

## 갈근(葛根)으로부터 분리된 puerarin의 항당뇨 효과

임현애 · 임지선 · 김정상

경북대학교 동물공학과

### Anti-Diabetic Effect of Puerarin Isolated from *Puerariae Radix*

Hyun-Ae Lim, Ji-Sun Lim, Jong-Sang Kim\*

Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

#### Abstract

In this study we evaluated the anti-diabetic potential of *Puerariae Radix* and its isoflavone (puerarin) by investigating their inhibitory activities against digestive enzymes,  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase and lipase and effect on glucose uptake and PPAR  $\gamma$  expression. The activities of carbohydrate digestive enzymes were not inhibited by puerarin. Glucose uptake in differentiated adipocytes was stimulated by puerarin. Furthermore, puerarin enhanced the differentiation of preadipocytes as evaluated by triacylglycerol (TG) accumulation, which is specific for differentiated adipocytes. The effect of puerarin on expression of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) gene, which is associated with obesity and dyslipidemia, was examined by both real-time PCR and reverse transcriptase PCR. The study demonstrated that puerarin increased the expression of PPAR- $\gamma$ . In conclusion, puerarin showed potential to exert anti-diabetic action by enhancing cellular glucose uptake and thereby TG accumulation in adipocyte tissue.

**Key words :** Puerarin, Digestive enzymes, Glucose uptake, PPAR- $\gamma$

#### 서 론

통계청 자료에 의하면 2005년 당뇨병으로 인하여 사망하는 사람의 수가 1999년에 비해 1.5배 증가된 11,802명으로 집계되었으며 대부분이 제2형 당뇨병인 것으로 나타났다(통계청, 2006). 이처럼 급속히 증가되는 당뇨병을 막기 위해 항당뇨 물질개발이 큰 관심이 되고 있으며 특히 천연물 소재를 이용하고자 하는 노력이 최근 들어 증가하고 있다. Puerarin은 갈근(葛根, *Puerariae Radix*)에 존재하는 이소플라본 중의 하나이

다. 갈근은 예로부터 고열과 두통 그리고 빈혈, 이질과 같은 증상에 대해 민간요법으로 이용되어 왔으며 최근에는 심혈관질환, 고혈압 (Song et al., 1988), 그리고 아테롬성 동맥경화증 등에 효과가 있다고 보고되고 있다. 특히 Hsu (2003)은 동물실험을 통해 streptozotocin으로 유도된 당뇨병마우스에게 puerarin을 투여한 결과, 혈 중 포도당의 농도 조절기능을 확인했고, 항당뇨 물질로써의 가능성을 제시하였다. 항당뇨 물질로써의 적합성을 검증하는 방법에는 여러 가지가 있는데, 제2형 당뇨병의 경우 인슐린 저항성을 극복하기 위해

경구 혈당제를 이용하여 고혈당으로 인한 쇼크를 억제하는 방법이 있으며 또 다른 방법으로는 세포의 인슐린 감수성을 촉진하여 세포내로 포도당의 흡수를 유도하는 방법이 있다 (Zhang et al., 2000; Bailey, 1999). 이러한 방법을 이용하여  $\alpha$ -glucosidase inhibitor인 acarbose와 miglitol, 인슐린 분비를 촉진하는 sulfonylurea계, 인슐린 감수성을 촉진하는 metformin, thiazolidinedione계 등이 현재 제2형 당뇨병의 치료제로 사용되고 있다. Glucose transporter (GLUT)계는 포도당의 흡수와 혈당조절과 관련이 되어 있는데 이들은 지방세포와 근육세포에 많이 존재하는 것으로 보고되고 있다 (Proietto, 1999). 지방세포는 체내 지방 대사를 관장 할 뿐만 아니라 여러 신호전달 물질 및 호르몬을 분비하여 식욕조절, 불임, 생식, 조혈작용 등 체내 활성을 통제한다 (Gregoire et al., 1998). 또한 인슐린 신호전달과정 중 GLUT 4를 통해 외부의 당을 세포내로 유입하여 체내 당대사를 조절하는 기능을 수행하고 있다. 최근 들어, 지방세포에 특이적으로 존재하는 GLUT 4를 통하여 인슐린 감수성 극복에 대한 연구와 지방세포의 분화에 대해 특이적으로 발현되는 단백질인 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 갈근에 함유된 puerarin의 함량을 분석하고, 화합물의 탄수화물 및 지방소화 효소에 대한 저해활성, 분화된 지방세포에서 포도당 uptake 및 중성지방축적에 미치는 영향을 평가하여 향후 항당뇨 물질로써의 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약

