



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0106156
(43) 공개일자 2012년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23J 3/20 (2006.01) A23J 3/30 (2006.01)

A23L 1/305 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0024063

(22) 출원일자 2011년03월17일

심사청구일자 2011년03월17일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

강경화

부산광역시 남구 용소로19번길 62-6, 503호 (대연동, 성원하우스)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

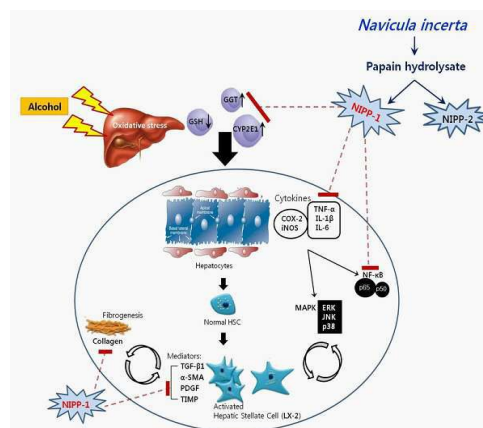
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 간 섬유화 억제용 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물 유래의 펩타이드 및 이를 함유하는 건강보조식품

(57) 요약

본 발명은 간 섬유화 억제를 위한 미세조류 나비쿨라 인세르타(Navicula Incerta)의 과파인 가수분해물 유래의 펩타이드, 이를 함유하는 건강 보조 식품에 관한 것이다. 본 발명에서는 HepG2/CYP2E1 및 LX-2 세포(HSC)로 명명된 2개의 간 세포에서 알코올 유도된 간독성 및 간 섬유화에 대한 상기 펩타이드의 효과를 연구하였다. 본 발명에 따르면, 상기 2가지 펩타이드 둘다 알코올 간 손상에 대하여 고 활성이었다. 또한, 본 발명에 따르면, 간 손상에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2의 작용 메커니즘이 제시된다. 본 발명의 실험 데이터에 따르면, 모든 경우에 있어서 NIPP-1이 NIPP-2보다 높은 활성을 가졌으며, 상기 펩타이드 둘다는 식품 첨가제, 기능성 식품제 및 약물학적 제제의 유효성분으로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도22



(72) 발명자

류보미

부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성엠펜
이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트
125동 1402호 (사직동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 M2010-01

부처명 국토해양부(마린바이오프로세스연구단)

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물유래 항고혈압 기능성 펩타이드의 임상평가를 통한 제품화 및 산업적 적용

주관기관 부경대학교

연구기간 2010.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

미세조류 나비쿨라 인세르타의 단백가수분해물 유래인 것을 특징으로 하는 간 섬유화 억제용 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드가 분자량 1,171 Da를 갖는 NIPP-1 또는 분자량 1,108 Da를 갖는 NIPP-2인 것을 특징으로 하는 간 섬유화 억제용 펩타이드:

NIPP-1 :Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu;

NIPP-2 :Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 간 섬유화 억제용 건강보조식품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 간 섬유화 억제용 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물 유래의 펩타이드 및 이를 함유하는 건강보조식품에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 단백질 효소에 의한 미세조류 나비쿨라 인세르타의 가수분해물에서 수득되어 간 섬유화 억제에 사용되는 것을 특징으로 하는 미세조류 나비쿨라 인세르타 단백 가수분해물 유래의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 및 이를 함유하는 건강보조식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 간질환은 간 섬유화로 이어지고, 문맥 고혈압, 간부전 및 간세포암종의 생명을 위협하는 합병증으로 인해 전세계적인 주요 공중보건 문제인 간경화를 중국에 발병시킨다. 각종 유해 자극은 바이러스, 알코올, 자가면역질환, 만성 담즙 울체, 대사 장애 및 유전병을 비롯한 섬유화식증을 일으킬 수 있다[Blomhoff 및 Wake, 1991]. 현재, 간경화의 주된 원인은 만성 알코올 섭취, 간염 바이러스 및 비알코올성 지방간염(NASH)을 포함한다[Battaller 및 Brenner, 2005]. 특히, 만성 알코올 섭취는 간 섬유증식증 및 간경화의 가장 흔한 병인 인자이다. 에탄올은 간에 있는 알코올 탈수소효소 및 시토크롬 P450 시스템에 의해 일차적으로 대사된다.

[0003] 이러한 산화적 경로에 의해 생성된 아세트알데하이드는 산화 효소인 알데하이드 탈수소효소의 느린 운동계수로 인해 축적된다. 에탄올과 아세트알데하이드는 직접적으로는 반응성 산소 종(ROS : Reactive Oxygen Species)을 발생시키고 간접적으로는 형질전환 성장인자 베타(TGF-β)를 발생시켜서 간에 영향을 준다[Gressner 및 Weiskirchen, 2006].

