

## 동백꽃 추출물의 신생혈관생성 및 세포부착 억제 효과

허인도<sup>1</sup> · 서효진<sup>2</sup> · 김종덕\*

전남대학교 생명화학공학과 생명산업공학과, 전남대학교 항비만 · 건강연구소, <sup>1</sup>인제대학교 의과대학 해부학연구실, <sup>2</sup>(주)그린바이오텍

Received June 29, 2007 / Accepted August 6, 2007

**Anti-Angiogenic and Anti-Cell Adhesion Effect of the *Camellia japonica* Flower Extract.** In Do Heo<sup>1</sup>, Hyo Jin SEO<sup>2</sup> and Jong Deog KIM\*. Department of Biotechnology, Research center on Anti-Obesity and Health Care, Chonnam National University, San96-1, Dun-Duk Dong, Yosu, Chonnam, 550-749, Korea, <sup>1</sup>Lab. of Anatomy, College of Medicine, Inje Univ. 633-165, Gaegum-Dong, Jingu, Busan, 614-735, Korea, <sup>2</sup>Green Biotech Co., LTD, Chonnam Biotechnology Center, Dongsudong 15-1, Naju, Chonnam, 520-330 -- The *Camellia japonica* flower(CJF) extract was studied for their anti-angiogenic and anti-cell adhesion effect. CJF-extract inhibited the tube formation on human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) with butanol extract by 70.2%, acetone extract by 54.2%, ethyl acetate extract by 37.0%, chloroform extract by 21.2%. Cell adhesion molecules were effectively suppressed at different concentration of CJF at 50, 100, 200 µg /well such as for intercellular adhesion molecule(ICAM) by 5.9%, 29.4% and 52.9%, for vascular cell adhesion molecule(VCAM) by 12.5%, 43.8% and 62.5%, for E-selectin by 7.1%, 21.4% and 35.7%, respectively. Signal molecules of vascular endothelial growth factor receptor 2(VEGFR2), β-catenin and PI3K are inhibited by different concentration of CJF at 10, 20 and 30 µg/mL with western blot. Angiogenesis will be inhibited with suppressing NF-κB molecule resulted in signal molecules blocked by CJF. CJF will be useful materials for treatment of angiogenesis related diseases such as cancer, metastasis, rheumathoid arthritis and obesity.

**Key words** – *Camellia japonica* flower, angiogenesis, cell adhesion, NF-κB, anti-cancer, anti-obesity

### 서 론

신생혈관생성(angiogenesis)은 암의 형성뿐만 아니라 초기 발생과정이나 상처의 치유등의 정상적인상태에서도 중요한 역할을 하며, 세포의 부착작용(cell adhesion)도 암의 전이나 신생혈관의 형성에 중요한 역할을 한다. 신생혈관생성은 기존의 혈관에서 새로운 혈관이 만들어지는 일련의 과정으로, 혈관을 구성하고 있는 내피세포의 이동과 세포 간 장벽(extracellular matrix:ECM)를 통과하는 침윤, 증식, 혈관으로의 분화, 새로운 ECM의 형성, 평활근세포의 관여 등 복잡하게 이루어지며, 이에 대한 유도물질과 억제물질간의 균형에 의한 정교한 “on-off” 스위치에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다[7]. “ON” 스위치가 작동하면 신생혈관생성의 과잉상태가 일어나며, “OFF” 스위치는 불충분한 상태로 이전 된다. 생리적 상태의 신생혈관생성은 태아의 발생, 여성의 월경 및 국소의 산소부족에 따라 한시적으로 일어날 수 있으며, 병리적으로는 암, 당뇨병성 망막염, 류마티스성 관절염 등에서 혈관의 과잉 증식으로 나타난다[5,6]. 허혈성 질환이나 골절 등에서는 혈류의 공급이 원활하지 못하여 치료를 위하여 신생혈관생성이 활용되고 있다[12]. 또한 신생혈관생성은 상처의 치유나 종양의 성장 과정에서 영양분과 산소의 공