Methanol, acetate, acetonitrile (HPLC grade)은 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입을 하였으며, porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase, porcine pancreatic lipase, rat intestinal acetone powder, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-hexa(1  $\rightarrow$  4)-gulcopyranoside, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside, 4-methyumbelliferyl oleate (4-MU oleate), dimethylsulphoxide (DMSO), Sodium bicarbonate, Insulin, Oil red O,

Dexamethasone (DEX), Isopropanol, Formaldehyde, 1-Methyl-3-isobutylxanthin (IBMX), Potassium chloride, Calcium chloride, Magnesium sulfate, Sodium phosphate, Triton X-100는 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 구입하였다. 그리고 Nonidet<sup>®</sup> P 40 substitute은 Fluka에서 2-Deoxy-D-[1-<sup>3</sup>H]glucose은 Amersham Bioscience (UK)에서 각각 구입을 하였으며 각 효소활성의 positive control로 사용한 Acarbose (96.1 %, pure)는 Bayer Korea (Seoul, Korea)에서 Orlistat (Xenical<sup>®</sup>)은 Roche (Makati, Philippines)에서 구입하였다.

### 2. 갈근의 puerarin 함량 분석

실험에 사용된 갈근은 대구광역시 약전골목에서 구입을 하여 산 가수분해를 하였다. 산 가수분해한 방법은 다음과 같다. 갈근분말을 g당 1 N-HCl 2 ml과 혼합하여 95 °C heating block에서 90분간 반응을 시킨 후 물 또는 methanol을 4배 첨가하여 3분간 추출하고 syringe filter (0.45  $\mu$ m, nylon membrane, Corning, USA)로 여과한 것을 시료로 이용하였다. 또한 genistein, daidzein은 Sigma (St Louis, Mo, USA)에서 puerarin (98 %)은 INDOFINE Chemical Company (Hillsborough, NJ, USA)에서 기타 이소플라본배당체들은 (주) 정식품에서 제공받아 DMSO에 녹여 시료로 사용하였다. Puerarin의 화학적 구조는 Fig. 1과 같다.

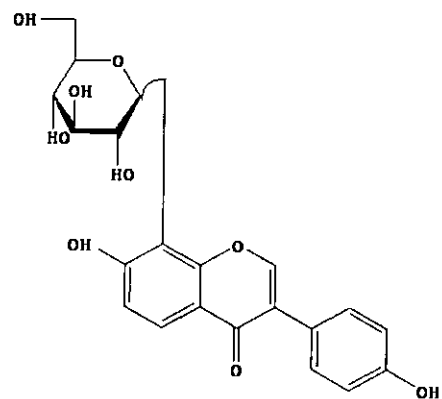


Fig. 1 Chemical structure of puerarin.

산 가수분해한 갈근의 이소플라본 분석방법은 Standard operation protocol (2001)에 따라 측정하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

**Table 1. HPLC conditions for analysis of *Puerariae Radix***

Item	Condition
Column	RP-C18
Detector	UV
Mobile phase	Solvent A : Solvent B : Solvent C ( 1.5 : 0.5 : 8 → 6 : 3 : 1 → 1.5 : 0.5 : 8 )
Flow rate	0.5 ml/min
Wavelength	255 nm

\* Solvent A - 100 % Methanol  
 Solvent B - 0.2 M Acetate buffer (pH 4.0)  
 Solvent C - 100 % Acetonitrile

### 3. 탄수화물 및 지방 소화효소 저해활성

#### 1) 탄수화물 소화효소 저해활성

탄수화물 소화효소 저해활성은 Watanabe (1997)와 Kim (2000)등의 방법에 따라 rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase 또는 porcine pancreatic amylase (100 U, Sigma)을 이용하여 측정하였다. 시료 10  $\mu$ l와 탄수화물 소화효소 50  $\mu$ l를 혼합 한 다음 실온에서 5 분간 반응시켰다. 5 mM  $p$ -nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (0.1M phosphate buffer, pH 7.0) 50  $\mu$ l를 첨가하여 탄수화물 소화효소에 의해 유리된 para-nitrophenol의 양을 측정하였다. Positive control로는 acarbose를 이용하였다. 탄수화물 소화효소의 저해 활성 계산식은 아래와 같다.

