

동백잎 추출물의 신생혈관 및 세포부착 억제작용과 그 기전

¹송민규 · ²서효진 · ^{3,4}문제학 · ^{3,4}박근형 · † ⁴김종덕
† 생명화학공학과 생명산업공학과, ¹동아대학교 의과대학 생화학연구실, ²(주)그린바이오텍,
³전남대학교 응용생물공학부 식품공학전공, ⁴전남대학교 항비만·건강연구소
(접수 : 2007. 5. 23., 게재승인 : 2007. 8. 3.)

Anti-angiogenic and Anti-cell Adhesion Effects and Their Mechanism with the Extract of *Camellia japonica* Leaf

Min-Gyu Song¹, Hyo-Jin Seo², Je-Hak Moon^{3,4}, Keun-Hyung Park^{3,4}, and Jong-Deog Kim^{† 4}

† Department of Biotechnology Chonnam National University, Yosue, Chonnam 550-749, Korea

¹Lab. of Biochemistry, College of Medicine, DongA University, Dongdaesin-Dong, Seogu, Busan 602-714, Korea

²Green Biotech Co., Ltd., Chonnam Biotechnology Center, Dongsudong 15-1, Naju, Chonnam 520-330. Korea

³Department of Food Science and Technology and Funtional Food Research Center,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

⁴Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Yosue, Chonnam 550-749, Korea

(Received : 2007. 5. 23., Accepted : 2007. 8. 3.)

Anti-angiogenesis and anti-cell adhesion effects were investigated with different dose of *Camellia japonica* leaf (CJL) extract for applying anti-cancer, anti-metastasis and anti-obesity. Cytotoxicity on HUVECs was very low at 200 ug/mL of CJL-extract. Anti-angiogenic ratio at increasing dose of 1.5 ug/mL, 3.0 ug/mL, 15 ug/mL and 30 ug/mL was showed 30.7%, 38.5%, 53.8%, and 70.0%, respectively. Also, anti-cell adhesion effect at concentration of 50 μ g/well, 100 μ g/well and 200 μ g/well was expressed on E-selectin by 46.7%, 66.7%, and 86.76%, on VCAM-1, 23.0%, 61.5%, and 84.6%, and on ICAM-1, 11%, 55.5%, and 88.8%, respectively. For inquiring anti-angiogenesis mechanism, when western blot was performed with different dose of CJL extract, signal molecules of VEGFR-2, β -catenin and PI3-K were suppressed. As the signal transduction from VEGFR-2, β -catenin and PI3-K to NF-kB was interrupted, angiogenesis could not be occurred causing not activated NF-kB. *C. japonica* leaf (CJL) is a useful herb for developing therapeutics of angiogenesis related diseases such as cancer, metastasis, rheumathoid arthritis and obesity.

Key Words : *Camellia japonica* leaf (CJL), angiogenesis, cell adhesion, signal molecules, anti-obesity

서론

신생혈관 생성 (angiogenesis)은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고 있는 내피세포의 이동과 세포 간 장벽 (extracellular matrix: ECM)을 통과하는 침윤, 증식, 혈관으로의 분화, 새로운 ECM의 형성, 평활근세포의 관여 등 복잡하게 이루어지며, 이에 대한 유도물질과 억제물질간의 균형에 의하여 정교

하게 조절되는 것으로 알려져 있다(1). 생리적 상태의 신생혈관 생성은 태아의 발생, 여성의 월경 및 국소의 산소부족에 따라 한시적으로 일어날 수 있으며, 병리적으로는 암, 당뇨병성 망막염, 류마티스성 관절염 등에서 혈관의 과잉 증식으로 나타난다(2, 3). 허혈성 질환이나 골절 등에서는 혈류의 공급이 원활하지 못하여 치료성 신생혈관이 활용되고 있다(4).

또한 신생혈관은 상처의 치유나 종양의 성장 과정에서 영양분과 산소의 공급 및 노폐물의 제거를 위한 필수적인 과정이다. 특히 악성 종양의 신생혈관은 종양세포의 성장과 전이를 결정짓는 중요한 요소이며, 많은 종류의 악성 종양에서 신생혈관 생성의 정도는 종양의 진행 및 전이와 관계가 있다고 알려져 있다(5-8). 신생혈관 생성의 정도는 혈관 형성 촉진인자와 혈관형성 억제 인자, 단백질효소

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, Dun-Duk Dong, Yosue, Chonnam 550-749, Korea

Tel & Fax : +82-61-659-3305

E-mail : pasteur@chonnam.ac.kr

와 단백분해효소의 억제제, 부착분자 등에 의해 결정된다. 즉 이러한 인자들의 상대적인 발현 정도에 의해 혈관생성의 정도가 결정되는데, 정상조직에서는 혈관형성 억제인자와 단백분해효소 억제제의 발현이 혈관형성 촉진인자 발현을 압도하므로 신생혈관 생성은 매우 드물게 일어난다. 이에 비하여 종양의 신생혈관 생성은 종양세포에서 분비되는 혈관형성 촉진인자 발현의 증가와 혈관형성 억제인자 발현의 감소로 조절되는 과정이다(9, 10). 현재까지 20가지 이상의 혈관형성 촉진인자가 알려졌으며, 그 중 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다(10-12).