급 및 노폐물의 제거를 위한 필수적인 과정이다. 특히 악성 종양에 있어서 신생혈관생성은 종양세포의 성장과 전이를 결정짓는 중요한 요소이며, 많은 종류의 악성 종양에서 신생혈관생성의 정도는 종양의 진행 및 전이와 관계가 있다고 알려져 있다[3,4,10,21]. 신생혈관생성의 정도는 혈관 형성 촉진 인자와 혈관형성 억제 인자, 단백질분해효소와 단백질분해효소의 억제제, 부착분자등에 의해 결정되며, 현재까지 20가지 이상의 혈관형성 촉진인자가 알려졌으며, 그 중 혈관내피세포 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 많은 종류의 종양세포에서 분비되며, 동시에 가장 강력한 혈관형성 촉진인자로 알려져 있다[2,8,15]. VEGF는 혈관투과인자(vascular permeability factor)로도 알려져 있으며, 그의 수용체인 VEGFR-1(Flt-1), VEGFR-2(Fik-1/KDR)와 결합하여 내피세포의 증식을 유발하고 혈관 투과성을 증가시켜, 종양의 성장과 전이에 관여하는 것으로 알려져 있다[2,15]. 혈관 내피세포는 혈관의 기능은 물론 새로운 혈관의 형성, 즉 신생혈관생성을 주도하는 주요 세포이기도 하다[5]. 특히 암의 증식과 전이는 신생혈관생성을 억제함으로써 감소시킬 수 있다. 따라서 신생혈관생성을 억제하는 물질은 신생혈관생성에 관련된 여러 가지 질병 치료에 이용될 수 있다[9].

동백나무(*Camellia japonica*)는 차나무과의 식물로서 한국과 중국에서도 자생하고 있다. 우리나라에서는 주로 남쪽의 섬 지방에 분포하나 해류의 영향으로 서해지역은 경기도 웅진군 백령면의 대청도까지 올라가고 동해지역으로는 경남

#### \*Corresponding author

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

E-mail : pasteur@chonnam.ac.kr

울산군 온산면의 목도까지 분포하고 있다[14]. 동백나무의 원에 품종은 대략 600여 가지에 달하며, 그 꽃 모양도 겹꽃, 홑꽃등 꽃의 모양과 색깔이 다양하다. 우리나라 자생 동백나무(*Camellia japonica*)의 외형적 특성은 상록수이며 넓고 보통 5~7 미터까지 자라는데 최고 18 미터까지 자란 나무도 있다. 질푸르고 두터운 잎새는 작은 가지에 어긋나게 붙으며, 꽃의 개화 시기는 자라는 곳에 따라 조금씩은 다르나 주로 11월에 꽃망울을 맺기 시작하여 다음해 4월까지 핀다[17]. 꽃은 가지 끝 또는 잎겨드랑이에 1개씩 달리는데 꽃대가 없으며 붉은색으로 반개하여 옆으로 향한다. 꽃잎은 주로 다섯 장이나 간혹 일곱 장까지 나기도 하며 서로 조금씩 포개어져 아래부분이 붙어 있다[19]. 또한 약리적 효과로 동백나무 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[14]. 동백에 대한 연구로는 일본의 경우 산차라 하여 꽃 말린 것으로 민간에서 토혈증에 사용한다는 보고가 있으며[11], 알콜흡수억제[13] 등이 보고되고 있다. 또한 Fujita 등[16]은 camellin L-pi-pecolic acid 및 eugenol 화합물을 분리 확인한 바 있다. 국내에서는 일부 학자들에 의하여 동백유의 일반 성분 분석과 유박의 아미노산 함량이 연구되었고, 동백종실의 함유 지방산은 stearic, palmitic, linoleic 및 oleic acid 등으로 구성되어 있는 것으로 일부 보고되고 있을 뿐이다[11]. 본 연구는 혈관 내피세포의 배양계를 이용하여 신생혈관생성과 혈관내피세포 증식 및 세포 부착 등에 대한 동백꽃 추출물의 효능에 대하여 살펴보았다.