Inhibitory activity(%) =

$$\left( 1 - \frac{Abs_{sample\ after} - Abs_{sample\ before}}{Abs_{control\ after} - Abs_{control\ before}} \right) \times 100$$

#### 2) 지방 소화효소의 저해활성

Pancreatic lipase에 대한 시료의 저해활성은 4-MU oleate를 기질로 하는 Kawaguchi (1997)등의 방법에 따라 측정하였다. 시료 10  $\mu$ l에 0.1 mM 4-MU oleate 100  $\mu$ l 및 McIlvaine buffer (0.1 M  $Na_2HPO_4$ ) 60  $\mu$ l을 혼합하였다. 그 다음으로 lipase (1 U/ml) 30  $\mu$ l첨가하여 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 0.1 N HCl 1ml와 0.1 M Sodium-citrate 2 ml을 첨가하였다. Lipase에 의해 가수 분해된 4-methylumbelliferone의 양을 형광광도계를 이용하여 excitation wavelength 320 nm, emission wavelength 450 nm에서 측정하였다. 지방 소화효소의 저해 활성 계산식은 아래와 같다.

Inhibitory activity (%) =

$$\left( \frac{1 - Fluorescence_{sample}}{Fluorescence_{solvent}} \right) \times 100$$

### 4. Glucose uptake assay

분화를 유도한 지방세포 3T3-L1를 DMEM (FBS free)에서 37°C, 5 %  $CO_2$  incubator에 3시간 배양하여 절식을 시켰다. 그 후 Krebs Ringer Phosphate buffer (KRP buffer; 128 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.65 mM  $CaCl_2$ , 2.5 mM  $MgSO_4$ , 5 mM  $NaHPO_4$ , pH 7.4)로 세척한 다음 시료와 함께 30분간 배양하였다. 1  $\mu$ M insulin과 1 mM glucose와 0.1 Ci 2-Deoxy-D-[1- $^3H$ ] glucose을 첨가하여 반응시킨 후, lysis buffer (1 % Triton X-100)로 세포막을 분해하였다. Aqueous counting scintillant cocktail (Amersham, USA)과 혼합하여 Liquid Scintillation Counter (Beckman Co. USA)으로  $^3H$ 의 방사능을 측정하였다.

### 5. 지방세포분화

지방세포는 3T3-L1 (mouse preadipocyte, ATCC, CL-173)로 DMEM (10 % FBS)배지에서 배양하였다. 지방세포분화 유도는 preadipocyte에 분화촉진인자들을 첨가하여 수행하였으며 분화된 세포내 lipid droplet을 Oil-red O로 염색하여 측정된 lipid의 양을 정량하였다 (Qiu et al, 2001; Cho et al, 2003)을 변형하였다. 즉 미분화된 3T3-L1세포를 6 well plate(Corning, USA)에  $4.5 \times 10^5$  cells/well 로 분주한 다음 5일간 preincubation 하였다. 5일 후 분화촉진인자인 IBMX- DEX cocktail (0.5 mM IBMX, 1  $\mu$ M DEX)로 바꾸어 주고 0.1 % insulin을 첨가하였다. 2일간 배양한 후 0.1 % insulin이 첨가된 배지에 puerarin을 0, 10, 50, 100  $\mu$ M로 투여하여 6일간 배양을 하였다. 8일 후 3 % formaldehyde으로 세포를 고정한 다음 0.3 % Oil-red O 용액으로 세포내 lipid droplet을 염색하였다. 염색된 지방세포를 현미경으로 관찰하거나 4 % Nonidet P-40을 첨가하여 세포를 파쇄시켜 유출된 Oil red O를 microplate reader (model 550, Bio rad, Hercules, California, USA)로 490 nm에서 측정을 하였다.

6. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ )의 mRNA발현

RNeasy mini kit (QIAGEN, Germany)를 이용하여 지방세포의 RNA를 추출한 다음 total RNA 5  $\mu$ g에 first-strand buffer, 1 mM dNTP, 20 pmole oligo (dT) primer, M-MLV reverse transcriptase (200 U), 10 mM DTT, RNase inhibitor (20 U), 탈이온수를 넣고 혼합하여 PCR기기 (HBPX220, Thermohybrid, UK)로 cDNA를 합성하였다. 합성된 First cDNA를 증폭시킨 다음 2 % agarose gel에서 분리하여 발현된 mRNA의 양을 이미지 분석하였다. PPAR- $\gamma$ 와 GAPDH의 primer는 Fu (2003)의 방법에 따라 제작하였으며 염기배열 순서는 Table 1과 같다. 또한 Real time PCR은 ABI protocol에 의해 수행하였으며 방법은 다음과 같다. 96 well plate에 Taqman Universal PCR master mix와 specific primer (forward, reverse 2 pmoles), probe, 탈이온수를 혼합한 다음, 60 ng cDNA 첨가 또는 무첨가를 하여 real time PCR 기기 (ABI PRISM 7000, Applied biosystem, USA)로 분석하였다.

Table 2. The primer/probe sequences for PCR of 3T3-L1 genes

Target mRNA	Primer /Probe	Sequences
PPAR- $\gamma$	Forward	5'-AGTGGAGACCGCCCAGG-3'
	Reverse	5'-GCAGCAGGTGTCTTGGATGT-3'
	Probe	5'-TTGCTGAACGTGAAGCCCATCGA-3'
GAPDH	Forward	5'-TCACTGGCATGGCCTTCC-3'
	Reverse	5'-GGCGGCACGTCAGATCC-3'
	Probe	5'-TTCCTACCCCCAATGTGTCCGTCG-3'

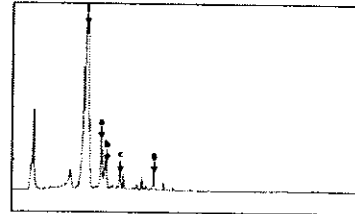
결과 및 고찰

1. 갈근의 이소플라본 함량분석

산 가수분해한 갈근에 이소플라본의 함량을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 갈근추출물에는 puerarin이 90.22 %로 가장 높은 함량을 보였으며 다음으로는 5.61 % daidzin, 2.95 % glycitin, 0.62 % genistin, 0.60 % daidzein순으로 나타났다. 가장 많은 함량을 보이고 있는 puerarin은 갈근의 주 이소플라본으로 Han (1998)등에 의해 보고되었으며, 이는 본 결과와

일치하였다. 이러한 puerarin은 사람의 장내 박테리아에 의해 daidzein으로 대사되는 것으로도 보고되고 있다 (Han et al., 1998).

A.



B.

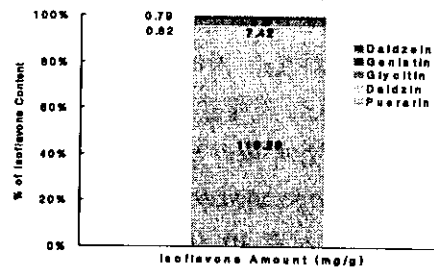


Fig 2. Contents of isoflavones of Puerariae Radix.

HPLC chromatogram of Puerariae Radix at 255nm (A). a, Daidzin; b, Glycitin; c, Genistin; d, M-daidzein; e, M-glycitin; f, A-glycitin; g, daidzein; h, Glycitein; i, Genistein; j, Puerarin. Isoflavones contents in Puerariae Radix (B).