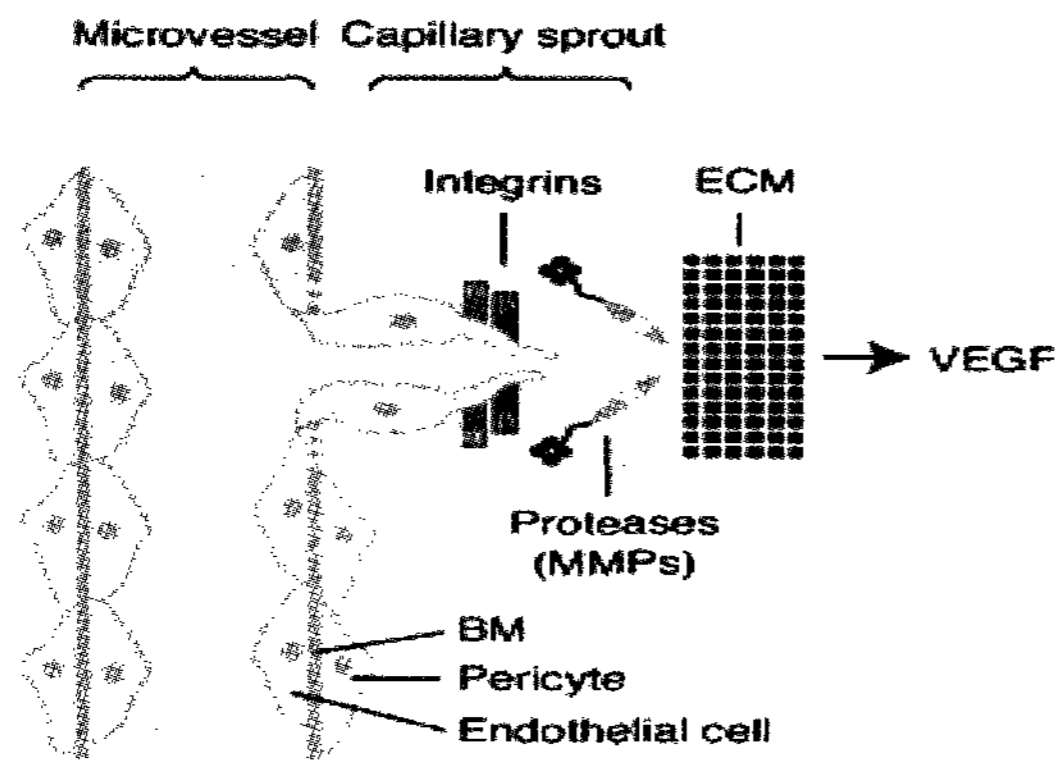


Figure 1. Initial stages of angiogenesis.

VEGF는 혈관투과인자 (vascular permeability factor)로도 알려져 있으며, 그의 수용체인 VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR)와 결합하여 내피세포의 증식을 유발하고 혈관 투과성을 증가시켜, Fig. 1과 같이 종양의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다(11, 12). 혈관내피세포 증식을 억제하여 종양 내의 신생혈관과 종양의 성장 및 전이를 억제하는 인자로 angiostatin(13)과 endostatin(14) 등이 알려져 있다. 그 중 angiostatin은 플라스미노젠 (plasminogen)의 한 부분으로서 바탕질 금속 단백분해 효소 (matrix metalloproteinase, MMP)를 포함한 여러 종류의 단백분해효소의 작용에 의해 플라스미노젠으로부터 형성된다(12). 혈관내피세포는 많은 질병 상태의 진행은 물론 생체조직의 정상적인 생리기능의 유지에 밀접한 관련되어 있으며, 체내에 들어오는 여러 가지 물질들이 가장 먼저 만나는 세포이기 때문에, 약효 성분이나 질병 유발물질을 검색에 매우 중요하게 다뤄지고 있다(15). 혈관내피세포는 혈관의 기능은 물론 새로운 혈관의 형성, 즉 신생혈관을 주도하는 주요 세포이기도 하다(16). 특히 암의 증식과 전이는 신생혈관을 억제함으로써 감소시킬 수 있다. 따라서 신생혈관을 억제하는 물질은 신생혈관에 관련된 여러 가지 질병 치료에 이용될 수 있다(17).

동백나무 (*C. japonica*)는 차나무과의 식물로서 우리나라는 물론 중국에도 자생하고 있다. 우리나라에서는 주로 남쪽의 섬 지방에 분포하나 해류의 영향으로 서해는 경기도 용진군 백령면의 대청도까지 올라가고 동해로는 경남 울산군 온산면의 목도까지 분포한다. 또한 약리적 효과로 동

백나무 잎은 건선, 인후통증, 화상에 효능이 있고 가지와 열매는 머리비듬, 보혈, 비출혈, 어혈, 여골증, 월경이상, 이뇨, 인후통증, 장출혈, 종독, 출혈, 타박상, 토혈과 각혈, 행혈, 화상에 효능이 있다고 알려져있다(18). 동백에 대한 연구로는 일본의 경우 산차라 하여 꽃 말린 것으로 민간에서 토혈증에 사용한다는 보고가 있으며(19), 알콜흡수억제(20) 등이 보고되고 있다. 또한 Fujita 등(21)은 camellin L-pi-pecolic acid 및 eugenol의 화합물을 분리 확인한 바 있다. 본 연구는 태반내피세포의 배양계를 이용하여 신생혈관 생성과 혈관내피세포 증식 및 세포 부착 등에 대한 동백잎 추출물의 억제효과를 실험하였다.

재료 및 방법

세포의 배양

Cell은 HUVECs를 Young Science (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였고, 배양은 T75 플라스크를 사용하였고, EBM-2 배지 (Cambrex, Hopkinton, MA, USA)는 hydrocortisone, epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), vascular endothelial growth factor (VEGF), ascorbic acid, heparin과 2% fetal bovine serum (FBS)을 넣어 사용하였으며, 37℃, 5%의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

시료의 추출

동백잎의 추출성분은 전남대학교 응용생물공학부 식품공학전공으로부터 제공받은 것과, 또한 여수시 동백골 인근 야산에서 채취한 것을 열수 추출하여 동결건조한 후 시료로 사용하였다.

시료의 독성 시험

HUVECs을 24 well plate당 4 × 10⁴씩 분주하여 배양한 후 세포가 충분히 자라면 농도별로 동백잎 추출물을 처리하고, 다시 37℃, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여, trypsin-EDTA로 처리후 hemocytometer를 사용하여 살아있는 세포의 수를 헤아려 대조군과 비교하여 독성의 여부를 판단하였다.