**재료 및 방법**

**세포의 배양**

Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)은 Young Science(Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였고, 배양은 T75 플라스크를 사용하였다. 배지는 EBM-2 배지(Cambrex, Hopkinton, MA, USA)를 기본으로하여 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 첨가하여 사용하였으며, 37℃, 5%의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

**시료의 추출**

동백꽃 시료는 Fig. 1과 같이 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 의 유기용매 순서로 극성이 낮은 것부터 높은 순서로 추출하여 분획하였으며, 동결건조 시켜 시료로 사용하였다.

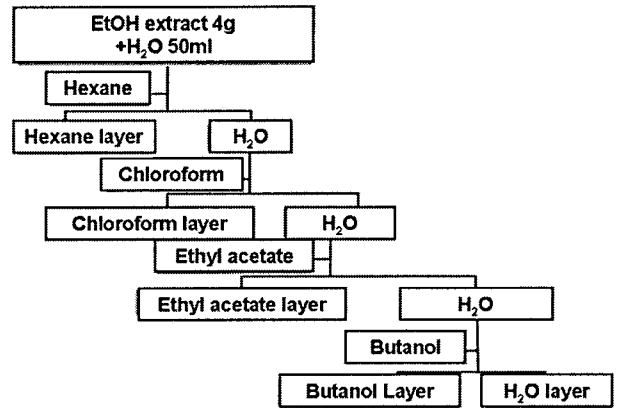


Fig. 1. Fractionation of the *Camellia japonica* flower(CJF).

**시료의 독성 시험**

HUVECs을 24well plate당 4×10<sup>4</sup> cell 씩 분주하여 배양한 후 세포가 충분히 자라면 농도별로 동백꽃 에틸알콜 추출물을 처리하였다. 이를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24 시간 배양하여, trypsin-EDTA로 처리후 hemocytometer를 사용하여 살아있는 세포의 수를 헤아려 대조군과 비교하여 독성의 여부를 판단하였다.

**신생혈관생성억제 시험**

신생혈관생성 시험[13]은 24 well-plate(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)에 150 μl의 matrigel (Becton/Dikinson, Becton, NJ, USA)을 넣어 고체화 시킨 후 각 well당 2.5×10<sup>4</sup>개의 세포를 넣어 세포를 부착시킨 후 동백꽃 추출물을 농도별로 투여하여 실시하였다. 3시간 후 tube가 형성되면 불규칙적으로 5면을 선택하여 digital camera(Nikon, coolpix 4500)를 이용하여 촬영하였다. NIH program을 이용하여 형성된 tube의 길이를 측정하여 anti-angiogenesis 효과를 판단하였다.

**Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA)법에 의한 세포부착 활성 측정(16)**

HUVECs을 96well에 well당 5×10<sup>3</sup>개의 cell 이 되도록 분주하여 2% Fetal bovine serum(FBS)를 첨가한 EBM-2배지에서 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건으로 배양하여 최고조에 도달하도록 배양하였다. 동백꽃 에틸알콜 추출물의 농도를 200, 100, 50 및 25 μg/well이 되게 첨가하고 20시간 배양한 후, phosphate buffered saline(PBS)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 고정시켰다. 30분 후 PBS+0.5% Tween 20으로 두 번 세척하고, 10% FBS로 1시간 동안 blocking 한 다음, 단일 클론 항체 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1),

vascular cell adhesion molecule-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 20 으로 세척하고, secondary antibody(Donkey anti-mouse IgG-HRP: Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 10% FBS의 PBS에 1000배 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜, 발색시약(western blotting luminol reagent: Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 plate reader(UVM 340, ASYS, Austria)를 사용하여 405 nm에서 측정하였다.

