion내에서 pyruvate의 산화를 통한 ATP생성으로 energy를 공급한다. 그러나, acetyl-CoA생성은 전적으로 세포내의 mitochondria내에서 일어나는 과정이지만 acetyl-CoA는 mitochondria세포벽을 넘지 못한다. 더욱이, 지방산/콜레스테롤 합성은 mitochondria의 바깥쪽 즉, 세포 원형질 내에서 일어나는 과정으로 어떤 방법으로도든 acetyl group을 mitochondria바깥쪽으로 옮기는 장치가 필요하다. acetyl group은 세포질 내로 유출이 가능한 citrate로 변환된 후 mitochondria세포 벽을 통과하는 것으로 알려져 있다. 통과한 citrate는 다시

ATP-citrate lyase의 작용에 의해서 acetyl group이 방출된 후 지방 합성 경로를 거친다. HCA는 이ATP-citrate lyase의 활성을 저해함으로써 세포질 내의 acetyl-CoA의 농도를 저하시킨다고 보고되었다¹⁹⁾.

Sullivan¹⁰⁾등은 *in vitro* 혹은 *in vivo* 실험을 통해 HCA의 이러한 세포질 내에서의 지방산과 cholesterol합성의 기질인 acetyl CoA의 농도를 저하시키는 기전으로 인해 간, 지방세포, 작은창자, 피부 조직과 같은 지방 합성 조직 세포에서의 지방산이나 cholesterol의 합성을 억제하여 전체 lipogenesis를 저해한다고 보고하였다. 정상 쥐, fructose투여에 의해 비만을 유도한 쥐, 그리고 유전적/선천적 비만인 Zucker쥐를 이용한 실험 등에서도, HCA투여는 지방산과 cholesterol합성 그리고 혈중 triglyceride와 cholesterol의 농도를 유의적으로 저하하였다고 보고한다. Sullivan등^{11,12)}에 의하면 HCA의 ATP-citrate lyase 활성 억제의 초기적 현상으로 세포질 내의 citrate의 농도가 증가되어 농도 차이에 기인한 mitochondria로부터의 citrate유출을 억제하는 결과 mitochondria내의 citrate농도가 상대적으로 증가되어 열량 조절 기능들은 단순히 새로운 citrate의 형성을 저해하는 방향으로 작용하게 되며, 그 결과, 당이 Krebs cycle에 미치기 전에, 혹은 oxaloacetate와 phosphoenolpyruvate를 거쳐 glycogen합성 pathway로 역류 되는 현상이 나타나 glycogen농도를 증가 시킨다고 보고 하였다.

HCA의 단기 혹은 장기적 경구 투여는 정상(lean)쥐¹¹⁾, 비만(obese)쥐¹¹⁾ 그리고 생쥐(mice)¹⁰⁾등의 실험 동물의 식욕을 유의적으로 억제하였다. 이러한 HCA투여에 의한 식욕 감퇴는 체중 감소와 체지방 감소의 결과를 보였으나 체단백질의 양에는 변화가 없음이 보고되었다¹³⁾. Pair-feeding법을 이용하여 HCA실험군과 pair-fed대조군에게 동일량의 식이 섭취를 유도한 실험에서는 체중과 전체 체지방량에 있어서는 두 군이 유의적 차이를 보이지 않았으며, pair-fed대조군의 liver에서는 정상적인 지방 합성이 관찰된 반면 HCA실험군에서는 지방산 합성율이 유의적으로 저하되는 결과를 보여주었다¹⁴⁾.

본 연구는 과거의 대부분의 연구들에서 주로 이용한, HCA를 i.v., i.p-injection 혹은 intubation 방법으로 투여가 아닌 매일 식이 공급 전에 일정량의 HCA를 섭취하도록 유도하는 방법을 이용하여 HCA가 정상쥐(normolipidemic rats)에 있어서 식이 섭취량, 체중 증가, 혈중 지방산, 혈중 cholesterol, 간과 지방세포의 lipogenesis, 그리고 지방세포의 크기와 숫자에 미치는 영향을 관찰하려는 목적으로 design되었다. 모든 측정 항목들에 대해 HCA실험군, control군, 그리고 pair-fed 대조군으로부터의 수치를 종합하여 비교 해석 함으

로써 식이 섭취량의 차이에 의한 meal effect를 최소화하여 HCA의 단독 효능을 점검 하는 데에도 주력하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용한 Sprague-Dawley종 쥐는 대한 실험동물 센터로부터 분양 받았으며, 식이 제조를 위해 사용한 모든 구성 성분은 ICN Pharmaceuticals, Inc.로부터 구입하였다. 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 보기 위해 사용한 [¹⁴C]-alanine은 DuPont NEN 제품을 사용하였으며 alanine, α-ketoglutarate, Dowex1-X2 resin, PPO, POPOP는 SIGMA Chemical Co. 제품을 사용하였다. 또한 지방세포의 관찰이나 숫자를 계수하기 위해 사용한 osmium tetroxide, collidine, oil red O, Harris hematoxylin solution도 SIGMA Chemical Co. 제품을 사용하였으며 trypsin-EDTA는 GIBCO BRL사 제품을 사용하였다.