신생혈관 생성억제 시험

Angiogenesis 시험은 24 well-plate (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)에 150 μl의 matrigel (Becton/Dikinson, Becton, NJ)을 넣어 고체화시킨 후 각 well당 2.5 × 10⁴개의 세포를 넣어 세포가 부착한 후 동백잎 추출물을 농도별로 투여하고 3시간 후 tube가 형성되면 불규칙적으로 5편을 선택하여 digital camera (Nikon, coolpix 4500)를 이용하여 촬영하고 NIH program을 이용하여 형성된 tube의 길이를 측정하여 anti-angiogenesis 효과를 판단하였다(22).

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)법에 의한 세포부착 활성 측정

HUVECs을 96 well에 well당 5 × 10³개의 cell이 되도록

분주하여 2% FBS 첨가한 EBM-2 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂-incubator에서 배양하여 최고조에 도달하도록 배양하였다. 동백잎 추출물의 농도를 25, 50, 100 및 200 µg/well이 되게 첨가하고 20시간 배양한 후, PBS (phosphate buffered saline)로 세척 후 세포부착 인자를 유도하기 위하여 IL-1β (Endogen, Woburn, MA, USA)를 5 ng/mL의 농도로 첨가하여 6시간 동안 반응시켰다. 배지 제거 후 1% paraformaldehyde를 첨가하고 실온에서 30분간 반응시켜 세포를 고정 시켰다. 30분 뒤 PBS + 0.5% Tween 20으로 두 번 세척하고, 10% FBS로 1시간 동안 blocking한 다음, 단일 클론 항체 (ICAM-1, VCAM-1 및 E-Selectin : BD Bioscience, Bedford, MA, USA)를 10% FBS가 첨가된 PBS에 각각 2, 5, 5 µg/mL 씩 녹여 2시간 동안 37°C에서 배양 후 PBS + 0.5% Tween 20으로 세척하고, secondary antibody (Donkey anti-mouse IgG-HRP: Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 10% FBS의 PBS에 1000배 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시키고, 발색시약 (western blotting luminol reagent: Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 첨가하고 1시간 동안 반응시킨 후 plate reader (UVM 340, ASYS, Austria)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다(22).

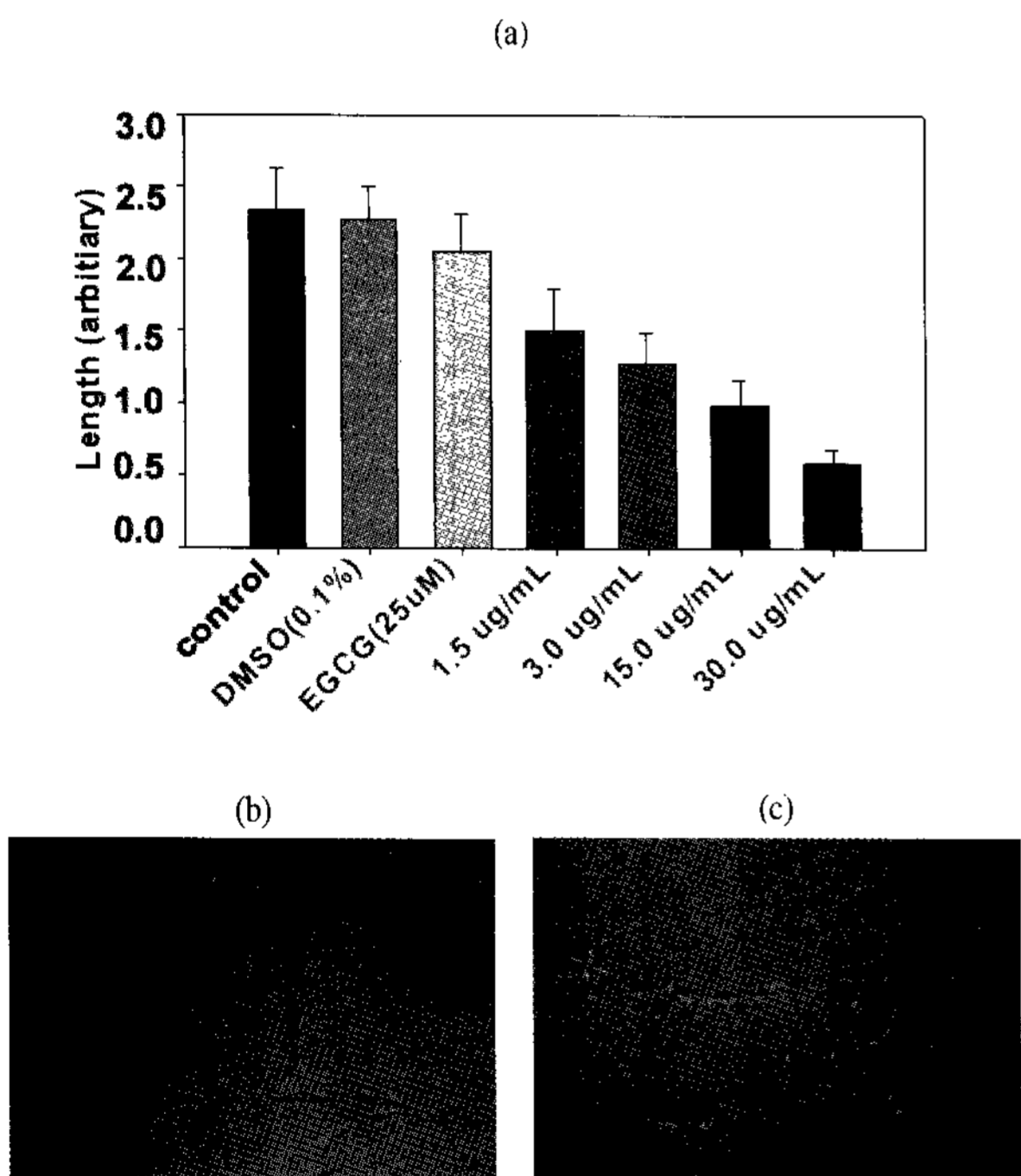


Figure 2. Anti-angiogenesis effect of water soluble component of *C. japonica* leaf with different fraction (a), and images of tube formation control (b), treated with extract of CJL (c).