[0004] 간 섬유증은 세포외 기질(ECM: extracellular matrix) 침착을 특징으로 하는 다양한 만성 간손상에 대한 통상적인 반응이다. 간 섬유증의 주요 현상은 환경 변형으로 인한 간 정상세포의 활성화라고 널리 알려져 있다. 또한, 간 섬유증은 바이러스성 간염(특히, B형 및 C형 간염), 알코올 남용, 약물, 대사 질환, 간세포의 자가면역 공격 또는 선천성 이상을 비롯한 각종 손상으로 인한 만성 간 손상에 대한 가역적인 상처 치료 반응이다[Friedman, 2000]. HSC에서 ECM의 누적은 활성화된 섬유모세포에 의한 ECM의 합성 증가로 인해 야기된다. HSC에서 섬유모세포의 병적 활성화의 메커니즘이 완전히 알려지지 않았으나, 많은 증거에 의하면 형질전환 성장 인자(TGF)β 및 혈소판-유도된 성장 인자(PDGF)가 섬유모세포 활성화의 중요한 역할을 하는 것으로 시사된다[Czochra 등, 2006]. 그러나, ECM 누적은 합성 증가 및 분해 감소로 인해 발생한다. ECM 재형성의 원인

인자는 아연-의존적 효소 기질 금속단백분해효소(MMP), 기질금속단백질분해효소의 작용을 조절하는 내재성 억제제(TIMF) 및 여러 전환 효소로 밝혀졌다. 인간의 간 질환에서 MMP-1이 하향 조절되고, MMP-2 및 MMP-9가 상향 조절된다[Friedman, 2001]. 이들로 인해, 내피하 공간에서 정상 기질이 분해되고 원섬유 콜라겐으로 치환된다. 활성화된 MMP는 TIMP(TIMF-1 및 TIMF-2)에 의해 부분적으로 조절된다[Bataller 및 Brenner, 2001]. 누적된 증거에 따르면, 간 섬유증은 가역적이고, 따라서 간경화로부터의 회복이 가능할 수 있다. 콜라겐분해성 활성 증가가 섬유증 해법의 주요 메커니즘이다.

[0005]

많은 최근 연구에서 알려진 바와 같이, 간 정상세포(종래, 지방세포, 동굴주위(perisinusoidal) 세포 또는 지방저장 세포로 지칭됨)는 일차 세포 유형 매개의 섬유증식증이다[Iredale, 2001]. 정상 간에서, 간 정상세포(HSC)는 비타민 A를 저장하는 기능을 갖는 비실질(nonparenchymal) 정지 세포이다. 임의의 병인으로 인한 간 손상 후에, HSC는 활성화 과정을 거쳐, 비타민-A 풍부한 정지 세포로부터 증식성, 섬유원성(fibrogenic), 수축성 근섬유모세포로 형질전환된다[Bataller 및 Brenner, 2001]. 활성화된 간 정상세포(HSC)는 지방방울(lipid droplet)을 소실하고, α -평활근 액틴(α -SMA)의 높은 수준 발현을 특징으로 하며, 과량의 세포외 기질(ECM, 대부분 I, II 및 III형 콜라겐)의 대부분을 분해시켜서, 섬유증 간의 흉터 조직 작용을 형성하게 된다[Friedman, 2000; Reeves 및 Friedman, 2002]. 정상세포 활성화는 간세포, 내피 세포, 쿠퍼 세포, 혈소판 뿐만 아니라 원발암 및 전이암에서의 침윤종양세포를 비롯한 손상된 인접 세포로부터의 주변분비 자극에 의해 개시될 수 있다. 개시 후에, 활성화된 HSC는 일련의 표현형 변화를 거쳐서 축적된다. 이러한 변화는 증식, 수축, 섬유증식, ECM 분해, 레티노이드 손실 및 사이토카인 방출을 주로 포함한다. 섬유증식 증가는 정상세포에서 간 섬유증이 발생하는 가장 직접적인 방식이다. 형질전환 성장 인자 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)은 가장 강력한 섬유증 인자이다[Gressner 및 Weiskirchen, 2006년]. 한편, 자가분비 사이토카인은 TGF- $\beta 1$, PDGF, HGF, ET 및 기타를 비롯한 정상세포의 활성화 과정을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다.

[0006]