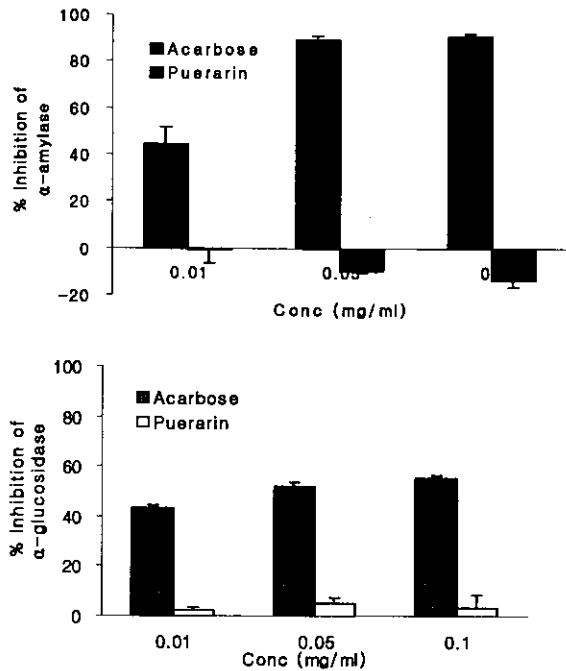
2. 갈근 및 puerarin의 소화효소 활성 억제능 평가

갈근과 그것의 주 이소플라본인 puerarin에 대한  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase 및 pancreatic lipase 등 소화효소 저해활성을 평가한 결과는 Table 3, Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 갈근의 물 추출물과 메탄올 추출물 모두 탄수화물 및 지방소화 효소에 저해 활성이 거의 미미한 것으로 나타났으며, puerarin 역시 탄수화물 소화효소 저해활성이 낮은 수준으로 나타났다. 이는 갈근 및 갈근의 주 이소플라본인 puerarin의 항당뇨 활성이 탄수화물 소화효소 활성억제와 연관성이 있을 것이라는 예상과 다르게 나타났으므로 항당뇨 효과는 다른 기전을 통하여 이루어 질 것이라고 추정된다.

Table 3. Inhibitory activities of water and methanolic extracts of Puerariae Radix against carbohydrate- (0.25 mg/ml) and lipid- (0.5 mg/ml) digesting enzymes

Digestive enzymes	Water ext.	MeOH ext.
$\alpha$ -amylase	35.75 $\pm$ 2.11	13.74 $\pm$ 1.64
$\alpha$ -glucosidase (from rat intestinal)	25.47 $\pm$ 7.68	-5.15 $\pm$ 5.15
Pancreatic lipase	-23.07 $\pm$ 5.56	43.09 $\pm$ 0.08

갈근(葛根)으로부터 분리된 puerarin의 항당뇨 효과

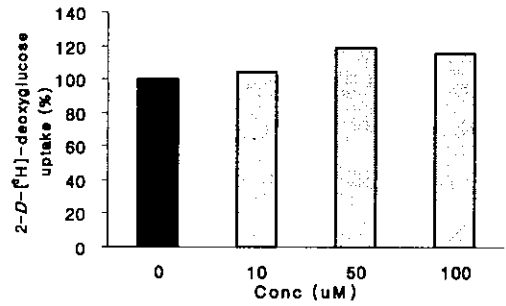


**Fig. 3** Inhibition of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase and rat intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity by puerarin.

\* The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments

3. Puerarin에 의한 glucose transport 활성변화

제2형 당뇨병의 원인은 인슐린 저항성에 의한 것으로 이를 치료하기 위해 경구 혈당제를 이용하여 탄수화물의 흡수를 제한하는 방법, 인슐린 분비를 촉진하는 방법 그리고 인슐린 감수성을 촉진하여 세포내로의 포도당 흡수를 유도하는 방법 등이 있다 (Zhang et al., 2000, Bailey, 1999). Puerarin이 일차적으로 탄수화물의 흡수에 대해서는 저해활성이 거의 없는 것으로 나타났으므로 인슐린감수성에 대해 어떠한 영향을 미치는지에 대해 알아보기로 하였다. 세포내로의 포도당 흡수에는 GLUT계가 관련되어 있는데 특히 GLUT1 과 4가 주로 작용하는 것으로 보고되고 있으며 이들은 주로 지방세포와 근육 세포에 활발한 활성을 나타내므로 본 연구에서는 마우스의 지방세포인 3T3-L1세포를 이용하였다(Proietto, 1999). Puerarin에 의한 세포내로의 glucose uptake활성을 확인한 결과, Fig. 4와 같으며 puerarin 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났으므로 puerarin은 세포의 인슐린감수성을 증가시켜 glucose의 흡수를 촉진하며, 따라서 항당뇨 물질로서의 가능성이 있는 것으로 사료된다.



