

마치현 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 지방 분해 및 Hormone Sensitive Lipase (HSL) 유전자 발현에 미치는 효과*

이막순** · 김종태*** · 김철진*** · 조용진*** · 김양하***

이화여자대학교 식품영양학과,** 한국식품연구원 시스템공학연구팀***

Effects of *Portulaca Oleracea* L. Extract on Lipolysis and Hormone Sensitive Lipase (HSL) Gene Expression in 3T3-L1 Adipocytes*

Lee, Mak Soon** · Kim, Chong Tai*** · Kim, Chul-Jin*** · Cho, Young-Jin*** · Kim, Yangha***

Department of Food and Nutritional Sciences,** Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Biosystems Engineering Team,*** Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate the lipolytic effects of *Portulaca oleracea* L. extract in 3T3-L1 adipocytes. The *Portulaca oleracea* L. was extracted with extrusion method using twin-screw extruder under 58~60 rpm screw speed, 4~5 kg/hr feed rate, 140°C extrusion temperature. The lipolytic action of *Portulaca oleracea* L. extract was estimated by measuring the amount of glycerol and free fatty acids (FFA) released from 3T3-L1 adipocytes and by measuring the cellular lipid content in 3T3-L1 adipocytes. The hormone sensitive lipase (HSL) mRNA level was analyzed using quantitative real-time PCR. The *Portulaca oleracea* L. extract at 1 to 100 µg/ml suppressed lipid accumulation. The release of glycerol and FFA into the medium, and the mRNA level of HSL were significantly increased by the addition of *Portulaca oleracea* L. extract at dose-dependent manner. In conclusion, the *Portulaca oleracea* L. extract was suggested to have the lipolytic effect through release of lipolytic products (FFA and glycerol) of triacylglyceride to the culture medium and suppression of lipid accumulation via up-regulation of HSL gene expression in 3T3-L1 adipocytes. (*Korean J Nutrition* 39(8): 742~747, 2006)

KEY WORDS : *Portulaca oleracea* L, 3T3-L1 adipocytes, lipolytic effect, HSL gene expression.

서론

마치현 (*Portulaca oleracea* L.)은 마치현과 (*Portulaca oleracea* L. (family: Portulacaceae)의 1년생 초본으로서 오행초, 쇠비름, 장명채, 마치채 등으로 불리기도 하는데 주로 길가나 텃밭 등에서 5~9월에 걸쳐 자생하며 줄기의 높이가 약 15~30 cm내외로 털이 없으며, 줄기는 갈적색이고 가지가 많이 갈라져서 땅위로 비스듬히 퍼지면서 자라는 식물이다.¹⁾ 쇠비름은 양념 등으로 버무려 먹기도 하고 '본

초강목'과 '동의보감' 등에는 쇠비름이 충독 및 사독 등의 해독제로도 사용되었고,²⁾ 아라비아 반도에서는 방부제, 항 괴혈병제, 진경제, 이뇨제, 구충제, 피부진정제로 사용되었으며,³⁾ 그 외 근육이완 활성과 항암효과에 대한 연구도 보고되고 있다.⁴⁾ 마치현의 화학성분으로는 노아드레날린 (L-noradrenaline), 도파민 (dopamine), 칼륨, 여러 종류의 유기산, 글루타민산 (glutamic acid), 아스파틴산 (aspartic acid), 알라닌 (alanine), 그리고 terpepne류 중에서 monoterpene 배당체인 portuloside A가 알려져 있다.⁵⁻⁷⁾ 또한 마치현의 잎이나 줄기 및 전초에서 α -리놀레산 (α -linoleic acid)과 같은 ω -3 지방산 함량이 높은 것으로 보고되었으며,^{8,9)} 페놀성 화합물, coumarins, flavonoids, alkaloid, 비타민 B₁과 C 등이 함유된 것으로 보고되었다.¹⁰⁾ 최근 연구 결과들에 의하면 마치현 추출물이 항 위궤양 작용,¹¹⁾ 기관지 천식 완화,¹²⁾ 창상 치유,¹³⁾ 항균 활성¹⁴⁾ 및 항진균 활성¹⁵⁾ 등에도 효과가 있다고 보고되었다.