2. 실험 동물 및 사육 조건

본 실험에 사용한 실험동물은 Sprague-Dawley종 암컷 쥐로, 실험 식이로 사육하기 전 1주동안 고형 배합사료(삼양유지 사료)로 환경에 적응시킨 후 120~140g의 24마리를 가급적 체중을 맞추어 8 마리씩 3개군으로 나누어 실험군과 두 개의 대조군으로 하였으며 항온/항습 chamber의 40×25×17cm 스테인레스cage(대풍기기)에 개별 수용하여, 매일 일정시간에 사양 관리를 하였다. 각 실험군의 실험 동물 숫자는 예비 실험 후 각 측정치의 표준편차 분포에 따른 SAS package의 power test실험 결과를 토대로 결정하였다. Chamber는 온도 22±2℃, 습도 50~55%를 항상 유지시켜 주었으며, 암 주는 오전 10시부터 오후 10시까지로, 광주는 오후 10시부터 오전 10시까지가 되도록 자동 조절 장치로 조절하였다.

3. 식이 투여 및 식이 섭취량, 체중 증가량 측정

8주동안 식이를 투여하였으며 식이는 오전 11시부터 오후 2시까지 High Glucose(HG) Diet(Table 1)를 일상 식이로 공급하였다. Treatment는 오전 10시와 오후 9시 두차례 총 400mg의 HCA formula(20mg의 HCA 함유) 혹은 placebo formula를 공급하였으며, 각군을 실험군, control군, pair-feeding(PF)대조군으로 분류하였고 실험군은 HCA formula를 control군과 PF대조군은 placebo formula를 일상식이 공급 이전에 다 섭취하도록 훈련시켰다. HCA실험군과 control군은 식이량을 제한하지 않았으며 PF대조군은 실험군이 섭취한 식이량과 동일한 식이량을 섭취하도록 유도하였으며 실험기간에 물은

무제한 공급하였다. 매일 식이 투여가 끝나는 오후 2시에 먹이통을 빼내어 식이 섭취량을 측정하였으며 체중은 일주일에 한 번씩 측정하였다. 실험 식이의 배합 구성 비율은 Table 1과 같다.

4. 시료의 채취

실험식이 투여 종료 당일 3시간의 식이 투여 후 2.5 μCi [¹⁴C]-alanine(sp act=150mCi/mmole), 12.3mg alanine, 30.6mg α-ketoglutarate가 함유된 0.25ml의 용액을 꼬리 미 정맥으로 주사하고 30분이 경과한 다음 ether로 마취 시킨 후 개복하여 심장으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액은 항 응고제가 처리된 시험관에 취하여 3,000rpm에서 15분간 원심 분리 해서 혈장만을 취하고 시험관에 넣고 밀봉하여 분석 시 까지 4℃에서 냉장 보관 하였다. 간은 적출하여 지방과 콜레스테롤 합성을 측정 하기 위해 전처리를 하였으며 지방세포는 복막후(retroperitoneal), 피하(subcutaneous), 그리고 생식선(gonadal) 부위에서 총 체지방량 측정에 영향을 미치지 않도록 소량/일정량을 분리하여 혼합한 뒤, 0.15M saline solution(pH 7.4)으로 씻은 후 지방세포 숫자 및 크기(cellularity)실험과 지방세포 관찰에 이용하였으며 나머지 carcass는 체지방량 측정을 위해 처리 하였다.

5. 실험방법

1) 혈청의 총콜레스테롤, 중성지방 함량

원심 분리하여 얻어진 혈청 중의 총콜레스테롤 함량,

Table 1. Composition of high glucose experimental diet

Ingredient	Composition(%)
Glucose	70.00
Vitamin-free Casein	22.91
AIN-76 Mineral Mixture ¹⁾	5.00
AIN-76 Vitamin Mixture ²⁾	1.00
Corn oil	1.00
Choline Chloride	0.05
Alphacel(Non-nutritive Bulk)	0.04

1) AIN-76 Mineral Mixture(g/kg) : Calcium phosphate di-basic 500, Sodium chloride 74, Potassium citrate monohydrate 220, Potassium sulfate 52, Magnesium oxide 24, Maganese carbonate(43 - 48% Mn) 3.5, Ferric citrate(16 - 17% Fe) 6, Zinc carbonate(70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate(53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate 0.01, Sesium selenite 0.01, Chromium potassium sulfate 0.55, Sucrose, finely powdered 118

2) AIN-76 Vitamin Mixture(g/kg) : Thiamine hydrochloride 0.6, Riboflavin 0.6, Pyridoxine hydrochloride 0.7, Nicotinic acid 3, D-Calcium pantothenate 3, Folic acid 0.2, D-Biotin, 0.02, Cyanocobalamin(Vitamin B₁₂) 0.001, Retinyl palmitate(Vitamin A)(250,000IU/g) 1.6, DL-α Tocopherol acetate(250IU/g) 0.25, Cholecalciferol(Vitamin D₃)(400,000IU/g) 0.005, Menaquinone (Vitamin K₂) 0.005, Sucrose, finely powdered 972.9.

총중성지방 함량은 효소 시약을 사용하여 비색 정량 하였다. 혈청의 총콜레스테롤 함량은 cholesterol 20(SI-GMA) Kit로 분석하였고, 혈청의 중성지방 함량은 triglyceride(SIGMA) Kit로 분석하였다.