**Fig. 4** Puerarin stimulated intercellular lipid accumulation and glucose uptake in a dose-dependent manner.

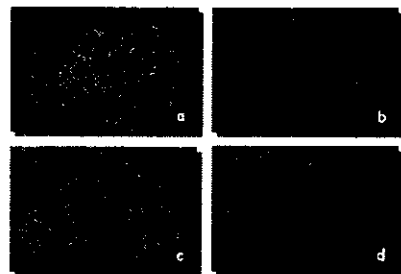
3T3-L1 cells were serum-starved for 3 hour and pretreated with 0.1 % DMSO vehicle or puerarin for 15 minutes. Cells were then left stimulated with 100 nM insulin for 10 minute and assayed for  $^3\text{H}$  2-deoxy-D-glucose uptake in the presence of vehicle or puerarin

\* The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments

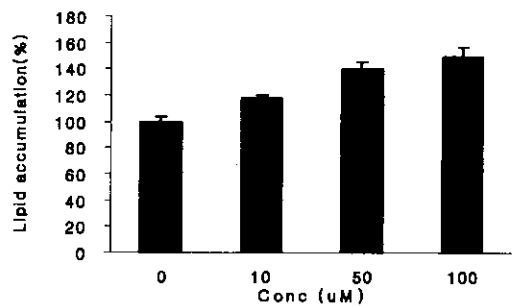
4. Puerarin의 지방세포 분화유도능

Puerarin에 의한 glucose uptake의 활성을 확인하는 또 다른 방법으로 지방세포의 분화능을 평가하였다. 지방세포의 분화는 세포내로의 glucose 흡수능과 관련이 되어 있으며 분화의 뚜렷한 증거로서 세포내 TG의 축적이 나타나기 때문에 항당뇨 및 항비만 활성 재료로 주로

A.



B.



**Fig. 5** The effect of puerarin on adipocyte differentiation in cells cultured in presence of insulin.

Morphological changes in the state of differentiation were photographed based on staining cellular lipid deposition by Oil red O (A), which was expressed as fold increase compared with untreated cells (B).

이용된다. 분화가 유도된 정도에 따라 축적된 TG의 정도를 육안으로 확인하기 위해 Oil red O로 염색하여 현미경으로 관찰한 결과 10, 50, 100  $\mu$ M의 puerarin에 의해 117, 140, 149 % 씩 각각 농도 의존적으로 TG가 축적되는 것으로 나타났다 (Fig. 5).

5. 이소플라본의 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$ (PPAR- $\gamma$ ) 발현에 미치는 영향

지방세포의 분화를 나타내는 또 다른 지표로 분화된 지방세포에서 특이적으로 발현되는 단백질인 PPAR- $\gamma$ 와 C/EBP가 있다 (Darlington et al., 1998). 특히 분화의 후기단계에 오면 PPAR- $\gamma$ 가 발현되면서 많은 종류의 지방세포-특이성 mRNA 즉, PEPCCK나 aP2등의 전사활성화를 유도하게 된다. 이러한 PPAR  $\gamma$ 의 mRNA 발현이 puerarin에 의해 어떻게 조절되는지 알아보고자 real-time PCR과 RT-PCR을 수행 한 결과는 Fig. 6와 같다. Puerarin 처리 시 농도 의존적으로 PPAR- $\gamma$ 의 mRNA가 증가하는 것으로 나타났으며 100  $\mu$ M puerarin에 의해서는 PPAR- $\gamma$ 가 3.0배 증가하였다.