접수일 : 2006년 11월 14일

채택일 : 2006년 11월 22일

*This work was supported by the Ministry of Commerce, Industry and Energy for the Regional Innovation System program (R-04-001) in Korea.

[§]To whom correspondence should be addressed.

E-mail : yhmoon@ewha.ac.kr

지금까지 이와 같은 마치현의 여러 생리활성효과들을 측정한 연구결과는 보고되었으나 마치현의 항비만 효과에 대한 연구는 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 마치현 추출물이 항비만 생리 활성을 나타내는 새로운 기능성 식품 신소재로서의 개발 가능성을 탐색하기 위해 3T3-L1 지방세포 모델을 이용하여 마치현 추출물의 지방 분해 효과와 호르몬 민감성 지방분해 효소인 hormone sensitive lipase (HSL) 유전자 발현에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 및 추출방법

가평과 분당지역의 야산에서 생육하고 있는 마치현 (*Portulaca oleracea* L.)을 2005년 9월에 채취하여 동결건조한 후 분쇄하여 -20°C 냉동고에 보관하면서 분석시료로 사용하였다. 마치현 세포벽의 압출수용화 처리는 동방향 완전 맞물림형 이축압출성형장치 (corotating, intermeshing type twin-screw extruder, Biex-DNDL 44, Buhler Brothers Co., Switzerland)를 사용하여 마치현 원료의 투입속도 4~5 kg/hr, 스크류 회전속도 58~60 rpm, 바렐의 가열온도 140°C의 조건하에 실시하였다. 저분자 물질 분리는 압출 수용화 처리한 마치현 시료에 20배의 80% 에탄올을 첨가하여 상온에서 24시간 교반하면서 추출하고 여과 후 농축하여 실험에 사용하였다.

2. 3T3-L1 지방세포 배양

Murine 3T3-L1 지방세포는 10% fetal bovine serum (FBS)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배양액 (100 mM HEPES, 50 IU penicillin, and 50 µg streptomycin/ml)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하고 배양액은 3일마다 교환하였다. 3T3-L1 지방세포의 분화를 위하여 3T3-L1 지방세포가 약 60%의 confluency를 나타낼 때 10 µg/ml insulin, 0.25 µM dexamethasone, 0.5 mM 1-methyl-3-isobutylxanthine을 첨가시킨 DMEM 배양액으로 2일간 지방세포 분화를 유도한 다음 10% FBS를 함유하는 DMEM 배양액에서 9일간 배양하여 80% 이상 지방 입자 축적을 확인하였다.

3. 세포독성 측정

살아있는 세포 수를 측정하여 세포독성을 평가하기 위해 WST-8 assay (Dojindo, Laboratories, Kumamoto, Japan)를 사용하여 실험하였다. 실험 조건별 처리한 세포에 tetrazolium compound인 WST-8을 투여하고 일정시간

동안 배양하여 세포 내 미토콘드리아에 존재하는 succinate dehydrogenase에 의해 생성된 수용성 formazan의 양을 450 nm에서 비색정량하여 세포증식 및 독성을 확인하였다.

마치현 추출물 시료들은 DMSO에 녹인 후, 멸균된 0.2 µl millipore filter로 여과하여 사용하였다. 1 × 10³ 3T3-L1 세포를 96-well plate에 seeding하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 배양하였다. 마치현 추출물 시료는 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml이 되도록 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 24시간 배양하였다. CCK-8/PMS 용액 10 µl를 각 plate에 첨가하여 4시간 더 배양시킨 다음 microplate reader (spectraMAX 340, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 세포에 대한 독성은 각각의 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

4. Oil-red O 염색 및 정량

3T3-L1 지방세포는 PBS로 세척하고 10% formalin/PBS (pH 7.4)에서 세포를 고정한 후, 0.6% oil red O dye를 이용하여 축적된 지방을 염색하였다. 염색된 지방 함량을 측정하기위해서 4% Nonidet P-4가 포함된 용액으로 용해한 후 분광광도계를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁶⁾ 지방 함량은 대조군의 평균 흡광도 값을 구하여 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타내었다.