2) 지방 합성과 콜레스테롤 합성

지방과 cholesterol 합성 측정은 Sullivan 등¹⁴⁾의 방법을 약간 변형시켜 시행하였다. 즉, 간(3g)과 지방세포(2g)를 5배수(v/w)의 증류수로 균질화 시키고 이중 3ml를 취해 2.1ml의 5N NaOH로 90°C에서 15시간 동안 검화시켰다. 2.6ml의 5N HCl로 산성화시킨 후 petroleum ether 용액으로 3번 반복 추출해서 ether층을 취해 탈수한 뒤 감압 농축시켜 소량의 methanol에 녹여 시료를 준비하였다. 이 시료를 1×10cm Dowex 1-X2 음이온 교환 수지 column에 주입한 후 콜레스테롤은 30ml의 methanol : ethyl ether = 1 : 1 용액으로 용출하고 지방산은 80ml의 ethyl ether : 80% methanol : acetic acid = 10 : 8 : 2 용액으로 연속적으로 용출하였다. 각각의 분획을 감압 농축시킨 다음 0.5ml의 methanol에 녹여 5ml의 cocktail solution(4g PPO, 0.1g POPOP in 1000ml toluene)과 섞어 liquid scintillation counter(LS6500, Beckman)를 사용해 동위원소의 incorporation 정도를 측정하였다.

3) 지방세포의 숫자 및 크기(cellularity)

지방세포의 cellularity는 Hirsch 등¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. Adipose tissue를 적출하고 oil droplet를 제거하기 위해 0.15M saline solution(pH 7.4)으로 여러 차례 씻은 후 여과지로 눌러서 수분을 제거하여 무게를 평량 하였다. 일부는 지방세포의 크기를 측정하기 위해 떼어두고 나머지 0.5g 정도를 취해 0.15 M saline solution(pH 7.4)에서 잘게 chopping한 후 5ml의 2% osmium tetroxide를 함유한 0.05M collidine-HCl buffer(pH 7.4)에 담구어 37°C에서 72시간 동안 방치하였다. 방치 후 250 μ mesh filter를 통과시켜 그 액을 모아 600xg에서 5분간 원심분리하여 침전물을 3ml의 0.15M saline solution(pH 7.4)에 현탁시켰다. 2.5 μ 여액을 취해 photomicrographic 방법으로 계수하였다.

지방세포의 크기는 위에서 떼어둔 tissue를 0.15M saline solution(pH 7.4)에서 잘게 chopping한 후 chloroform : methanol = 2 : 1 용액으로 48시간 동안 추출하고 0.2배 부피의 증류수를 첨가해 층 분리를 한 후 chloroform층을 취해 탈수하고 감압 농축시켜 무게를 측정함으로써, 지방세포의 숫자와 연계시켜 μ g lipid/cell로 표시하여 크기를 나타내었다.

4) 제지방 정량

제지방 정량은 Johnson 등¹⁶⁾의 방법을 이용하였다. 먼저 실험동물의 장 내용물을 씻어낸 후 시료 정량 2배의 sodium sulfate를 첨가하여 meat grinder로 수 차례 마쇄한 후 편편한 tray에서 하루 동안 건조한 후 균질화 된 분말을 취하였다. 이중 4g을 취하여 chloroform-methanol(2 : 1)으로 추출한 후 0.2배 부피의 증류수를 더하여 층 분리를 하였다. 지방을 함유한 chloroform층의 일부를 취하여 비중계로 지방량을 측정된 후 총 제지방량을 환산하였다.

5) 지방세포의 관찰

Hirsch 등¹⁵⁾의 방법을 사용하였으며, tissue sample을 2~3mm로 chopping한 뒤 trypsin-EDTA(0.25% Trypsin, 1mM EDTA · 4Na)에 넣어 4°C에서 48시간 동안 방치한 후 trypsin을 제거하고 70% ethanol로 씻어서 oil red O 용액으로 3분간 염색한다. 다시 70% ethanol로 씻은 뒤 trypan blue로 2분간 camber staining한 후 수도물로 씻어서 현미경하에서 지방세포를 관찰하였다.

6) 자료분석 및 통계처리

본 실험에서 취합된 data에 대한 통계적 유의성의 test는 PC version SAS statistical analysis package를 이용하여 분석하였다. 각 실험군들간의 평균에 편차에 대한 유의적 차이는 oneway analysis of variance와 Duncans multiple comparison test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

실험 결과 및 고찰

1. 식이 섭취량 및 체중 변화

Table 2에서 나타난 바와 같이 식이 섭취량은 control군보다 HCA섭취군에서 감소를 보여 주었으며 그룹간 식이 섭취 합산량은 HCA투여 2주부터 유의적인 차이를 보이기 시작하여 실험 종료 시점인 8주에는 약 30%의 유의적인 차이를 나타냄으로서 HCA섭취가 실험동물의 식욕 저하를 초래함이 관찰되었다. 과거의 여러 연구 결과에 의하면 이러한 HCA에 의한 식욕 저하는 HCA의 특이적 효능이며¹¹⁾ 실험 식이의 맛의 변화나 독성에 기인한 것이 아님¹²⁾이 보고되었다. Mice의 HCA와 citric acid의 LD50치는 복강투여시 >2,000mg/kg 그리고 경구투여시 >4,000mg으로서 차이를 보이지 않는다고 보고되었으므로¹⁾ 본 실험에서도 대조군 실험 식이에 citric acid가 동일량 포함되었다. Sullivan¹³⁾ 등의 보고에 의하면 HCA를 식이에 혼합하여 섭취 시키거나,