**Western blotting[16]**

**a) Chemical 처리 및 VEGF 자극**

HUVECs를 100mm petri dish에 1×10<sup>5</sup> cell으로 접종하여 배양한 후 최고조에 도달하면 동백꽃 에틸알콜 추출물을 농도별로 처리하여 24시간 배양하여 serum-free EBM-2배지로 세척하고 대조군 및 처리군을 serum을 첨가하지 않은 채 overnight 시킨 후 VEGF(BD Science, Bedford, MA, USA)를 50 ng/mL가 되게 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. phosphorylation을 방지하기 위하여 세포를 용해시키기 전 7분간 vanadate(100µM)과 hydrogenperoxide(200µM)을 첨가하였다. 그 후 세포를 즉시 냉각시킨 PBS+0.1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>로 세척하고 냉각시킨 lysis buffer(150mM NaCl, 10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1% Triton X-100, 1mM vanadate, 1mM EDTA, 1mM FGTA, 0.2 mM PMSF, 0.5% NP-40)를 첨가하고 20분간 4°C에서 반응시켰다. Scripper로써 세포를 회수하여 micro eppendorf tube로 옮겨서 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 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 µl의 IP buffer(0.2 mM sodium vanadate 첨가)를 넣고 단백질 50 µg과 10 µl의 anti-VE-Cadherin antibody를 첨가하고 total양을 1 mL이 되도록 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 vortex한 후 4°C에서 12 시간 동안 반응시켰다. 반응 후 20 µl의 Protein A/G-agarose(Amersham Science, Uppsia, Sweden)를 첨가한 후 4°C에서 30 분간 반응 후, 14,000 rpm에서 3 분간 4°C에서 원심분리하여 상등액을 제거한 다음 IP washing buffer 500 µl를 사용하여 세척 후 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 50 µl의 4× Laemmli sample loading buffer를 첨가하여 95°C에서 5 분간 끓인 후 sample을 7.5% SDS-PAGE gel로 전기영동후에 0.2 um nitrocellulose membrane(Bio-Rad Lab. Hercules, CA, USA)막으로 전이시켰다.

**b) Protein 확인**

Ponceau-S(Markham, Ontario, Canada) 시약으로 단백질을 확인하였고 5%-non-fat dry milk(NFDM)로 실온에서 1

시간 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 stripping buffer를 이용하여 50°C에서 5분간 행한 후 blocking을 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**신생혈관 형성 억제효과**

동백꽃의 에탄올 추출물의 분액으로 신생혈관생성억제 효과를 실험한 결과 butanol 추출물이 강한 제어력(70.2%)를 나타내었고, acetone 층이 54.2%, 그리고 ethylacetate 층이 37.0%, chloroform 층이 21.2%의 유의성 있는 제어력을 나타냄이 밝혀져 동백꽃의 butanol층은 신생혈관생성억제제로서 좋은 효과를 보이고 있는 것으로 판단된다. Hexane 추출 과정중 hexane 층이 gel상태로 되어 분획하는 작업이 어려워서 acetone을 첨가하여 gel을 녹인 후 acetone 층을 sample로 사용하였다(Fig. 2(a)). 대조군은 신생혈관생성이 뚜렷하게 뻗어