5. RNA 추출 및 quantitative real-time PCR

TRIzol (Gibco)을 이용하여 지방세포를 lysis시킨 후 시료를 균질화하였다. 이를 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 통하여 상층액을 수거한 후 이 상층액과 phenol: chloroform: isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 혼합한 다음 교반한 후 15분 정도 상온에 두었다가 맑은 상층액만을 수거하여 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. RNA층만 떼서 새로운 튜브에 옮기고 동량의 100% isopropanol을 혼합한 후 약 15분 정도 상온에 두었다가 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 RNA pellet에 75% ethanol로 세척한 후 4°C, 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 total RNA를 추출하였다.

Total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 reverse transcription의 반응조건은 다음과 같다. 5X buffer, 1mM dNTPs, 30pmole oligo dT19, 200U M-MLV (moloney-murine leukemia virus reverse transcriptase, Promega)이 포함된 총 volume 20 µl에 4 µg total RNA를 혼합하여 37°C에서 1시간, 70°C에서 15분간 반응시켰다. 각각의 cDNA 1 µl를 2X SYBR Green PCR master mix (Qia-

gen), 0.25 μ M primer와 반응시켰다. Real-time PCR은 Rotor-Gene RG-3000A (Corbett Research)로 사용하였고 PCR 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 15분, 95 $^{\circ}$ C 30초 (denaturation), 55 $^{\circ}$ C 30초 (annealing), 72 $^{\circ}$ C 30초 (extension)로 증폭하였다. PCR 증폭을 위해 사용된 primer 염기서열은 다음과 같다; HSL forward 5'-ACTCAGACCAGA-AGGCACTA-3' reverse 5'-TAGTTCCAGGAAGG-AGTTGA-3', β -actin forward 5'-GTTGCCAATAGTGATGACCT-3' reverse 5'-GGACCTGACAGACTACCTCA-3'. 정량분석을 위한 형광 측정은 매 PCR cycle 마다 측정되었으며 유전자 발현에 대한 상대적인 정량은 delta-delta Ct 방법을 이용하여 수행하였다.

6. 유리지방산과 글리세롤 함량 측정

분화된 3T3-L1 지방세포는 2% (wt/vol) fatty acid-free bovine serum albumin (BSA)가 포함된 DMEM에서 16시간 배양한 후, 마치현 추출물을 0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μ g/ml 농도로 처리하여 24시간동안 배양하였다. 세포로부터 방출된 배양액을 65 $^{\circ}$ C에서 8분 동안 열을 가하여 세포로부터 방출된 효소의 활성을 정지시켰다. 글리세롤 함량은 glycerol analysis kit (Roche Molecular Biochemicals)를 이용하여 측정하였고 유리지방산은 acyl-CoA oxidase-based colorimetric kit (NEFA-C; WAKO Pure Chemicals)를 이용하여 분석하였다. 세포양의 표준화를 위한 단백질 함량은 BCA protein assay (Pierce, Rockford, IL)에 의해 측정하였다.

7. 통계분석

각 실험 결과는 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 통계 프로그램에 의하여 실험군의 평균과 표준 편차를 계산하고, 각 실험군의 분석항목별 차이는 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < .05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 마치현 추출물의 세포독성 측정

3T3-L1 지방세포에서 마치현 추출물의 세포독성을 조사하기 위해서 0.01~100 μ g/ml의 농도에서 MTT assay를 변형한 WST-8 assay 실험을 수행하였다. 마치현 추출물들을 처리하였을 때 대조군인 DMSO를 처리한 것에 비해 세포 증식의 변화 정도를 퍼센트로 계산하여 마치현 추출물이 세포독성을 나타내는지 조사하였다 (Fig. 1). 고농도인 100 μ g/ml의 농도를 처리하였을 때도 대조군에 비