Table 2. Effect of (-)-hydroxycitrate on food consumption in rats¹⁾

Treatment	Cumulative Food Consumption(g)							
	wk1	wk1-2	wk1-3	wk1-4	wk1-5	wk1-6	wk1-7	wk1-8
Control	88.36±6.96 ²⁾	181.04±9.8	273.00±12.5	363.98±14.2	454.84±15.7	553.71±18.6	635.35±19.9	730.18±22.4
(-)-hydroxycitrate	74.08±7.58	154.22±8.2 ³⁾	232.48±11.7*	307.34±12.4*	384.94±13.6*	466.32±15.8*	533.38±17.9*	600.52±17.8*
Difference	14.28	26.82	40.02	56.64	69.90	87.39	101.97	129.66

- 1) Eight lean Sprague Dawley rats per group were treated with either the placebo(control and pair-fed groups) or 400mg of *Pulmuone Diet Plus* containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule, followed by the 3 hours of 70% Glucose diet for a total period of 8 weeks. Food consumption and spillage were determined daily. The pair fed group data is not described since they were allowed to eat the same amount of diet consumed by the (-)-hydroxycitrate-treated group.
- 2) Values are means±S.E., expressed in grams.
- 3) Asterik means values are significantly different from those of controls. Significance is defined as p<0.05 as determined by Student's t-test comparison.

위장관 내로 투여 혹은 복강 내로 투여 등의 투여/섭취 방법이나 단기 혹은 장기 등의 섭취 기간에 상관없이 유사한 식욕 억제 양상을 보인다고 하였으며 본 실험에서도 2주부터 실험 종료(8주)시점까지 HCA에 의한 식이 섭취량이 유의적 감소를 보임으로서 유사한 결과를 관찰하였다. HCA에 의한 식욕 억제 혹은 식이 섭취량의 조절 관계에 대한 기전은 아직도 불완전하고 많은 연구가 필요한 상태이지만, 일반적으로 포도당 산화 산물의 농도와 glycogen양이 증가되면 간의 glucoceptor를 자극하여 발생한 신호가 미주신경(vagus nerve)을 통해 ventromedial hypothalamus(VMH : 포만감 조절의 기능을 가진 정측 시상하부)의 satiety center를 자극하여 포만감을 일으켜 식욕을 억제한다는 이론은 설득력 있게 받아들여지고 있다¹²⁾. 하지만 goldthioglucose투여에 의해 시상하부의 기능을 마비시킨 동물실험에 의하면 HCA에 의한 식욕 저하는 glycogen의 증가와 무관하진 않지만 시상하부의 포만 조절 center의 자극에 해서가 아닌 다른 조절 기전에 의한 가능성을 시사하였다¹⁷⁾. 또 다른 연구 결과들¹⁸⁾¹⁹⁾에 의하면 단순한 glycogen합성 증가 외에, HCA투여 결과 간에서 더 많은 양의 3-carbon당 대사 부산물이 생성되어 식욕을 억제한다는 결과도 발표된 바 있다. 본 연구에서는 각각의 후보 물질들이 정량 되지는 않았으나 HCA투여에 의한 식욕 억제 효과는 간의 gluconeogenic pathway상의 3-carbon물질의 증가나 그 결과 발생된 glycogen의 농도 증가에 의한 포만 유도의 결과로 추측된다.

HCA에 의한 식욕 저하 효능 결과, Table 3에 나타난 바와 같이 control군과 비교하여 HCA실험군의 체중을 약 30% 유의적으로 감소시켰다. 그러나 HCA실험군과 동일량의 식이를 섭취 시킨 pair-fed 대조군과 비교하여도 25%의 유의적 체중 차이를 나타냄으로서, HCA섭취에 의한 체중 저하가 단순히 식욕 저하에 의한 식이 섭취량 감소의 기전 외에 다른 중요한 요인이 존재할 가능

Table 3. Effect of (-)-hydroxycitrate and pair feeding on body weight¹⁾

Treatment	Initial Body Wt(g)	Final Body Wt(g)	Cumulative Body Weight Gain(g)
Control	130.2±6.1 ²⁾	280.9±18.6 ^{3,4)}	150.7
(-)-Hydroxycitrate	133.5±5.9	240.4±20.1 ^{b)}	106.8
Pair-fed Control ³⁾	130.6±8.6	270.4±21.3 ^{a)}	139.8

- 1) Eight lean Sprague Dawley rats per group were treated with either the placebo(control and pair-fed groups) or 400mg of *Pulmuone Diet Plus* containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule, followed by the 3 hours of 70% Glucose diet for a total period of 8 weeks.
- 2) Values are means±S.E., expressed in grams.
- 3) The pair fed group was allowed to eat the amount of diet consumed the preceding day by the (-)-hydroxycitrate-treated group.
- 4) Values in the same column not sharing a common letter superscript are significantly different. Significance is defined as p<0.05 as determined by Student's t-test comparison.

성을 보였다.