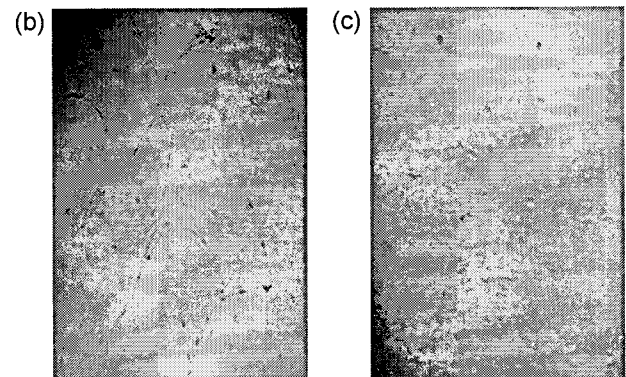
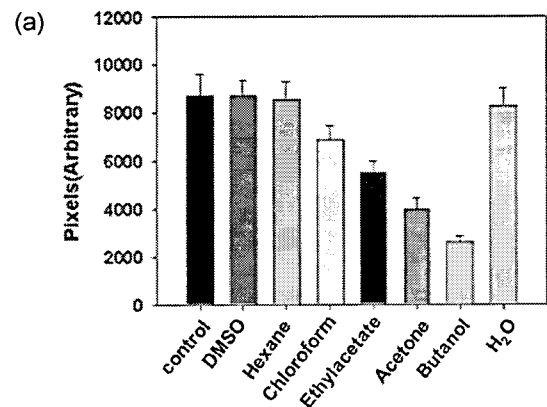


Fig. 2. Anti-angiogenic effect of the *Camellia japonica* flower with different fractions(a), tube formation with the *C. japonica* flower fraction (b) and control (c).

있고(Fig. 2(b), 동백꽃 추출물이 첨가된 cell은 신생혈관생성이 저해된다는 것을 알 수 있다(Fig. 2(c)). 따라서 동백꽃 추출물의 에탄올 추출물은 신생혈관의 형성을 억제하는 것으로 나타나, 생체에 투여할 수 있는 간단한 추출물로서 항암, 암전이 억제, 류마치스성 관절염[5,6] 및 항비만 제제[1,18,20] 등의 용도로 그 응용가능성이 높을 것으로 판단된다.

**독성시험**

동백꽃 butanol 추출물이 신생혈관생성의 효과를 강하게 나타냄으로써 이들 추출물에 대한 독성 시험을 HUVECs를 사용하여 검토한 바 Fig. 3과 같이 나타났다. 그래프에서 보는 바와 같이 동백꽃의 추출물은 200 µg/well에서도 control과 비교하여 독성이 전혀 없는 것으로 나타났다. 이것으로써 동백꽃의 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 *Camellia japonica* flower(CJF)의 성분 증가에 따라 발현이 감소되는 것으로 보아 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다(Fig. 4). Fig. 4(a)에서 보는 바와 같이 cell adhesion 분자인 ICAM-1이 동백꽃 추출물의 농도가 증가함에 따라 발현이 감소하여 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었다. 농도가 50 µg일 때 5.9%, 100 µg 일 때 29.4%, 200 µg일 때 52.9% 저해되었으며, VCAM-1도 동백꽃 추출물 성분증가에 따라 감소하여 저해 효과가 높아졌으며, 특히 농도가 50 µg일 때 12.5%, 100 µg 일 때 43.8%, 200 µg일 때 62.5% 저해되었다(Fig. 4(b)). 또한, E-selectin 역시 감소하여 cell adhesion의 저해 효과가 높아짐을 알 수 있었고, 농도가 50 µg일 때 7.1%, 100 µg 일 때 24.4%, 200 µg일 때 35.7% 저해되었다(Fig. 4(c)). 따라서 동백꽃에는 cell adhesion을 저해시키는 물질이 함유되어 있는 것으로 조사되어 항암 작용, 암전이 억제등에 CJF가 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

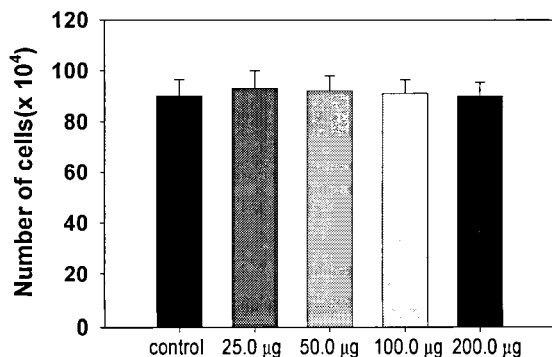


Fig. 3. Cytotoxicity of the *C. japonica* flower butanol extract with different concentrations.