동물 연구에서, 에탄올 대사물인 아세트알데하이드는 간 정상세포에서 자가분비 TGF- $\beta 1$ 발현을 증가시킨다. TGF- $\beta 1$ 은 세포외 기질 단백질의 생성을 증가시키고, 기질 분해성 단백질분해 효소를 감소시킨다. 이러한 간 섬유증 유도 이외에, TGF- β 는 간세포 사멸을 일으키고 간세포 증식을 억제함으로써 알코올성 간을 손상시킨다. TGF- β 는 세포 분화, 섬유증, 혈관형성, 세포자멸사의 증진 및 세포 증식 억제에서 일정한 기능을 하는 성장 인자이다[Gressner 및 Weiskirchen, 2006년]. TGF- β 는 또한 간 세포자멸, 간 섬유증식 및 간세포 증식 억제에 의해 알코올성 간 질환을 매개한다. 그 하위유형(subtype) 3가지 중에서, TGF- $\beta 1$ 이 가장 풍부하고, 일반적으로 발현되는 아이소형(isoform)이다. 대부분의 세포에서, TGF- $\beta 1$ 은 항-증식 활성을 갖고, 가장 강력한 공지의 profibrogenic 신호 인자이다[Kanzler 등, 1999]. TGF- $\beta 1$ 은 간을 비롯한 많은 기관에서 섬유증식의 개시 및 유지에 참여한다. 따라서, 활성 TGF- $\beta 1$ 의 조직 및 혈청 수준이 섬유증에서 증가하고, 유전자 변형 생쥐(transgenic mice)에서 TGF- $\beta 1$ 의 과발현 및 외인성 TGF- $\beta 1$ 의 적용이 기관 섬유증을 유도할 수 있다. 동물을 이용한 선행 연구에는 에탄올-처리된 래트(rat)에서 TGF- β 수준이 증가한다는 많은 보고가 있었다. 또한, HSC 활성화는 기능성 간세포 조직의 상당한 손실과 관련된 만성 간 손상에 대한 반응으로 발생한다. LX-2 세포는 자발적으로 무한증식되는 정상 인간의 정상세포로부터 유도된 low passage 인간 간 정상세포주이다[Friedman, 2000]. LX-2 세포는 낮은 혈청 조건(1% 소태아 혈청)하에서 증식할 수 있는 능력으로 인해 선택되었다. 상기 세포는 신경교 산성 섬유 단백질인 데스민을 발현하며 일차 배양물에서 HSC의 전형적인 특징을 나타내고, 혈소판-유도된 증식 인자 BB 및 TGF- $\beta 1$ 에 대해 반응한다.

[0007]

산화적 스트레스 및 알코올 손상의 역할을 연구하는데 있어서, 섬유증 자극에 대한 과사의 간접적인 영향과 자유 라디칼 종의 직접적인 섬유증 영향을 식별하는 것은 어렵다. 그러나, 과사 영향 이외에, 간 손상의 과사전 단계동안에 세포외 기질 침착의 직접적인 자극이 있다는 것이 점점 명확해졌다[Svegliati-Baroni 등, 1998]. 그러나, 산화적 스트레스 및 알코올의 섬유증식 영향의 메커니즘은 밝혀지지 않았다.

[0008]