2. 간의 지방산 및 콜레스테롤 합성

20mg의 HCA 장기 경구 투여가 간의 지방산과 콜레스테롤의 합성에 미치는 영향에 대해서 관찰 하였다. 지방 합성물은 식이 투여 시작 3~5시간 후에 최대치를 기록하며 이후 서서히 감소하여 24시간 후에 최소치를 나타낸다고 하며¹⁴⁾, [¹⁴C]alanine전구체가 지방산이나 콜레스테롤로 전환 되는것은 injection후 30분 후에 최대가 되어 오직 그 후15분 동안만 평형 유지후 감소한다고 보고¹⁴⁾ 됨으로서 이점에 유의하여 실험동물 처리 시간차에 유의하여 실험 계획을 하였다. HCA의 식욕 저하 기능에 의해 식이 섭취량이 달라짐으로 인해 지방 합성물의 차이를 보일 가능성을 배제 하기 위하여 HCA실험군

과 동일량의 식이가 투여 된 pair-fed대조군 또한 이용하였다. HCA실험 식이와 placebo는 식이 투여 1시간 전에 섭취 시킨 다음 3시간 동안의 식이 공급 종료와 동시 [¹⁴C]alanine을 injection한 뒤 30분 후 conversion량을 조사함으로써 지방산과 cholesterol의 합성률을 검증하였다.

Table 4에 나타난 바와 같이 HCA실험군의 [¹⁴C]alanine전구체의 지방산 편입은 control군에 비해서 33.2% 그리고 pair-fed대조군에 비해서는 24.7%의 유의적 감소를 보여주었다. HCA섭취에 의한 간세포에서의 cholesterol합성도 HCA군은 control과 pair-fed대조군과 비교하여 각각 47%와 39.9%의 유의적 감소를 나타내었다. 서론에서 언급되었듯이 extramitochondrial효소로서 citrate를 oxaloacetate와 acetyl CoA로의 분해반응을 촉매하는 ATP-citrate lyase를 HCA가 competitively inhibition함으로써 acetyl CoA pool의 저하, 즉 지방산과 cholesterol생합성에 요구되는 2-carbon units의 이용도를 제한함으로써 발생된 결과로 판단된다.

지방 합성률의 분석이 식이 투여시작 약 4시간 후인 한 시점에서만 실시 되었으므로 인하여 그 후 시간이 경과함에 따라 대조군의 경우 지방 합성률이 감소하는 경향을 보이는 반면 HCA를 섭취한 군의 경우 오히려 지방 합성률이 증가하거나 정체하지 않을까 하는 의문이 제기 될 수 있다. 즉, HCA군의 경우 ATP citrate lyase의 활성 저하로 인하여 지방산으로 전환 되지못한 carbon과 electron이 그 후에 지방으로 전환될 가능성을 의미한다. 그러나, Triscari와 Sullivan(14)의 HCA 투여 후 시간경 과별 지방 합성률 분석 연구 보고에 의하면 HCA에 의한 지방 합성 저해율은 식이 시작 4시간 후부터 10시간까지 약 10~20%의 차이를 보인 후 그 후 12~24시간 동안에는 지방 합성률에 있어 HCA군과

대조군이 큰 차이를 보이지않고 유사하다고 보고함으로써 위의 가설은 실증되지 못하였다.

한편, 앞서 소개하였듯이 방사능 동위원소를 이용한 연구 결과¹²⁾에 의하면, HCA투여는 실험동물간의 glycogen합성율을 유의적으로 증가시킨다고 보고하였다. HCA투여에 의한 ATP citrate lyase활성 저해는 세포질 내의 citrate의 농도 증가를 초래하고 이로 인해 mitochondria로부터 citrate유출이 억제되어 mitochondria내의 citrate농도가 상대적으로 증가되며 그 결과, 새로운 citrate의 형성 대신에 지방산으로 전환되지 못한 carbon과 electron들은 oxaloacetate와 phosphoenolpyruvate를 거쳐 gluconeogenic pathway로 역류 되는 현상이 나타나 glycogen의 substrate로 이용되어 glycogen농도를 증가 시키는데 이용되는 것으로 추측된다.

3. 혈중 중성지방과 cholesterol 농도

간에서의 지방산 합성률이 혈중 지방산과 cholesterol의 농도에 미치는 영향과 HCA투여가 이들 변수에 미치는 영향, 그리고 지방산 합성을 억제 함으로서 hypertriglyceridemia나 hypercholesterolemia증상이 호전 될 수 있는지 등의 가능성을 점검해 보기 위하여 본 실험이 진행되었다. HCA가 중성지방을 다량 함유하는 지단백(triglyceride-rich lipoprotein)의 분해나 이용 경로에 영향을 미친다는 보고는 현재까지는 없다. 혈중 중성 지방과 cholesterol농도는 meal-feeding 혹은 pair-feeding 3시간 반 후에 측정되었다. Table 5에 나타난 바와 같이 HCA투여는 혈중 중성지방의 농도를 control과 pair-fed대조군과 비교하여 각각 24.1% 그리고 20.6%의 유의적 저하를 보였다. 혈중 cholesterol의 농도에 있어서는 각각 13.6% 그리고 10.9%의 유의적 감소를 나타내었다. 이러한 혈중 지질의 감소는 Table 4에서 나타난 바와 같이 HCA에 의한 간에서의 지방산과 cho-

Table 4. Effect of (-)-hydroxycitrate and pair-feeding on lipogenesis and cholesterologenesis¹⁾