Western blotting(23)

a) Chemical 처리 및 VEGF 자극

HUVECs을 100 mm petri dish에 1 × 10⁵으로 접종하여 배양한 후 최고조에 도달하면 serum 및 mitogen free의 EBM-2 배지로 세척하고, 다시 동일 배지를 넣은 다음 동백잎 추출물을 농도별로 처리하여 serum stavation을 overnight시킨 후 동일 배지로 2회 세척하고, VEGF (BD

Science, Bedford, MA, USA)를 50 ng/mL가 되게 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. phosphorylation을 방지하기 위하여 세포를 용해시키기 전 7분간 vanadate (100 µM)과 hydrogenperoxide (200 µM)을 첨가하였다. 그 후 즉시 세포를 냉각시킨 PBS + 0.1 mM Na₃VO₄로 세척하고 냉각시킨 lysis buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% Triton X-100, 1 mM vanadate, 1 mM EDTA, 1 mM FGTA, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40)를 첨가하고 20분간 4°C에서 반응시킨 후, scripper로써 세포를 회수하여 micro eppendorf tube로 옮겨서 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)을 사용하여 농도를 구한 후 VE-Cadherin antibody (BD Bioscience, Bedford, MA, USA)를 사용해 immunoprecipitation (IP)을 실시하였다.

IP는 500 µl (×2)의 IP buffer (0.2 mM sodium vanadate 첨가)를 넣고 단백질 200 µg과 25 µl의 anti-VE-Cadherin antibody를 첨가하고 total양을 1 mL이 되도록 H₂O를 첨가하여 vortex한 후 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후 25 µl의 Protein A/G-agarose (Amersham Science, Uppsia, Sweden)를 첨가한 후 4°C에서 30분간 반응 후 14,000 rpm에서 3분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 제거하고 IP washing buffer 500 µl를 사용하여 세척 후 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 50 µl의 4× Laemmli sample loading buffer를 첨가하여 95°C에서 5분간 끓인 후 sample을 7.5% SDS-PAGE gel로 전기영동 후에 0.2 um nitrocellulose membrane (Bio-Rad Lab. Hercules, CA, USA) 막으로 전이시켰다.

b) Protein 확인

Ponceau-S (Markham, Ontario, Canada) 시약으로 단백질을 확인하고 5%-NFDM (non-fat dry milk)로 실온에서 1시간 동안 blocking을 실시한 후 VEGFR2, PI3K, β-catenin, VE-cadherin (BD Bioscience, Bedford, MA, USA) 등의 primary antibodies를 각각 처리한 후, secondary antibody인 donkey goat HRP를 1 : 7000의 비율로 반응시킨 후 형광물질인 ECL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruze, CA, USA)을 이용해 film에 감광시키고 현상하였다. stripping은 50°C에서 10분간 행한 후 blocking을 실시하였다.

결과 및 고찰

신생혈관 생성 억제효과

동백잎의 추출물은 농도의 증가에 따라 현저한 신생혈관 생성억제 효과를 보였다(Fig. 2). 1.5, 3.0, 15 및 30 ug/mL로 농도가 증가함에 따라 각각 30.7%, 38.5%, 53.8% 그리고 70.0%의 억제율을 보였다. 또한 동백의 단일 구성성분으로 신생혈관 생성억제 효과를 실험한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. EGCG 25 uM을 positive control로 하여 보았을 때 rutin, 1,6-bis(4-hydroxybenzoate)-O-β-D-glucopyranoside, kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside, quercetin-3-O-α-D-arabinopyranoside, kaempferol-3-O-α-D-arabinopyranoside 등은 비슷한 효과를 나타내었으며,

또한 (+)-catechin과 quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside 등은 EGCG보다 나은 효과를 보였다. 동백잎은 쉽게 구할 수 있는 원료이기 때문에 항암, 암전이 억제, 류마치스성 관절염(2, 3) 및 항비만 제제(24-26) 등 그 응용도가 높을 것으로 판단된다.