간 섬유증 억제와 관련하여, 대한민국 등록특허 제10-0445640호 ‘부테인의 간경화 및 간섬유증 치료제 조성물’, 대한민국 특허출원 제10-2003-0019599 호 ‘탄시는 I 을 유효성분으로 함유하는 간섬유증 또는간경화증 치료제 조성물’, 대한민국 특허출원 제10-2007-0137479 호 ‘월계수 잎 추출물로 구성된 간경화 및 간섬유증 치료 또는예방용 조성물’, 대한민국 특허출원 제10-2008-0135647 호 ‘리토스페메이트 B 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 간질환의 예방 또는 치료용 조성물’, 대한민국 특허출원 제10-2009-0015485 호 ‘양파 껍질 추출물을 유효성분으로 함유하는 간 질환의 예방 및 치료용 조성물’ 등이 알려져 있으나, 미세조류를 이용하여 간 섬유증을 억제하는 것에 대하여는 아직 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 LX-2 세포에서 TGF- β 1 활성화된 섬유증을 정제된 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드의 존재하 또는 부재하에서의 연구 결과, 간 세포 손상 메카니즘, TGF- β 1 자극된 섬유증식에 대한 보호 메카니즘을 보여주기 위한 NIPP-1 및 NIPP-2의 보호 효과에 대한 연구 결과를 제공하여서, 간 섬유증의 메카니즘을 밝히고, 이를 억제할 수 있는 미세조류 나비쿨라 인세르타의 단백질가수분해물 유래의 NIPP-1 및 NIPP-2를 제공하고, 이를 유효성분으로 함유하는 건강 보조 식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 나비쿨라 인세르타(*Navicula incerta*)는 저생 규조류의 일종으로, 식물 플랑크톤의 주요한 구성성분이고, 배배하기가 비교적 용이하다.
- [0011] 본 발명에서는 나비쿨라 인세르타의 단백질 가수분해물, 보다 바람직하게는 나비쿨라 인세르타의 과파인 가수분해물로부터 2개의 특정 펩타이드, 즉, NIPP-1 및 NIPP-2를 동정한다. NIPP-1 펩타이드의 아미노산 서열은 Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu이고, NIPP-2 펩타이드의 아미노산 서열은 Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu이다.
- [0012] 과파인은 시스테인 프로테아제로, 류신(leucine) 또는 글리신(glycine)과 같은 소수성 아미노산에 대하여 광범위한 특이성을 나타낸다.
- [0013] 간은 섭취된 에탄올을 대사, 분해(disposition) 및 해독하는 주요 기관이다. 알코올 탈수소효소(ADH)는 마이크로솜 시토크롬 P450 2E1(CYP2E1) 및 카탈라아제에 의한 경로에 비해 섭취 알코올의 대부분을 간에서 아세트알데하이드로 산화시킨다.
- [0014] 알코올은 세포 손상의 주요 인자이고, 급성 및 만성 간 손상에서 중요한 역할을 하는 것으로 널리 알려져 있다. 간 섬유증은 각종 만성 유해 자극에 대한 반응에서 상처-치료 과정을 대표한다. 섬유증 자극 후에, 섬유증 간에서의 ECM의 합성 및 분해 증가의 주된 원인인 HSC는 복잡한 활성화 과정을 거친다. 만성 알코올 섭취는 간 섬유증식 및 간경화의 가장 주된 병인 인자이다[Rashba-Step 및 Cederbaum, 1994]. 에탄올은 알코올 탈수소효소 및 시토크롬 P450 시스템(CYP2E1)에 의해 일차적으로 대사된다[Cederbaum 등, 2001]. 이러한 산화적 경로에 의해 생성된 아세트알데하이드는 산화 효소인 알코올 탈수소효소의 느린 운동계수로 인해 축적된다. 에탄올과 아세트알데하이드는 직접적으로는 반응성 산소 종(ROS : Reactive Oxygen Species)을 발생시키고 간접적으로는 형질전환 성장인자 베타(TGF- β)를 발생시켜서 간에 영향을 준다[Kanzler 등, 1999].
- [0015] 간 정상세포(HSC)는 간 섬유증에서 ECM의 주요 세포 공급원으로 간주되었다. 정상 간에서, HSC는 정지 상태로 있으나, 손상시에 HSC는 활성화되어 증식되기 시작한다[Li 및 Frieman, 1999]. 본 발명에서 사용된 인간 HSC 세포주 LX-2는 HSC의 주요 특징을 보유하고 간 질환 연구에서 중요한 인 비트로(in vitro) 모델을 제공한다. 섬유증식 증가는 HSC가 간 섬유증을 발생시키는 가장 직접적인 방식이다.
- [0016] TGF- β 1은 분화, 증식, 세포자멸사 및 이동을 비롯한 세포 과정의 광범위한 스펙트럼에 영향을 주는 강력한 섬유증 인자이다. 정상세포의 활성화는 간 섬유증에 일조하고 TGF- β 1은 가장 강력한 섬유증 인자라고 널리 알려져 있다. 여러 선행기술에서는 산소 분압(oxygen tension)의 조절이 래트 뇌와 간 및 인간 섬유모세포와 간암 세포에서의 TGF- β 1의 유전자 활성화의 중요한 조절자로서 알려져 있다고 보고되어 있다. TGF- β 1은 간에서의 섬유증개 개시 및 유지에 참여한다[Kanzler 등, 1999]. 본 실험에 따르면, TGF- β 1은 시험관내 섬유증 모델 형성을 위한 HSC의 자극제로서 사용된다. TGF- β 1 처리하에, HSC는 증식, 유전자 발현 및 단백질 발현에서 상당한 변화를 보였다. 그러므로, TGF- β 1의 특이적 억제는 항-섬유증에 대한 유망한 방법일 것으로 보인다[Friedman, 2000].
- [0017] 본 발명에서, 본 발명자들은 TGF- β 1 자극하에서 LX-2 세포 증식을 증명하였으며, 이는 직접적으로는 TGF- β 1으로의 결합, 그리고 부분적으로는 신호 전달을 차단함으로써 간 섬유증을 예방 및 경감시키기 위해 NIPP-1 및 NIPP-2를 사용할 수 있음을 시사한다. ECM 분해의 원인이 되는 주요 효소 군은 MMP 계열이다. MMP의 특이적 억제제인 TIMP는 MMP 활성화 및 ECM 분해의 중요한 조절자로 밝혀졌다. TIMP-1 및 MMP-2의 발현은 간 섬유증의 변화를 반영하며 간 섬유증에서 증가한다. 본 발명에서, 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 결과는 NIPP-1이

TGF- β 1 자극하에서 상향 조절되는 TIMP-1 및 MMP-2의 mRNA 발현을 유의하게 억제함을 나타내었고, 이는 NIPP-1이 TGF- β 1 활성을 조정하거나 감소시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 웨스턴 블롯 결과는 TGF- β 1에 의해 자극된 I형 콜라겐의 증가된 발현 수준이 NIPP-1에 의해 감소되었음을 또한 증명한다. 또한, HSC 활성화의 마커인 α -SMA의 발현이 외인성 TGF- β 1에 의해 현저하게 증가한다. NIPP-1은 α -SMA 상승을 억제하였으며, 이는 HSCM 활성화를 저지할 수도 있음을 나타낸다. 본 발명에 따르면, NIPP-1 펩타이드의 코어 단백질이 α -SMA, I형 콜라겐, MMP 및 TIMP의 피브릴 형성을 투약량 의존적인 방식으로 방지함을 보여준다.

[0018] HSC 활성화 동안의 TGF- β 1 중요도 때문에, 신호 경로에 대한 NIPP-1 영향이 더 연구된다. HSC 활성화는 세포외 기질 구성성분의 조성 및 조직의 광범위한 변화 뿐만 아니라, 사이토카인, 증식 인자 및 산화적 스트레스 생성물을 비롯한 여러 가용성 인자에 의해 조절된다. TGF- β 1 증식 인자 중에서, IL-1 β 및 IL-6 2가지가 섬유 생성에 미치는 주요한 사이토카인이다. 간의 HSC 활성화가 간에서 발생하고 사이토카인과 신호 전달 경로가 자극되는 동안에, TGF- β 1은 HSC 활성화 뿐만 아니라 염증 세포의 유입 및 활성화 둘다에 일조하며 섬유화에서 중심적인 역할을 한다.