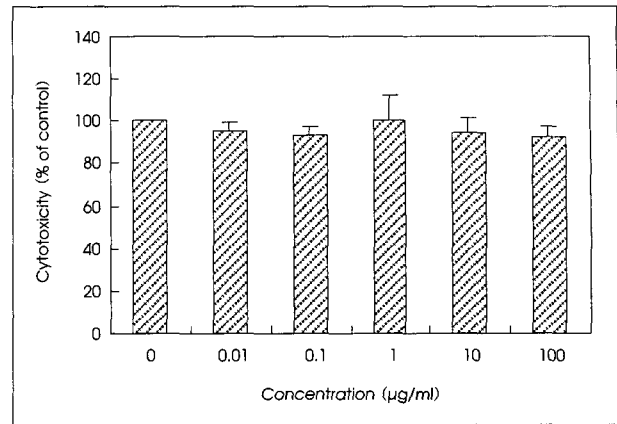


Fig. 1. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on cell cytotoxicity in 3T3-L1 adipocytes. The 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours in serum-free media with different concentration of *Portulaca oleracea* L. extract. Cytotoxicity assay was determined using WST-8 assay. Values are expressed as mean \pm SD (n = 3). Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test.

Table 1. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on lipid content in 3T3-L1 adipocytes^{1,3)}

Concentration (μ g/ml)	Lipid accumulation (% of control)
0	100.0 \pm 9.5 ^a
0.01	93.4 \pm 4.7 ^{ab}
0.1	89.8 \pm 1.3 ^{ab}
1	87.7 \pm 2.0 ^b
10	84.5 \pm 7.0 ^b
100	84.3 \pm 4.7 ^b

¹⁾The 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours in serum-free media with different concentration of *Portulaca oleracea* L. extract. The intracellular oil droplets were stained with oil red O dye and quantified by spectrophotometer. The values were calculated as a percentage of lipid accumulation of the control cells treated without *Portulaca oleracea* L. extract.

²⁾Values are expressed as mean \pm SD (n = 3).

³⁾Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test.

해 세포증식 변화율이 감소하지 않는 것으로 볼 때 본 연구에서 사용한 마치현 추출물이 세포독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다.

2. 마치현 추출물이 지방축적 저해에 미치는 효과

마치현 추출물에 의한 지방축적 효과를 측정하기 위해 마치현 추출물을 3T3-L1 지방세포에 농도별 (0.01, 0.1, 1, 10 및 100 μ g/ml)로 처리하였다. 마치현 추출물 처리에 의한 3T3-L1 지방세포 내 지방함량 측정은 oil-red O 염색에 의해 세포내 지방입자 염색한 후 흡광도를 측정하여 정량하였다. 지방세포 내 지방 함량은 마치현 추출물 1, 10 및 100 μ g/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 12%, 15% 및 16% 유의적으로 ($p < 0.05$) 감소하였으나 0.01 및 0.1 μ g/ml 낮은 농도에서는 유의적인 차이가 없

었다 (Table 1). 이와 같은 실험 결과로부터 마치현 추출물이 지방세포에서 지방함량을 저하시킨다는 것을 추측할 수 있다.

3. 마치현 추출물의 지방분해 효과

지방세포에 저장되어 있는 중성지방은 유리지방산과 글리세롤로 가수 분해되어 혈액 속으로 방출된다.¹⁷⁾ 마치현 추출물에 의한 지방분해 효과를 측정하기 위해 마치현 추출물을 3T3-L1 지방세포에 농도별 (0.01, 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml)로 처리한 후 세포 밖으로 방출된 지방 분해 산물인 유리지방산과 글리세롤 함량을 측정하였다. 지방세포 배양액으로 방출된 유리지방산 함량은 마치현 추출물 1, 10 및 100 µg/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 24%, 36% 및 42% 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였으며 (Fig. 2A) 글리세롤 함량 또한 마치현 추출물 1, 10 및 100 µg/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 55%, 58% 및 57% 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였으나 0.01 및 0.1 µg/ml 낮은 농도에서는 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 2B). 이와