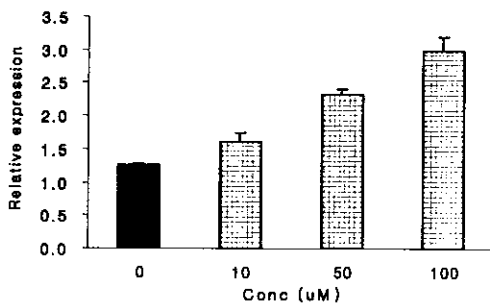
적 요

본 연구에서는 갈근 및 그의 주 이소플라본인 puerarin의 활성을 세포 수준에서 분석하였다. 먼저 갈근에 함유된 이소플라본의 양을 분석한 결과, puerarin이 총 이소플라본의 90 % 차지하였다. 다음으로는 puerarin의 항당뇨 활성을 검정한 결과 먼저 탄수화물 및 지방산화효소 저해활성에 대해서는 거의 미비한 것으로 나타났으나 인슐린 감수성 및 지방세포의 분화의 유도에 대해서는 농도 의존적으로 작용하는 것으로 관찰되었다. 따라서 puerarin은 지방조직내로 포도당의 흡수를 촉진함으로써 항당뇨 효능을 발휘하는 것으로 추정된다.

사 사

본 연구는 농림기술개발사업(204004-03-2-HD110, 2004) 연구비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

A.



B.

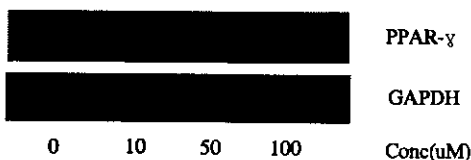


Fig. 6 The effect of puerarin on PPAR $\gamma$ -mRNA expression in 3T3-L1 cells as measured by real-time PCR and semi-quantitative RT-PCR analysis.

\* The values were calculated as a % of control cells treated with DMSO as a vehicle and expressed as the mean  $\pm$  SD of triplicate experiments

참고문헌

1. Kim, D. H., Yu, K. U., Bae, E. A. and Han, M. J. (1998) Metabolism of puerarin and daidzin by human intestinal bacteria and their relation to in vitro cytotoxicity. *J Biol. Pharm. Bull* 21: 628-30
2. Bailey, C. J. (1999) Insulin resistance and antidiabetic drugs. *J. Biochem. Pharmacol.* 58: 1511-20
3. Zhang, B. B. and Moller D. E. (2000) New approaches in the treatment of the type 2 diabetes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 461-67
4. Proietto, J. (1999) Nutrient-induced insulin resistance. *Mol. Cell. Endocrinol.* 151: 143-49
5. Gregoire, F. M., Smas, C. M., and Sul, H. S. (1998) Understanding adipocyte differentiation. *Physiol. Rev.* 78: 783-809
6. Darlington, g. J., Ross, S. E. and MacDougald, O. A.

- (1998) The role of C/EBP genes in adipocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* 273: 30057-60
7. Barzilay, J. I., and Freedland, E. (2003) Inflammation and its relationship to insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, and endothelial dysfunction. *Metabolic Syndrome and Related Disorders* 1: 33-45
  8. Hsu, F. L., Liu, I. M., Kuo, D. H., Chen, W. C., Su, H. C., and Cheng, J. T. (2003) Antihyperglycemic effect of puerarin in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* 66: 78-92
  9. Song, X. P., Chen, P. P., and Chai, X. S. (1988) Effects of puerarin on blood pressure and plasma renin activity in spontaneously hypertensive rats. *Zhong Yao* 9: 55-58
  10. Kim, J. S., Kwon C. S., and Son K. H. (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by Luteolin, a flavonoid. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 2458-61
  11. Watanabe, J., Kawabata, J., Kurihara, H., and Niki, R. (1997) Isolation and identification of alpha-glucosidase inhibitors from Tochu-cha(*Eucommia ulmoides*). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 177-78
  12. Kawaguchi, K., Mizuno, T., Aida, K., and Uchino, K. (1997) Hesperidin as an inhibitor of lipase from porcine pancreas and *Pseudomonas*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 102-104
  13. Qui, Z. (2001.) DNA synthesis and mitotic clonal expansion is not a required step for 3T3-L1 preadipocyte differentiation into adipocytes. *J. Biol. Chem.* 276: 11988-95
  14. Cho, K. J., 2003. Alpha-Lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating Pro-adipogenic transcription factor via mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol. Chem.* 278: 34823-33
  15. Fu, J., Gaetanl, S., Ovelsl, F., Verme, J. L., Serrano, A., Piomell, D. (2003) Oleylethanolamide regulates feeding and body weight through activation of the nuclear receptor PPAR- $\alpha$ . *Nature* 425: 90-3