[0019] 사이토카인-조절된 HSC 활성화의 경우에, 2가지 가능한 경로, 즉, NF- κ B 및 MAPK가 NIPP-1 처리이후에 연구되었다. 그 결과에 따르면, 발현된 NIPP-1은 MAPK보다 NF- κ B 캐스케이드(cascade)를 유의적으로 억제하는 것이 명확했고, 이는 HSC 활성화에서 사이토카인 생성을 억제하는 NF- κ B 경로를 통해 NIPP-1이 작용함을 시사한다. 또한, NIPP-2는 상기 경로 둘다를 억제하는 약간의 활성을 나타내었다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 의해 간 섬유증에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2의 작용 메커니즘이 밝혀졌으며, 또한 NIPP-1 및 NIPP-2은 간 섬유화를 효과적으로 억제하는 현저한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 LX-2 세포에서 간 섬유화에 관련된 단백질의 유전자 발현에 대한 0.5, 1 및 2ng/mL 농도의 TGF- β 1 영향을 나타낸 것으로, (A)는 RT-PCR에 의해 생성된 밴드를 나타내는 것이고, (B)는 정량화로부터 수득된 그래프를 나타내는 것이며, (C)는 상기 농도의 TGF- β 1 처리 후의 세포 영상을 나타낸 것이다(대조군:미처리 세포).

도 2에서 (A)는 배양 48시간 후에 LX-2 세포 증식에 대한 여러 농도의 TGF- β 영향을 나타낸 것이고, (B)는 LX-2 세포 생존도에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 나타낸 것으로, 상대적인 세포 생존도는 전술한 바와 같이 MTT 분석에 의해 평가하였고, 3회의 독립적인 실험 결과치를 평균내고 미처리 대조군 세포의 생존도와 대비된 세포 생존도 백분율로 나타내었다. 각각의 수치는 3회 반복 실험의 평균치 $\pm$ SD로 표기되었으며, 블랭크와 비교시 * P<0.05, ** P<0.01 및 *** P<0.001이다.

도 3은 항-SMA 항체(FITC, 녹색), 이어서 암실에서 1시간동안 1 μ g/mL DAPI(청색 핵) 용액에서 배양한 활성화된 정상세포(LX-2)의 현미경 사진으로, 세포 영상은 48시간 증식 후에 촬영된 LX-2 세포이며 좌측에는 TGF- β 1 유도된 정지 세포가 나타나 있고 우측에는 활성화된 세포가 나타나 있으며, 10 x 유침 대물렌즈를 갖는 공초점 현미경을 사용하여 촬영하였다.

도 4는 LX-2 세포에서 프로콜라겐 합성에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 나타낸 것으로, 생성된 단백질에 의한 혈청 간섭을 제거하는 시험을 위해 10% FBS를 사용하였다. 프로콜라겐 I형 C-펩타이드 분석은 처리 24시간(A) 및 48시간(B) 후에 실시되었다. 각각의 수치는 3회 실험의 평균치 $\pm$ SD로 표기되었으며, TGF- β 1 처리된 세포와 비교시 * P<0.05, ** P<0.01 및 *** P<0.001이었고, TGF- β 1로 비처리된 세포와 비교시 # P<0.001이었다.

도 5는 일차 배양된 LX-2 세포에서 가용성 콜라겐 생성에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 영향을 나타낸 것으로, 세포에 의해 생성된 가용성 콜라겐은 차이를 확인하기에 충분하지 않았고, 그 경향만이 확인되었다. 각각의 수치는 3회 실험의 평균치 $\pm$ SD로 표기되었으며, 대조군과 비교시 * P<0.05, ** P<0.01 및 *** P<0.001이었고, 블랭크와 비교시 # P<0.001이었다.

도 6은 면역형광 세포 이미지에 의해 증명된 HSC(LX-2) 섬유모세포에서 α -SMA 발현에 대한 영향을 나타낸 것

으로, 세포를 항-액틴, α -평활근 항체(IgG1, 시그마)로 염색하였으며, 블랭크는 비자극물이고, 대조군 및 샘플은 TGF- β 1 자극물이다.

도 7은 HSC(LX-2 세포) 배양물에서 세포 침입에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 영향을 나타낸 것으로, 세포를 24-웰 플레이트에서 4×10^5 세포/웰의 밀도로 증식시켰고, 전면(confluent) 단층을 상처입힌 후에 무혈청 배지중 다양한 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드로 처리하여 배양하였다. 48시간 배양 후에, 세포를 위상차 현미경($\times 20$)하에 촬영하였다.

도 8은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 α -평활근 액틴(ASMA), TGF- β 및 PDGF 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 9는 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 α -평활근 액틴(ASMA), TGF- β 및 PDGF mRNA 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다.

도 10은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 TIMP-1 및 TIMP-2 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 11은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 TIMP-1 및 TIMP-2 mRNA 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다.

도 12는 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 MMP-1 및 MMP-13 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 13은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 MMP-1 및 MMP-13 mRNA 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다.