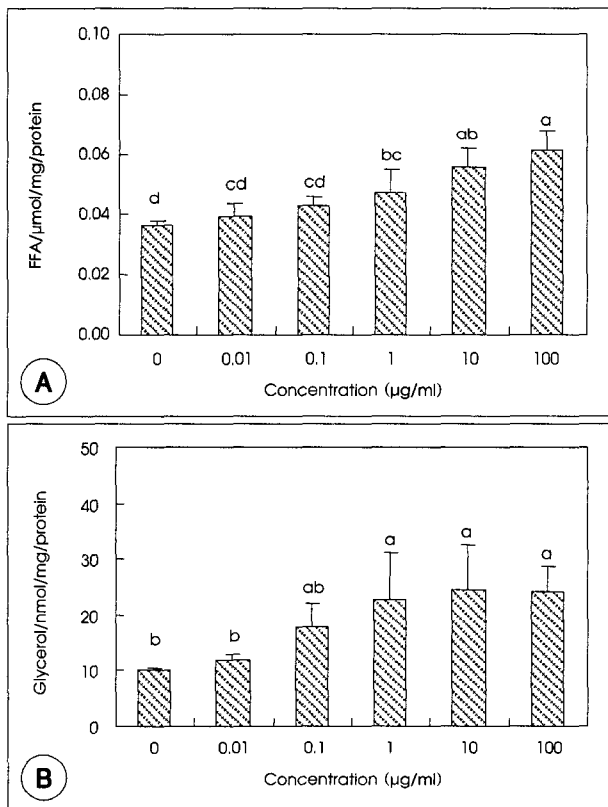


Fig. 2. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on the amount of free fatty acids (FFA) (A) and glycerol (B) release in 3T3-L1 adipocytes. The 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours in serum-free media with different concentration of *Portulaca oleracea* L. extract. The media was collected and assayed for FFA and glycerol content. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test.

같은 실험 결과는 마치현 추출물이 지방세포에 저장되어 있던 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 가수 분해시켜 세포 밖으로 방출 시켰음을 시사하고 있다. 지방분해효과를 측정하기 위해 세포로부터 배양액으로 방출된 글리세롤 농도를 분석한 다른 연구 결과를 보면, Green 등¹⁸⁾은 종양괴사인자 (TNF- α)와 포도당을 처리하였을 때 3T3-L1 지방세포로부터 배양액으로 방출된 글리세롤 함량이 증가하였다고 보고하였으며, Ahn 등¹⁹⁾은 김치 추출물을 처리하였을 때 3T3-L1 지방세포로부터 배양액으로 방출된 글리세롤 함량이 유의적으로 증가하였다고 보고하였다.

4. 마치현 추출물이 HSL 유전자 발현에 미치는 효과

마치현 추출물이 중성지방의 분해를 촉진시켜 지방세포 내의 지방 축적을 억제 시키는 기전을 살펴보고자 HSL 유전자 발현에 미치는 효과를 조사하였다. HSL 효소는 지방 조직에서 지방을 분해할 때 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해하는 지방분해효소로 알려져 있다.²⁰⁻²²⁾ 마치현 추출물에 의한 HSL 유전자 발현량을 측정하기 위해 3T3-L1 지방세포에 마치현 추출물을 농도별 (0.01, 0.1, 1, 10 및 100 µg/ml)로 처리하였을 때 HSL 유전자 발현량은 마치현 추출물 1, 10 및 100 µg/ml 처리하였을 때 대조군에 비해 각각 4.4, 4.2 및 4.6배 유의적으로 ($p < 0.05$) 증가하였으나 0.01 및 0.1 µg/ml 낮은 농도에서는 유의적인 차이가 없었다 (Fig. 3). 일반적으로 백색 지방조직에서 $\beta 3$ -adrenergic 수용체의 활성화로 세포내 cAMP 농도가 증가하여 HSL이 활성화되는 것으로 알려져 있다.²³⁾ Holm 등²⁴⁾은 에피네프린과 글루카곤이 adenylate cyclase를 자극하여 HSL의 인산화를 통해 지방분해를 증가시킨다고 보