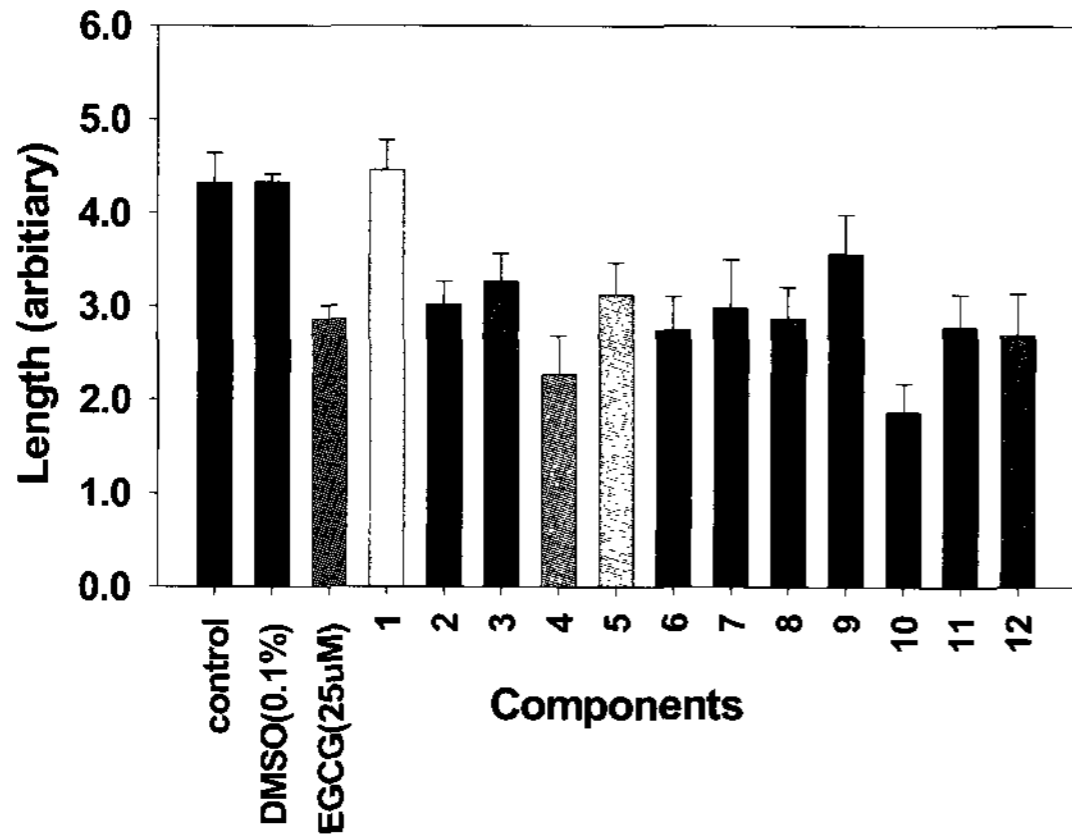


Figure 3. Anti-angiogenesis effect of identified component of *C. japonica*.

1. Naringenin-7-O-β-D-glucoside
2. Rutin
3. Kaempferol-3-O-rutinoside
4. (+)-catechin
5. (-)-epicatechin
6. 1,6-bis(4-Hydroxylbenzoate)-O-β-D-glucopyranoside
7. Phloridzin
8. Kaempferol-3-O-β-D-galactopyranoside
9. Kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside
10. Quercetin-3-O-β-D-galactopyranoside
11. Quercetin-3-O-α-D-arabinopyranoside
12. Kaempferol-3-O-α-D-arabinopyranoside

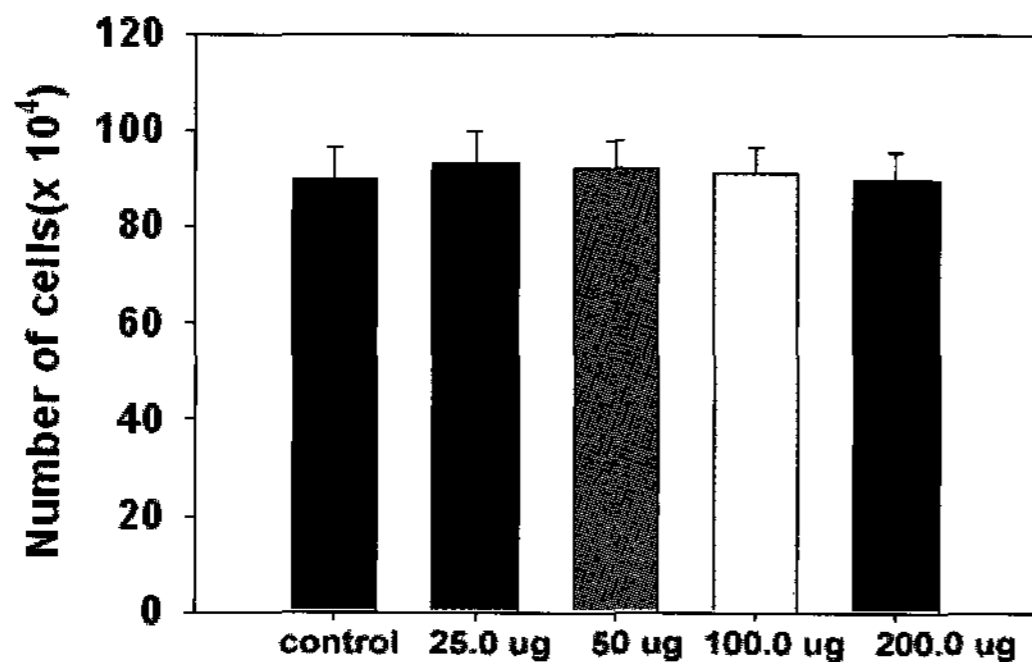


Figure 4. Cytotoxicity of *C. japonica* leaf with different concentrations.

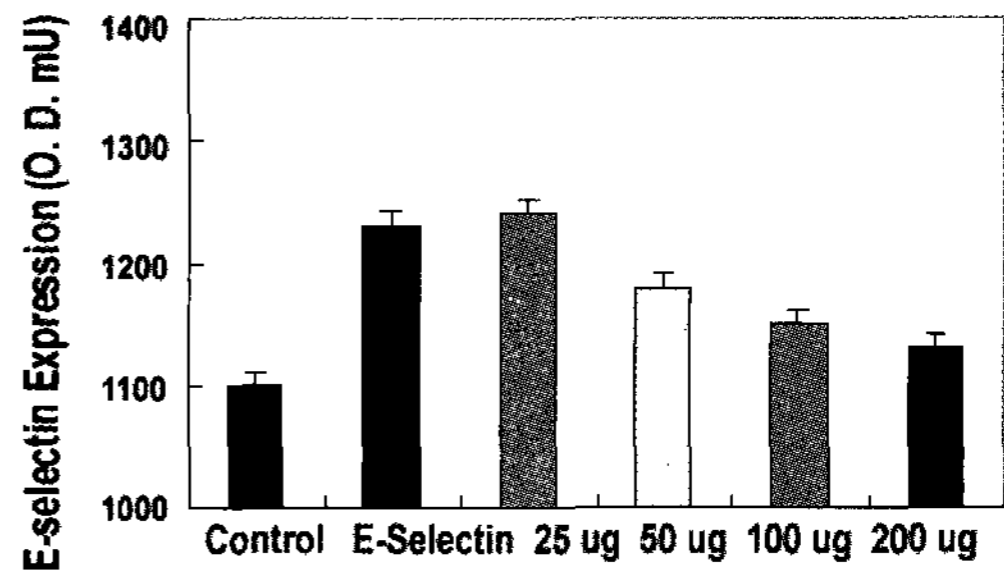
독성시험

동백잎 butanol 추출물이 신생혈관 생성억제 효과가 강하게 나타남으로써 이들 추출물에 대한 독성 시험을 HUVECs를 사용하여 검토한 바 Fig. 4와 같이 나타났다. 그래프에서 보는 바와 같이 동백의 추출물은 200 ug/well에서도 control과 비교하여 독성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 이것은 동백잎의 다양한 성분이 독성이 낮은 것으로 판단되며, 다양한 제제로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