도 14는 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 MMP-2 및 MMP-9 단백질 발현에 대한 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B) 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1 및 NIPP-2로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 15는 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 MMP-2 및 MMP-9 mRNA 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다.

도 16은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 1형 콜라겐 및 2형 콜라겐 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 17은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 1형 콜라겐 및 2형 콜라겐 mRNA 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다.

도 18은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 TNF- α , COX-2 및 iNOS 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 19는 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 IL-1 β , IL-4 및 IL-6 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 20은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 p65, p50 및 I κ B α 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다. β -튜불린(tubulin)의 단백질 수준을 이용하여서, 전기영동에 사용된 동량의 단백질을 확인하였다.

도 21은 TGF- β 1에 의해 자극된 HSC에서 ERK, JNK 및 p38 단백질 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 처리의 영향을 나타낸 것으로, LX-2 세포를 48시간동안 2 ng/mL TGF- β 1의 존재하에 또는 부재하에 NIPP-1(A) 및 NIPP-2(B)로 처리하였다. 세포 및 배양 배지를 수거하고, 웨스턴 블롯을 실시하여서 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 평가하였다.

도 22는 알코올 간 손상에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드의 작용 메커니즘을 나타낸 것으로, 상기 펩타이드는 GGT와 CYP2E1 수준에 대한 억제제 및 GSH 수준에 대한 증강자(enhancer)로서 작용한다. 또한, 상기 펩타이드는 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6과 같은 알코올성 염증 매개자 수준을 감소시키고, TGF- β 1 자극된 HSC(LX-2)에서 섬유증 매개자(TGF- β , PDGF, TIMP 및 콜라겐)의 증가된 수준을 표준화한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 원료 및 방법

[0023] 원료

[0024] 저생 규조류인 나비쿨라 인세르타(Navicula incerta) 배양물은 효소 가수분해물이다. 즉, 나비쿨라 인세르타의 건조시료(powder) 100g을 세포벽분해 효소를 사용하여 1차 가수분해 한 다음, 다시 동결건조시켜 건조시료를 확보하였다. 동결건조시킨 시료 10g씩을 alcalase, α -chymotrypsin, neutrase, papain, pepsin, pronase-E, and trypsin을 사용하여 가수분해한 다음 각각의 효소가수분해물을 동결건조시켜 건조시료를 확보하였다.

[0025] 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM), 트리졸(Trizol) 시약, pENTRTM Directional TOPO(등록상표) Cloning Kit, 및 Gateway(등록상표) Technology를 갖는 E. coli Expression System은 인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corporation)(미국 캘리포니아주 소재)에서 구입하였다. 페니실린-스트렙토마이신, 소테아 혈청, 트립신-EDTA는 킵코(Gibco)(미국 소재)에서 구입하였다. 인간 재조합 TGF- β 1은 바이오비전(Biovision)(미국 소재)에서 구입하였다. 염소 다분지성 항-데코린(anti-decorin) 항체, 염소 다분지성 항-콜라겐 III형 항체 및 퍼옥시다아제-결합된 항-염소 2차 항체를 산타 크루즈 바이오테크(Santa Cruz Biotech)(미국 캘리포니아주 소재)에서 구입하였다. 마우스 단분지성 항- α -SMA 항체를 시그마(Sigma)(미국 소재)에서 구입하였다. 래빗(rabbit)의 단분지성 항-포스포-Smad2 항체는 셀 시그널링 테크놀러지(Cell Signaling Technology)에서 구입하였다(미국 소재). 파파인 효소는 시그마-알드리치(Sigma Aldrich, 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서 구입하였다.

[0026] 펩타이드 NIPP-1 및 NIPP-2의 수득

[0027] 나비쿨라 인세르타 파파인 효소 가수분해물(20mg/mL)을 20mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)에 용해시키고, 20mM 소듐 포스페이트 완충액(pH 7.0)으로 평형을 맞춘 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 컬럼(16 X 100mm) 상에 로딩하고, 2mL/분 유속으로 동일한 완충액 중 NaCl의 선형 구배(0 내지 2.0M)로 용출시켰다. 각각의 분획물을 280 nm 흡광도로 관측하고, 각 분획물을 2mL 부피로 모으고, 2개의 비-흡착부 및 2개의 흡착부로 분획하고(도 1의 Fr I, Fr II, Fr III, Fr IV), 회전 증발기를 이용하여 농축시키고, 항산화 활성을 조사하였다. 분획물 중에서 가장 높은 활성을 나타낸 분획물 IV(Fr IV)를 추가 크로마토그래피를 위해 동결 건조하였다. 1.0mL/분 유속으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유한 아세토니트릴(0 내지 30%, 45분)의 선형 구배로 C18UG-120 컬럼 상에서 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 추가 정제하였다. 용출 피크는 215 nm에서 검출되었고, 상기 피크에서 수득한 물질을 회전 증발기를 이용하여 농축시켰다. 유효 피크의 물질을 모으고, 산화 활성을 측정하고, 상기 분획물을 5개의 명확한 분획물(IV-1, IV-2, IV-3, IV-4 및 IV-

5)로 구분하였다. 또한, 활성에 근거한 분리를 위해 분획물 IV를 세포 생존도, GGT 및 GSH 분석하였다.