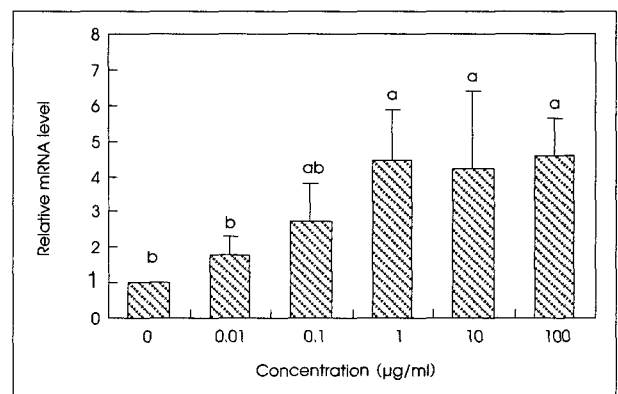


Fig. 3. Effects of *Portulaca oleracea* L. extract on hormone sensitive lipase (HSL) gene expression. The 3T3-L1 adipocytes were incubated for 24 hours in serum-free media with different concentrations of *Portulaca oleracea* L. extract. The amount of mRNA was measured by quantitative real-time PCR. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). Values with different superscript letters are significantly different at $p < .05$ by Duncan's multiple range test.

고하였으나 Ahn 등¹⁹⁾은 본 연구 결과와 비슷하게 김치 추출물이 3T3-L1 지방세포에서 HSL 유전자 발현 증가를 통해 지방분해를 증가시킨다고 보고하였다. 따라서 지방분해에 중요한 작용을 하는 HSL 활성은 효소의 인산화와 유전자 발현 증가의 2개 경로에 의하여 증가되는 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서는 식품소재인 마치현 추출물이 HSL 유전자의 발현을 조절하여 저장되어 있던 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해하는 효과를 보여줌으로써 마치현 추출물이 항비만 생리 활성을 나타내는 새로운 기능성 식품 신소재로서의 개발 가능성을 제시하여주고 있다.

요약 및 결론

최근 건강에 대한 관심 증가로 약용 및 식용식물을 비롯한 각종 기능성 소재 탐색에 대한 연구들이 활발하게 진행되고 있다. 본 연구에서는 세포벽의 압출 수용화 처리과정을 거쳐 추출한 마치현 저분자 물질의 항비만 식품소재로서의 가능성을 알아보려 하였다. 지방분해 효과와 지방세포의 호르몬 민감성 지방분해 효소인 HSL (Hormone Sensitive Lipase) 유전자 발현을 측정하기 위해 마치현 추출물을 3T3-L1 지방세포에 처리하였다. 마치현 추출물 처리에 의하여 세포독성은 나타나지 않았고 지방세포 내 중성지방 함량은 유의적으로 감소하였으며 지방세포 밖으로 방출된 중성지방 분해산물인 유리지방산과 글리세롤 함량은 유의적으로 증가하였다. 지방조직에서 중성지방을 유리지방산과 글리세롤로 분해해주는 효소인 HSL의 유전자 발현 또한 마치현 추출물 처리에 의해 유의적으로 증가하였다. 따라서 이 결과들은 마치현 추출물이 지방조직에서의 HSL 유전자 발현 증가를 통한 지방 분해로 항비만 효과를 나타냄을 보여주고 있다. 앞으로 마치현 추출물이 항비만 생리 활성을 나타내는 새로운 기능성 식품 신소재로서 개발 가능성이 있을 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Yook CS. *Coloured medicinal plants of Korea*. Academic Publishing Co., Seoul, pp.164, 1989
- 2) Lee TB. *Illustrated Flora of Korea*. Hyangmunsa Publishing Co., Seoul, pp.324, 1999
- 3) Habtemariam S, Harvey AL, Waterman PG. The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions. *J Ethnopharmacol* 40(3): 195-200, 1993
- 4) Parry O, Marks JA, Okwuasaba FK. The skeletal muscle relaxant