Treatment	Rate of lipogenesis		Rate of cholesterolgenesis	
	nmoles [¹⁴ C]alanine converted ²⁾	% of control	nmoles [¹⁴ C]alanine converted ²⁾	% of control
Control	925.6 ± 80.0 ^{a,4)}	100	24.7 ± 5.6 ^a	100
(-)-hydroxycitrate	618.4 ± 101.1 ^b	67	13.1 ± 4.8 ^b	53
Pair-fed control ³⁾	821.6 ± 72.4 ^a	88.7	21.8 ± 8.0 ^a	88.2

- 1) Eight lean Sprague Dawley rats per group were treated with either the placebo(control and pair-fed groups) or 400mg of *Pulmuone Diet Plus* containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule, followed by the 3 hours of 70% Glucose diet for a total period of 8 weeks.
- 2) The radioactive pulse was injected intravenously 30 min. before the animals were sacrificed, and livers were excised and treated immediately for in vivo rates of fatty acid and cholesterol synthesis.
- 3) The pair fed group was allowed to eat the amount of diet consumed the preceding day by the (-)-hydroxycitrate-treated group.
- 4) Values are means ± S.E., expressed in [¹⁴C]alanine converted to fatty acid or cholesterol per gram of liver per 30 min., and as percentages of control. Values in the same column not sharing a common letter superscript are significantly different. Significance is defined as p < 0.05 as determined by Student's t-test comparison.

lesterol합성을 저하에 기인되었다고 추측된다.

4. 지방세포의 세포 증식성(cellularity)

8주간의 사육이 끝난 후 실험동물 사체의 총지방량, 지방세포의 숫자, 그리고 지방세포의 크기는 Table 6과 같다. 체지방은 주로 복막후(retroperitoneal), 성선(gonadal), 그리고 피하(subcutaneous)의 저장부에 분포되어있는데, HCA군의 체지방량은 체중 대비 8.4%로서 11.6%의 control군과 10.9%의 pair-fed대조군에 비해 전체 체지방 분포의 감소를 보였다. HCA군의 총 체지방 무게는 20.3g으로서 control 그리고 pair-fed 대조군과 비교하여 각각 37.5% 그리고 31.2%의 유의적 감소를 나타내었다. 이러한 HCA의 장기 섭취에 의한 체지방량의 감소는 지방세포의 크기와 숫자의 감소에 의해서 발생되었다고 판단된다. Table 6과 Fig. 1에 나타난 바와 같이 HCA군의 총 지방세포 수는 54.8×10^6 으로서 control과 pair-fed군과 비교하여 각각 12.5% 그리고 9.9% 감소 하였다. HCA군은 control군과 비교하여 유

의적인 차이를 보였지만 pair-fed대조군과는 가시적인 차이를 나타내었을 뿐 통계학적으로 유의적인 차이를 보이지는 않았다. 지방세포의 크기에 있어서는 HCA군이 control과 pair-fed대조군과 비교하여 각각 35%와 31.3%의 유의적 저하를 나타내었다. 정상 쥐와 비만 쥐를 이용한 HCA의 지방세포 cellularity 비교 실험 결과¹³⁾에 의하면, 비만 쥐의 경우 HCA의 체지방의 감소는 주로 지방세포 숫자의 감소에 기인하며 정상 쥐의 경우는 주로 지방세포의 크기 변화에 의한 것임이 보고되었다. 정상 쥐를 이용한 본 실험의 경우에도, HCA섭취는 지방세포 수와 크기 양쪽 다 영향을 미치기는 하였지만 지방세포의 크기 감소에 더 큰 폭으로 작용함으로써 전체 체지방량 감소의 주된 원인으로 판단됨과 동시에 다른 연구 결과와도 일치함을 나타내었다.

HCA섭취에 의한 체중의 감소와 체지방량 저하의 원인이 HCA의 식욕 억제 효능에 의한 실험동물의 식이 섭취량의 감소 때문인 것만은 아닌 것으로 판단되며 이러한 결론은 pair-feeding대조군을 이용한 분석 수치로 더욱 명백하다고 할 수 있겠다.

Table 5. Effect of (-)-hydroxycitrate and pair-feeding on serum cholesterol and triglyceride level¹⁾

Treatment	Serum cholesterol (mg/dl)	Serum Triglyceride (mg/dl)
Control	125.6 ± 8.0 ^{a,3)}	64.7 ± 5.6 ^a
(-)-hydroxycitrate	108.4 ± 15.1 ^b	49.1 ± 4.8 ^b
Pair-fed control ²⁾	121.6 ± 9.4 ^a	61.8 ± 8.0 ^a

- 1) Eight lean Sprague Dawley rats per group were treated with either the placebo(control and pair-fed groups) or 400mg of *Pulmuone Diet Plus* containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule, followed by the 3 hours of 70% Glucose diet for a total period of 8 weeks.
- 2) The pair fed group was allowed to eat the amount of diet consumed the preceding day by the (-)-hydroxycitrate-treated group.
- 3) Values are means ± S.E., expressed in grams. Values in the same column not sharing a common letter superscript are significantly different. Significance is defined as p < 0.05 as determined by Student's t-test comparison.

요약 및 결론

본 연구에서는 흰쥐를 이용하여 HCA섭취에 의한 효능을 조사함으로써 대사 조절(metabolic regulation)에 의한 비만과 고지혈증 등의 증상 개선의 가능성을 검증하였다.