[0028] 분획물 IV의 항-간독성 및 항산화 활성 분석 결과에 따르면, 분획물 IV-2가 가장 높은 활성을 가졌고, 이에 분획물 IV-2를 추가 정제를 위해 선택하였다. 활성 분획물 IV-2를 추가로 모으고(pooled), Synchropak RPP-100 분석 컬럼 상에서 RP-HPLC rechromatogram 으로 정제하였다. 1mL/분 유속으로 0.1% TFA를 함유하는 아세토니트릴의 선형 구배(0 내지 15% v/v, 30분)로 용출하였다. 이어서, 분획물 IV-2를 크로마토그래피하여서 6개의 하위분획물로 분리하였다. 또한, 분획물 IV-2를 세포 생존도, GGT 및 GSH 분석하였다.

[0029] 분석 결과, 분획물 IV-2-5 및 분획물 IV-2-6이 가장 높은 활성을 가졌으므로, 이를 추가 정제를 위해 선택하였고, 각각 NIPP-1 및 NIPP-2로 명명하였다.

[0030] 아미노산 서열의 결정

[0031] 전자분사 이온화(ESI) 공급원을 장착한 Q-TOF 질량분석기(마이크로매스(Micromass), 영국 알트링엄)를 사용하여, 상기에서 정제한 펩타이드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열을 결정하였다. 정제된 펩타이드를 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해한 후에 전자분사 이온화 공급원에 주입하고, 질량 스펙트럼에서 doubly charged ($M+2H$)+2 상태에 의해 결정하였다. 분자량 결정에 이어, 단편화할 펩타이드를 자동 선별하고, 탠덤(tandem) 질량 분광분석법에 의해 서열 정보를 얻었다. Tandem 질량 분석 실험은 나노-전기분사 이온화 공급원을 장착한 시간-비행 탠덤 질량 분광기를 이용하여 실시하였다. 활성 펩타이드의 서열은 50 내지 2,500 m/z 범위에서 얻어졌고, PepSeq de novo 서열화 알고리즘을 이용하여 서열화하였다. 그 결과, 정제 펩타이드의 아미노산 서열은 NIPP-1 (Pro-Gly-Trp-Asn-Gln-Trp-Phe-Leu) 및 NIPP-2 (Val-Glu-Val-Leu-Pro-Pro-Ala-Glu-Leu)로 결정되었고, 각각의 분자량은 1,171 Da 및 1,108Da로 결정되었다. ESI/MS 분광기로 결정한 정제 펩타이드의 분자량은 서열로부터 계산된 질량 이론치와 잘 합치하였다.

[0032] 간 정상세포의 배양 및 TGF-β1 처리

[0033] 간 정상세포의 배양 및 처리 - 무한증식된(immortalized) 인간 HSC 주인 LX-2를 미국 뉴욕주 소재의 마운트 시나이 스쿨 오브 메디슨(Mount Sinai School of Medicine)의 에스. 엘. 프리드만(S. L. Friedman) 박사로부터 제공받았다. LX-2는 에스. 엘. 프리드만(S. L. Friedman) 박사의 허락하에 한국에서 세포주를 직접분양하고 있는 경희대학병원을 소개 받아 세포를 제공받았다. 세포를 배양하고, 100U/ml 페니실린, 100mg/ml 스트렙토마이신, 10% 소태아혈청(FBS)으로 보충된 둘베코 변형 이글 배지(DMEM, 김코, 미국 뉴욕주 소재)에서 배양 및 유지하고, 5% CO₂를 포함한 가슴 분위기하에 37℃로 유지시켰다. 상기 배지를 플레이팅 48시간 후에 교체하였다. 이어서, 아데노바이러스를 함유하는 배지를 제거하고, 무혈청 DMEM 0.8 mL/웰(12-웰 디쉬) 또는 2.5mL/디쉬 (60mm 디쉬)로 교체하고, 이어서 인간 재조합 TGF-β1을 위한 배양물을 상기 배지에 첨가하였다(최종 농도 2 ng/mL). 12-웰 및 60-mm 디쉬 배양물을 각각 24시간 또는 48시간동안 배양하였다.

[0034] TGF-β1 농도 측정

[0035] 실험에 사용할 재조합 인간 TGF-β1 (형질전환 증식인자-베타-1) 농도를 상이한 공지 농도로 세포 처리하여서 PCR 분석으로 결정하였다.

[0036] TGF-β1 자극을 위한 최적 농도는 RT-PCR 결과에 따라 2ng/mL으로 선택되었다. 0.5ng/mL 미만의 TGF-β1 농도는 LX-2 세포에서 임의의 TGF-β1를 발현하는데 성공적이지 못하였다. 그러나, 1ng/mL부터는 TGF-β1 발현이 관찰되었고, 2ng/mL 농도에서는 가장 명확한 발현이 관찰되었다. 그러므로, 추가 실험을 위해 2ng/mL을 자극제 농도로 사용하기로 결정하였다.