- action of *Portulaca oleracea*: role of potassium ions. *J Ethnopharmacol* 40(3): 187-194, 1993
- 5) Peng PC, Haynes LJ, Magnus KE. High concentration of (-)-Noradrenaline in *Portulaca oleracea* L. *Nature* 191: 1108, 1961
- 6) Mohamed AI, Hussein AS. Chemical composition of purslane (*Portulaca oleracea*). *Plant Foods Hum Nutr* 45(1): 1-9, 1994
- 7) Sakai N, Inada K, Okamoto M, Shizuri Y, Fukuyama Y. Portulacide A. A monoterpene glucoside, from *Portulaca oleracea*. *Phytochemistry (Oxford)* 42(6): 1625-1628, 1996
- 8) Omara-Alwala TR, Mebrahtu T, Prior DE, Ezekwe MO. Omega three fatty acids. in purslane (*Portulaca oleracea*) tissues. *J Am Oil Chem Soc* 68(3): 198-199, 1991
- 9) Liu L, Howe P, Zhou YF, Xu ZQ, Hocart C, Zhan R. Fatty acids and beta-carotene in australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. *J Chromatogr* 893(1): 207-213, 2000
- 10) Bea KH. *The medicinal plants of Korea*. Kyohaksa Publishing Co., Seoul, p.129, 1999
- 11) Karimi G, Hosseinzadeh H, Ettehad N. Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of *Portulaca oleracea* L. extracts in mice. *Phytother Res* 18(6): 484-487, 2004
- 12) Malek F, Boskabady MH, orushaki MT, Tohidi M. Bronchodilatory effect of *Portulaca oleracea* in airways of asthmatic patients. *J Ethnopharmacol* 93: 57-62, 2004
- 13) Rached AN, Afifi FU, Disi AM. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. *J Ethnopharmacol* 88: 131-136, 2003
- 14) Lim MK, Kim MR. Antimicrobial activity of methanol extract from *Soibirhym* (*Portulaca oleracea*) against food spoilage disease microorganisms and the composition of the extract. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 17: 565-570, 2001
- 15) Oh KB, Chang IM, Hwang KJ, Mar W. Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. *Phytother Res* 14(5): 329-332, 2000
- 16) Moreno-Aliaga MJ, Matsumura F. Endrin inhibits adipocyte differentiation by selectively altering expression pattern of CCAAT/enhancer binding protein-alpha in 3T3-L1 cells. *Mol Pharmacol* 56(1): 91-101, 1999
- 17) Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul* 35: 163-178, 1995
- 18) Green A, Rumberger JM, Stuart CA, Ruhoff MS. Stimulation of lipolysis by tumor necrosis factor-alpha in 3T3-L1 adipocytes is glucose dependent: implications for long-term regulation of lipolysis. *Diabetes* 53(1): 74-81, 2004
- 19) Ahn IS, Do MS, Kim SO, Jung HS, Kim YI, Kim HJ, Park KY. Antiobesity effect of Kochujang (Korean fermented red pepper paste) extract in 3T3-L1 adipocytes. *J Med Food* 9(1): 15-21, 2006
- 20) Frayn KN, Coppack SW, Fielding BA, Humphreys SM. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Adv Enzyme Regul* 35: 163-178, 1995

- 21) Langin D, Holm C, Lafontan M. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc* 55: 93-109, 1996
- 22) Morimoto C, Kameda K, Tsujita T, Okuda H. Relationships between lipolysis induced by various lipolytic agents and hormone-sensitive lipase in rat fat cells. *J Lipid Res* 42 (1): 120-127, 2001
- 23) Stralfors P, Bjorgell P, Belfrage P. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase in intact adipocytes: identification of phosphorylated sites and effects on the phosphorylation by lipolytic hormones and insulin. *Proc Natl Acad Sci* 81: 3317-3321, 1984
- 24) Holm C, Osterlund T, Laurell H, and Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Annu Rev Nutr* 20: 365-393, 2000