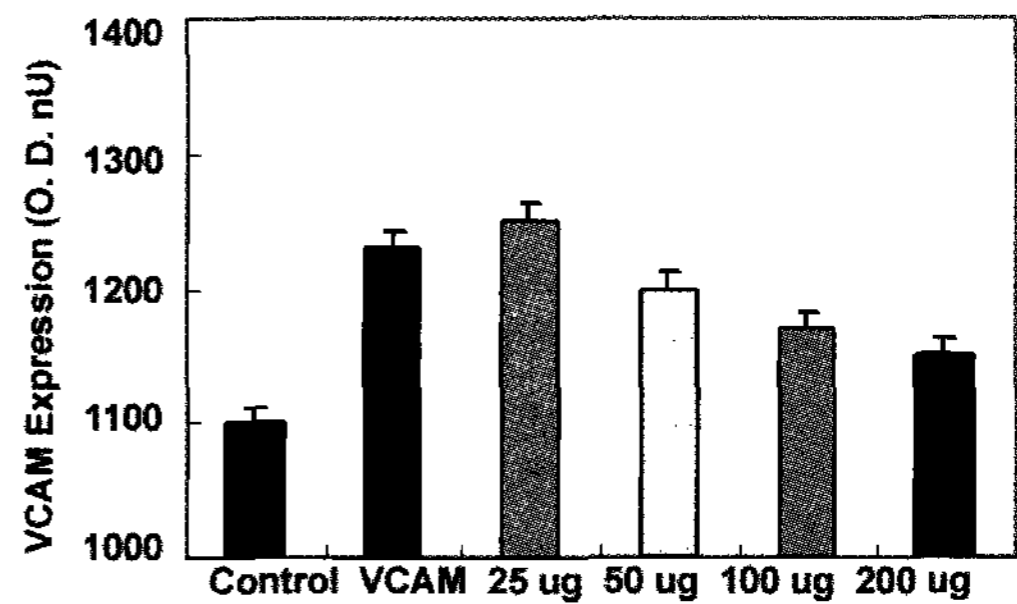
ELISA법에 의한 세포부착 억제작용

Cell adhesion 분자인 E-selectin, VCAM-1 및 ICAM-1들은

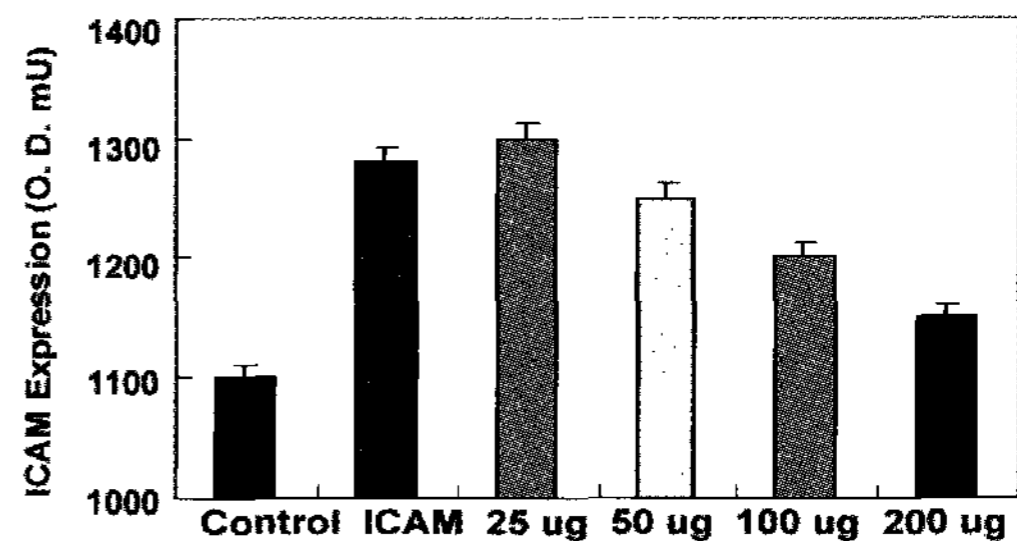
C. japonica leaf (CJL)의 성분 증가에 따라 발현이 감소되는 것으로 보아 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다(Fig. 5). E-selectin은 농도가 200 μg/well (86.76%)일 때 가장 높은 제해효과를 나타내었고, 100 μg/well (66.7%), 50 μg/well (46.7%)일 때 순차적으로 저해효과를 나타내었다. 그리고, cell adhesion 분자인 VCAM-1도 성분 증가에 따라 발현이 감소되는 것으로 보아 농도가 증가함에 따라 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다. 농도가 200 μg/well (84.6%)일 때 가장 높은 제해효과를 나타내었고, 100 μg/well (61.5%), 50 μg/well (23%)일 때 순차적으로 저해효과를 나타내었다. 또한, cell adhesion 분자인 ICAM-1 또한, 성분의 증가에 따라 발현이 감소되는 것으로 보아 농도가 증가함에 따라 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다. 추출물의 농도가 200 μg/well (88.8%)일 때 가장 높은 제해효과를 나타내었고, 100 μg/well (55.5%), 50 μg/well (11%)일 때 순차적으로 저해효과를 나타내었다.



(a)



(b)



(c)

Figure 5. Inhibition of endothelial cell adhesion molecules E-selectin (a), VCAM-1 (b) and ICAM-1 (c) expression by different dose of *C. japonica* leaf.