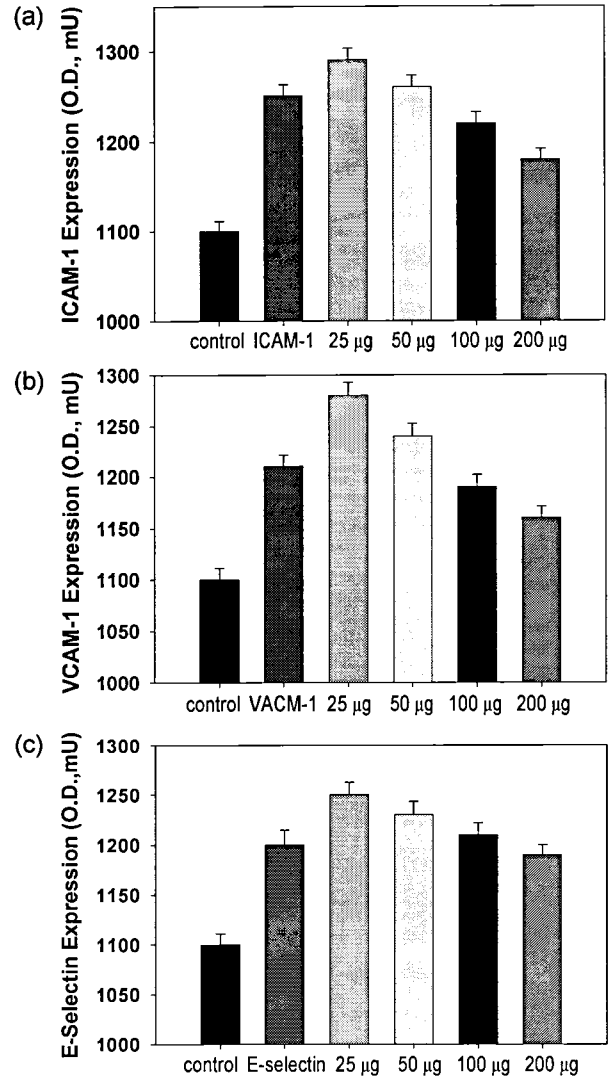


Fig. 4. Inhibition of endothelial cell adhesion molecules ICAM-1(a), VCAM-1(b) and E-selectin(c) expression by different dose of the *C. japonica* flower.

**Western blotting**

Fig. 5에서 보듯이 *Camellia japonica* flower(CJF) 추출물의 농도가 증가함에 따라 신호전달 분자인 VEGFR2, PI3-K 및 β-catenin의 밴드가 약해지는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 각각의 신호전달 분자의 발현이 CJF에 의해서 저해되어 발현이 방해되어 신호의 전달이 차단되는 것을 의미하며, 신호가 차단됨에 따라 신호가 IκB에 미치지 못하여 이를 분해하지 못함으로써 핵내의 전사인자인 NF-κB를 활성화시키지 못하여 신생혈관의 형성이 저해되는 것으로 판단된다.

**요 약**

본 실험은 동백꽃의 효능을 알아보기 위하여, 동백꽃을 에탄알콜로써 추출한 후 극성이 다른 다양한 유기 용매로 분획

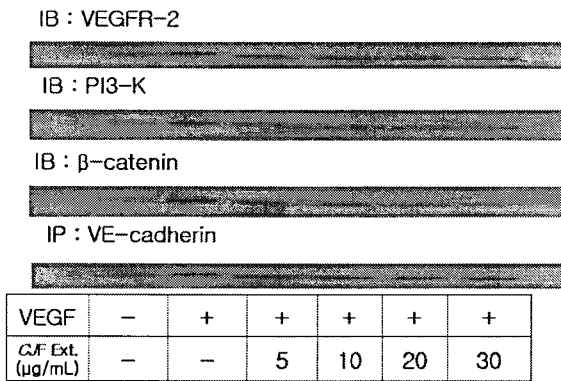


Fig. 5. Expression of signal molecule VEGFR-2, PI3-K, and  $\beta$ -catenin treated with different concentrations of the *C. japonica* flower by western blot. VE-cadherin as a loading control.