8주간의 HCA경구 투여는 실험동물의 식이 섭취량과 체중을 유의적으로 감소시켰다. HCA에 의한 식이 섭취량 감소의 기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았으며 더 많은 연구가 요구되지만 HCA에 의한 당 대사 경로의 변환의 결과 간의 glycogen의 농도가 증가되고 이 signal이 미주신경을 거쳐 시상하부의 포만 조절 기관을 자극하여 식욕을 저하시킨다고 주장 되어지고 있다. 그러나 HCA실험군은 동일량의 식이를 섭취 시킨 pair-fed 대조군과 비교하여도 25%의 유의적 체중 차이를 나타

Table 6. Effect of (-)-hydroxycitrate and pair feeding on carcass fat, total fat cell number and size¹⁾

Treatment	Carcass Fat		Total Cell Number (× 10 ⁶)	Cell Size (µg lipid/cell)
	g	%		
Control	32.5 ± 2.6 ^a	11.6 ± 2.3	62.6 ± 2.8 ^{a,3)}	0.51 ± 0.02 ^a
(-)-Hydroxycitrate	20.3 ± 1.8 ^b	8.4 ± 0.9	54.8 ± 6.3 ^b	0.33 ± 0.01 ^b
Pair-fed Control ²⁾	29.5 ± 2.2 ^a	10.9 ± 2.6	60.8 ± 4.9 ^{a,b}	0.48 ± 0.01 ^a

- 1) Eight lean Sprague Dawley rats per group were treated with either the placebo(control and pair-fed groups) or 400mg of *Pulmuone Diet Plus* containing approximately 20mg of HCA 1 hour prior to daily feeding schedule, followed by the 3 hours of 70% Glucose diet for a total period of 8 weeks.
- 2) The pair fed group was allowed to eat the amount of diet consumed the preceding day by the (-)-hydroxycitrate-treated group.
- 3) Values are means ± S.E.n=8. Values in the same column not sharing a common letter superscript are significantly different. Significance is defined as p < 0.05 as determined by Student's t-test comparison.

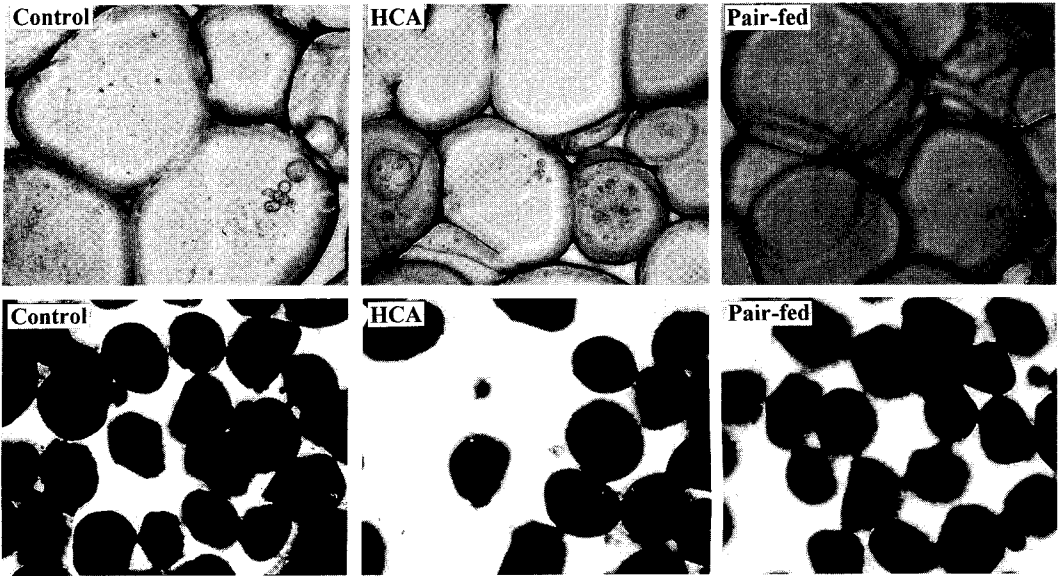


Fig. 1. Upper row : unfixed adipocytes were trypsinized, and dyed with Oil Red O and Trypan Blue. Approximately $\times 400$. Lower : Adipocytes were washed free of oil and fragments fixed with 2% osmium tetroxide in collidine buffer. Approximately $\times 100$.

냄으로써, HCA섭취에 의한 체중 저하가 단순히 식욕 저하에 의한 식이 섭취량 감소 때문이 아님을 시사하였다.

HCA실험군의 지방산 합성률은 control군에 비해서 33.2% 그리고 pair-fed대조군에 비해서는 24.7%의 유의적 감소를 보여주었다. HCA섭취에 의한 간세포에서의 cholesterol합성도 HCA군은 control과 pair-fed군과 비교하여 각각 47%와 39.9%의 유의적 감소를 나타내었다. 이는 HCA가 citrate 분해 효소인 ATP-citrate lyase를 competitively inhibition 시킴으로써 acetyl CoA pool의 저하, 즉 지방산과 cholesterol생합성에 요구되는 2-carbon units의 이용도를 제한함으로써 발생된 결과로 추측된다.

HCA투여에 의한 지방산과 cholesterol합성 저해는 혈중 중성지방의 농도를 control과 pair-fed군과 비교하여 각각 24.1% 그리고 20.6%씩 유의적으로 저하시켰다. 혈중 cholesterol의 농도는 각각 13.6% 그리고 10.9%의 유의적 감소를 나타내었다.