따라서, *C. japonica* leaf (CJL)은 cell adhesion을 저해시키는 물질로 판단되어, 항암 작용, 암전이 억제 등에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

Western blotting

Fig. 6에서 보듯이 *Camellia japonica* leaf (CJL) 추출물의 농도가 증가함에 따라 VEGFR2, PI3-K 및 β -catenin의 밴드가 약해지는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 각각의 신호전달 분자의 신호가 CJL에 의해 저해되어 발현이 약해지는 것을 의미하며, Fig. 7을 참조하면 신호가 차단됨에 따라 핵내의 전사인자인 NF- κ B를 활성화시키지 못함으로써 신생혈관의 형성이 저해되는 것으로 판단된다.

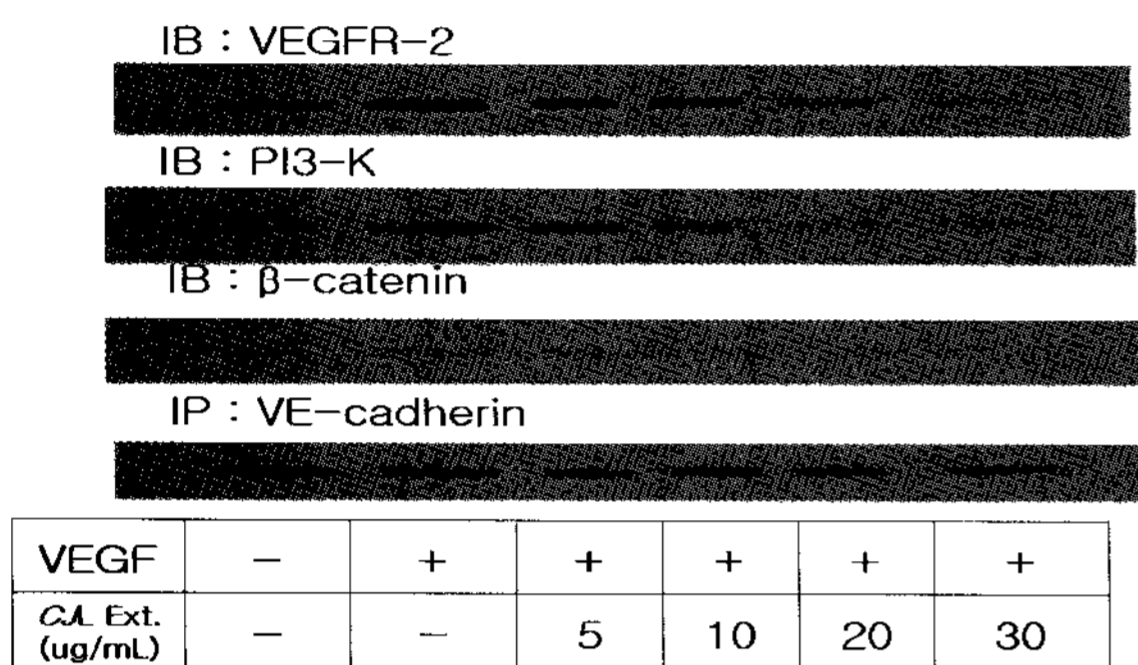


Figure 6. Expression of signal molecule VEGFR-2, PI3-K, and β -catenin treated with different concentrations of *C. japonica* leaf by western blot. VE-cadherin as a loading control.

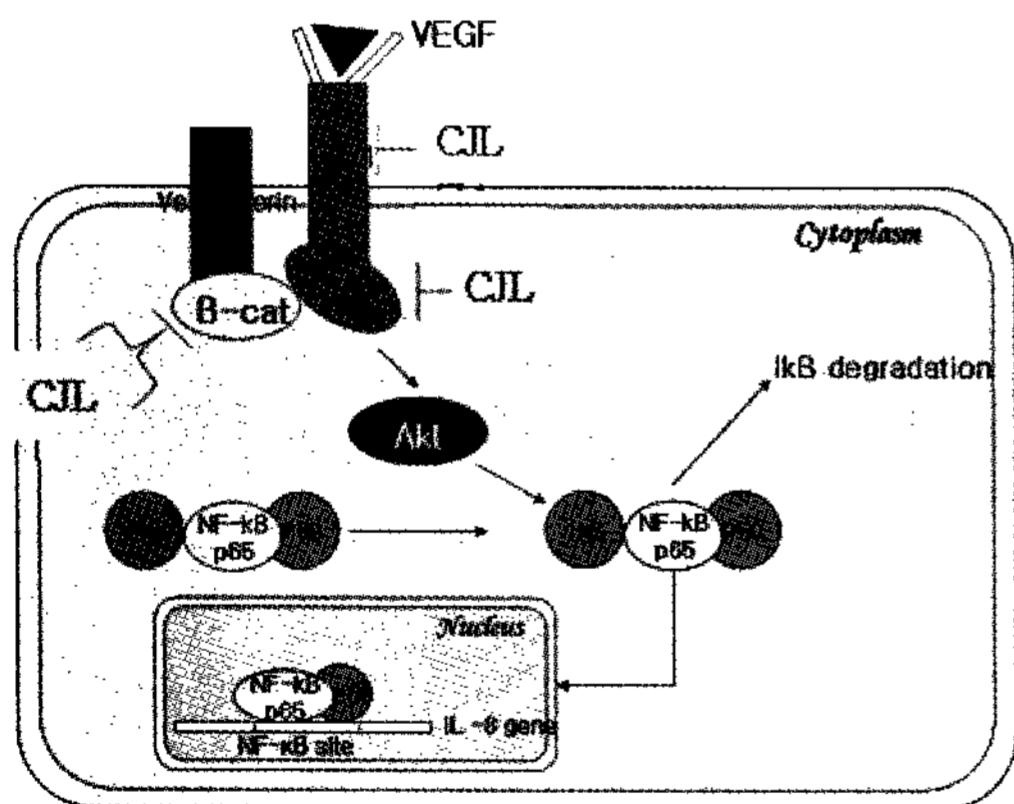


Figure 7. Signal pathway from VEGFR2, PI3K and β -catenin to NF- κ B, signal molecules are inhibited by *C. japonica* leaf. Angiogenesis is suppressed causing inactivation of NF- κ B blocked by signal molecules.