하여 나온 fraction으로 신생혈관생성 억제, cell cytotoxicity, 세포부착분자에 대한 기능을 ELISA, westen blot등으로 조사하였다. 신생혈관생성 억제 효과는 특히 butanol 층에서 70.2%로 가장 높았으며, acetone 층이 54.2%, 그리고 ethyl-acetate 층이 37.0%, chloroform 층이 21.2%로 유의성 있는 억제효과가 있었다. 특히 동백꽃의 butanol층은 신생혈관생성억제제로서 좋은 효과가 있는 것으로 판단된다. 그리고, 추출물의 농도별로 cell cytotoxicity를 조사한 결과 농도가 200 µg/ml 이하에서 세포독성은 나타나지 않았다. Cell adhesion 저해율은 추출물의 농도 200 µg/mL에서 ICAM-1은 52.9%, VCAM-1은 62.5%, 그리고 E-selectin은 35.7%로 나타났으며 동백꽃의 추출물의 성분 증가에 따라 발현이 감소됨으로써 cell adhesion을 저해하는 것으로 확인되었다. Westen blot에서 첨가한 동백꽃 추출물의 농도가 높아질수록 신호전달분자의 발현이 약해지는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 신호전달 분자는 동백꽃 추출물에 의해서 신호전달이 차단되며, NF-KB를 억제함으로써 신생혈관생성을 저해하는 것으로 확인되었다. 따라서 동백꽃 추출물은 항암제 및 항비만제로서 유용할 것으로 판단된다.

### 참 고 문 헌

1. 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.
2. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* **18**, 4-25.
3. Fidler, I. J. and L. M. Ellis. 1994. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer

4. Folkman, J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* **1**, 27-31.
5. Folkman, J. and M. Klagsbrun. 1987. Angiogenic factors. *Science* **235**, 442-447.
6. Folkman, J. and R. Cotran. 1976. Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Path.* **16**, 207-248.
7. Folkman, J. and Y. Shing. 1992. Angiogenesis, *J. Biol. Chem.* **267**(16), 10931-10934.
8. Fox, S. B., K. C. Gatter and A. L. Harris. 1996. Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* **179**, 232-237.
9. 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.
10. Hanahan, D. and J. Folkman. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.
11. Itokawa, H., H. Nakajima, A. Ikuta, Y. Iitaka. 1981. Two triterpenes from the flowers of *Camellia japonica*, *Phytochem.* **20**, 2539-2542.
12. 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.
13. Kim, J. D., L. Liu, W. Guo and M. Meydani. 2006. Chemical structure of flavonolsids in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Biochem.* **17**, 165-176.
14. Lee, S. H. and S. K. Kim. 1992. Natural distribution and characteristics of populations of *Camellia japonica* in Korea. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* **33**, 196-208.
15. 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.
16. 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. Biotechnol.* **16**(10), 1544-1553.
17. Lim, R. J. 1999. Book for Medical Plant of Chosun(II). pp.15-16, Hankookmunwhasa, Seoul.
18. 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.
19. Society of medical plant. 1999. Morden Medical Plant. pp.536-538, Hakchangsa, Seoul.
20. Wasseman, F. 1965. The development of adipose tissue. pp.7-100, In Renold, A, E. and G. F. Cahill(eds), *Handbook of physiology*, Vol. 5, American Society of Physiology, Washington, D.C.
21. Weidner, N. 1995. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am. J. Pathol.* **147**, 9-19.