또한, HCA는 실험군의 체 지방량은 8.4%로서 11.6%의 control군과 10.9%의 pair-fed군에 비해 감소를 보였으며 총 체지방 무게는 20.3g으로서 control과 pair-fed 그룹과 비교하여 각각 37.5% 그리고 31.2%의 유의적 감소를 나타내었다. 이는 지방세포의 크기와 숫자의 감소에 의한 것으로 나타났으며 HCA군의 총 지방세포 수는 54.8×10^6 으로서 control과 pair-fed대조군과 비교하여 각각 12.5% 그리고 9.9% 감소 하였고 지방세포의 크기에 있어서는 control과 pair-fed대조군과 비교하

여 각각 35%와 31.3%의 유의적 저하를 나타내었다.

결론적으로, HCA의 비만억제 효과를 검증한 본 연구는 1) 대사 조절에 의한, 즉 HCA의 지방합성 억제 효능을 이용한, 비만 조절의 가능성, 2) HCA의 혈중 중성지방과 cholesterol저하 효과에 의한 고지혈증의 관리 가능성, 그리고 3) HCA를 이용함으로써 식이 섭취량 조절 이전에 관여하는 중요한 요소를 정의하고 이해하는데 도움이 될 가능성 등을 시사하였다. 기능성의 구체화를 위해서는 실제 임상 실험등을 통한 효능의 검증이 요구되며, HCA의 지방 합성과 식욕 억제 기전에 관해서는 좀더 폭 넓고 다양한 접근 방법의 연구가 필요하다고 판단된다.

Literature cited

- 1) Sullivan AC, Triscari J. Metabolic regulation as a control for lipid disorders. I. Influence of (-)-hydroxycitrate on experimentally induced obesity in the rodent. *Am J Clin Nutr* 30 : 767-776, 1977
- 2) Lewis S, Neelakantan S. (-)-hydroxycitric acid-the principal acid in the fruits of *Garcinia cambogia* Desr. *Phytochemistry* 4 : 619, 1965
- 3) Lily M. Perry with Judith Metzger. *Medicinal plants of East and Southeast Asia*(Cambridge, Mass. : The MIT Press) 174-176, 1980
- 4) Lad V, Frawley D. *The Yoga of Herb*(Santa Fe : Lotus Press) 216, 1986

- 5) Watson JA, Fang M, Lowenstein JM. Tricarballoylate and hydroxycitrate : substrate and inhibitor of ATP : citrate oxaloacetate lyase. *Arch Biochem Biophys* 135 : 209, 1969
- 6) Lowenstein JM. Experiments with (-)-hydroxycitrate. *In : Essays in Cell Metabolism*, Edited by W. Bartley, H.L. Kornberg, and J.R. Quayle.(London : John Wiley and Sons Press) 153-166, 1970
- 7) Spencer AF, Lowenstein JM. The supply of precursors for the synthesis of fatty acids. *J Biol Chem* 237 : 3640, 1962
- 8) Srere, PA, Bhaduri A. Incorporation of radioactive citrate into fatty acids. *Biochim Biophys Acta* 59 : 487, 1962
- 9) Sullivan AC, Hamilton JG. Inhibition of Lipogenesis by in Rat Liver by (-)-hydroxycitrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 150 : 183-190, 1972
- 10) Sullivan AC. Metabolic Regulation as a Control for Lipid Disorders. II. Influence of (-)-Hydroxycitrate on Genetically and Experimentally Induced Hypertriglyceridemia in the rat. *Am J Clin Nutr* 30 : 777-784, 1977
- 11) Sullivan AC, Triscari J. *Possible inter-relationship between metabolite flux and appetite*(New York : Academic Press) 115-125, 1976
- 12) Sullivan AC, Triscari J, Miller ON. The influence of (-)-hydroxycitrate on in vivo rates of hepatic glycogenesis, lipogenesis and cholesterologenesis. *Federation Proc* 33 : 650, 1974
- 13) Greenwood MRC, Cleary MP, Gruen R, Blase D, Stern JS. Triscari J, Sullivan, AC. Effect of (-)-hydroxycitrate on development of obesity in the Zucker obese rat. *Am J Physiol* 240 : E72-E78, 1981
- 14) Sullivan AC, Triscari J, Hamilton JG, Miller ON. Effect of (-)-hydroxycitrate upon the accumulation of lipid in the rat : I. Lipogenesis. *Lipids* 9 : 121-128, 1973
- 15) Hirsch J, Knittle JL. Cellularity of obese and nonobese human adipose tissue. *Federation Proceedings* 29 : 1516-1521, 1970
- 16) Johnson PR, Zucker LM, Cruce JAF, Hirsch J. Cellularity of adipose depot in the genetically obese Zucker rat. *J Lipid Res* 12 : 706-714, 1971
- 17) Becker, EE, Kissileff HR. Inhibitory controls of feeding by the ventromedial hypothalamus. *Am J Physiol* 33 : 533, 1974
- 18) Grossman SP. Role of hypothalamus in the regulation of food and water intake. *Physiol Rev* 82 : 200, 1975
- 19) Tucek S. Subcellular distribution of acetyl CoA synthetase, ATP citrate lyase, citrate synthase, choline acetyltransferase, fumarate hydrolase and lactate hydrolase and lactate dehydrogenase in mammalian brain tissue. *J Neurochem* 14 : 531, 1967