요 약

동백잎의 열수 추출물이 신생혈관 생성억제 효과가 강하게 나타남으로써 이들 추출물에 대한 독성 시험을 HUVECs를 사용하여 검토한 바는 200 ug/mL에서도 독성이 없는 것으로 나타났으며, 1.5, 3.0, 15 및 30 ug/mL으로 농도가 증가함에 따라 각각 30.7%, 38.5%, 53.8% 그리고 70.0%의 신생혈관 생성억제율을 보였다. 세포부착 저해효

과는 *C. japonica* leaf (CJL)의 농도가 50, 100, 200 μ g/well로 증가할 때 E-selectin이 46.7%, 66.7% 그리고 86.76%, VCAM-1이 23.0%, 61.5% 그리고 84.6%, ICAM-1이 11.0%, 55.5% 그리고 88.8%로 나타났다. *C. japonica* leaf (CJL)의 성분 증가에 따라 발현이 감소되는 것을 보아 농도가 증가함에 따라 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다. 신호전달의 기전규명은 western blot으로 행하였으며 CJL의 농도가 증가함에 따라 밴드의 발현이 약해지는 것을 관찰할 수 있다. 따라서 신호전달 분자인 VEGFR-2, β -catenin, PI3-K는 CJL에 의해 신호전달이 차단되는 것을 볼 수 있고, 이는 NF- κ B를 억제함으로써 신생혈관 생성을 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서 동백잎은 신생혈관 생성에 의존하고 있는 것으로 알려진 암 등의 치료와 암전이의 억제, 류마치스성 관절염, 그리고 항비만제제로서 개발될 수 있음을 시사한다.

REFERENCES

1. Folkman, J. and Y. Shing (1992), Angiogenesis, *J. Bio. Chem.* **267**(16), 10931-10934.
2. Folkman, J. and R. Cotran (1976), Relation of vascular proliferation to tumor growth, *Int. Rev. Exp. Path.* **16**, 207-248.
3. Folkman, J. and M. Klagsbrun (1987), Angiogenic factors, *Science* **235**, 442-447.
4. Jung, J. O. and D. K. Kim (2000), A method of medical treatment use angiogenesis, *The Korean Society for Vascular Surgery* **16**(2), 265-269.
5. Folkman, J. (1995), Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.* **1**, 27-31.
6. Fidler, I. J. and L. M. Ellis (1994), The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis, *Cell* **79**, 185-188.
7. Hanahan, D. and J. Folkman (1996), Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell* **86**, 353-364.
8. Weidner, N. (1995), Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer, *Am. J. Pathol.* **147**, 9-19.
9. O'Reilly, M. S. (1997), The preclinical evaluation of angiogenesis inhibitors, *Invest. New Drugs* **15**, 5-13.
10. Fox, S. B., K. C. Gatter, and A. L. Harris (1996), Tumor angiogenesis, *J. Pathol.* **179**, 232-237.
11. Leung, D. W., G. Cachianes, W. J. Kuang, D. V. Goeddel, and N. Ferrara (1989), Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen, *Science* **246**, 1306-1309.
12. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth (1997), The biology of vascular endothelial growth factor, *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
13. O'Reilly, M. S., L. Holmgren, and Y. Shing (1994), Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma, *Cell* **79**, 315-328.
14. O'Reilly, M. S., T. Boehm, and Y. Shing (1997), Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth, *Cell* **88**, 277-285.
15. Pugsley, M. K. and R. Tabrizchi (2000), The vascular system; An overview of structure and function, *J. Pharmacol. Toxicol. Mech.* **44**, 333-340.
16. Folkman, J. and M. Klagsberg (1987), Angiogenic factors, *Science* **235**, 442-447.
17. Griffioen, A. W. and G. Molema (2000), Angiogenesis: Potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular

- diseases, and chronic inflammation, *Pharmacol. Rev.* **52**, 237-268.
18. Lee, S. H. and S. K. Kim (1992), Natural distribution and characteristics of populations of *Camellia japonica* in Korea, *J. Korean Soc. Hort. Sci.* **33**, 196-208.
 19. Itokawa, H., H. Nakajima, A. Ikuta, and Y. Iitaka (1981), Two triterpenes from the flowers of *Camellia japonica*, *Phytochem.* **20**, 2539-2542.
 20. Yoshikawa, M., E. Harada, T. Murakami, H. Matsuda, J. Yamahara, and N. Murakami (1994), Camellia saponins B1, B2, C1 and C2, new type inhibitors of ethanol absorption in rats from the seeds of *Camellia japonica* L., *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 742-749.
 21. Fujita, Y., H. Fujita, and H. Yoshikawa (1973), Comparative biochemical and chemotaxonomical studies of the plants of Theaceae(I), Essential oils of *Camellia sasanqua* Thunb, *C. japonica* Linn., and *Thea sinensis* Linn, *Osaka kogyo Gijutsu Shikensho Kigo* **25**, 198-202.
 22. Kim, J. D., L. Liu, W. Guo, and M. Meydani (2006), Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion, *J. Nutrition. Biochem.* **17**, 165-176.
 23. Lim, J. K., H. J. Seo, E. O. Kim, M. Meydani, and J. D. Kim (2006), Identification of Anti-angiogenic and Anti-cell adhesion Materials from Enterobacteria of the *Trachurus japonicus*, *J. Microbiol. Biotech.* **16**(10), 1544-1553.
 24. Crandall, D. L., G. J. Hausman, and J. G. Karl (1997), A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives, *Microcirculation* **4**, 211-232.
 25. Poissonnet, C. M., A. R. Burdi, and F. L. Bookstein (1983), Growth and development of human adipose tissue during early gestation, *Early Hum. Dev.* **8**, 1-11.
 26. Wasseman, F. (1965), The development of adipose tissue in Handbook of physiology, Vol. 5, Renold A., E. Cahill G. F. eds. p7-100, Washington DC. American Society of Physiology.