[0037] 세포 증식, 형태 및 세포독성

[0038] 인간 HSC LX-2 세포 증식에 대한 TGF-β1 영향을 결정하기 위하여 MTT 분석을 이용하였다. 10% FBS를 함유하는 100 μL DMEM를 함유한 96웰 조직 배양물 플레이트에 LX-2 세포를 씨딩(5×10^4 세포/웰)하였다. 배양(37℃, 5% (v/v) CO₂) 24시간 후에, 상기 배지를 조심스럽게 제거하고, 10, 50, 100 μM의 NIPP-1, NIPP-2 펩타이

드와 함께 TGF- β 1(2ng/ml)을 함유하는 신선한 배지 100 μ L를 상기 웰에 첨가하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후에, MTT 염료 용액 20 μ L을 각 웰에 첨가하였다. 4시간 배양한 후에, 용해화(solubilization)/정지 용액 200 μ L 을 첨가하여서 포르마잔 결정을 용해시키고, Genious Multifunction Microplate Reader(테칸(Tecan), 영국 소재)를 이용하여 540nm 흡광도를 읽었다. 흡광도 수치는 각 처리에 대한 3회 실험값의 평균 $\pm$ SE이었다. 대조군 세포 및 화합물 대조군이 포함되었다. 문헌[Skehan 등, 1990]에 기재된 바와 같이, 현미경(Lica DM600, 독일)으로 세포 형태를 측정하였다.

[0039] 세포 독성을 결정하기 위해, 비색성 (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐 테트라졸륨 브로마이드) MTT 분석을 실시하였다[Hansen 등, 1989]. 신선한 배지를 37°C로 5% (v/v) 가습 CO₂/공기 환경에서 48시간동안 상이한 농도의 정제 펩타이드로 처리하였다. 이어서, 4시간 배양 후에, 용해화/정지 용액 200 μ L을 첨가하여서 포르마잔 결정을 용해시키고, Genious Multifunction Microplate Reader(테칸, 영국 소재)를 이용하여 540nm 흡광도를 읽었다.

[0040] 그 결과, TGF- β 1는 LX-2 세포 증식을 증가시키는 것으로 보였다(도 2A). TGF- β 1의 부재하에서는 LX-2 세포 증식에 대한 임의의 유의적인 영향을 나타내지 않았다. 도 2A에 나타난 바와 같이, LX-2 세포 증식에 대한 TGF- β 영향은 투약량과 상관관계를 갖는 것으로 나타났다. 상기 영향은 배양 시간에 따라 증가하였다. TGF- β 의 1, 2ng/mL 농도에서 세포 증식은 또한 24시간 또는 48시간에서도 관찰되었다. 그러나, TGF- β 의 0 및 0.5ng/mL 농도에서는 분명히 증식을 발생시키지 않았다.

[0041] NIPP-1 및 NIPP-2의 세포독성은 배양된 LX-2 세포중에서 MTT 분석을 이용하여 3가지 농도(10, 50 및 100 μ M)로 시험하였다. 도 2B에 나타난 바와 같이, NIPP-1 또는 NIPP-2는 48시간 처리후에 모든 시험 농도에서 LX-2 세포에 대해 유의한(p<0.05) 세포독성을 나타내지 않았다. 상기 펩타이드 둘다에 대하여 10 내지 100 μ M/mL 범위의 비독성 농도를 추가 분석을 위해 선택하였다.

[0042] 간 정상세포(LX-2) 활성화

[0043] 세포 형상이 섬유모세포 특징 형태로 변화였고, TGF- β 1 개시한지 1 및 2일후에 평활근 알파 액틴이 함유되고, 여기서 간 정상세포가 콜라겐을 생성하였다. 이어서, 1 μ g/ml DAPI (4',6-다이아미디노-2-페닐인돌) 용액중 항-SMAA 항체(시그마, 미국 소재)를 암실에서 1시간동안 사용하여서 HSC(LX-2 세포)의 활성 상태를 확인하였다. 이어서, 샘플을 실온에서 1시간동안 FITC-결합된 항-염소 항체(IgG2a 특이성; 인트로, 미국 소재)와 함께 배양하였다. PBS에서 세척한 후에, 공초점 현미경(LSM510, Carl Zeiss, 독일 오버코헨 소재, 유침대물렌즈 사용)을 이용하여 영상을 얻었다.

[0044] 액틴은 핵 혈장(nuclear plasma)을 형광 염색한 후에 촬영된 간 정상세포 영상에서 녹색으로 나타났고, 간 정상세포의 활성화는 시간-의존적인 방식으로의 액틴 양 증가에 의해 확인되었다(도 3). DAPI(청색)가 핵을 염색하는데 사용되었다.

[0045] 섬유모세포에 의해 생성된 I형 프로콜라겐의 측정

[0046] I형 프로콜라겐인 C-펩타이드의 측정은 I형 콜라겐 합성의 활성 검출로 간주되었다. 그러므로, 섬유모세포에 의한 I형 콜라겐 생성은 기재된 바와 같은 I형 프로콜라겐 C-펩타이드 키트(다카라 슈조(Takara Shuzo), 일본 교토 소재)를 이용하여 효소-결합된 면역흡착검사법(ELISA)에 의해 I형 프로콜라겐 C-펩타이드를 측정함으로써 평가되었다. 즉, 섬유모세포를 1mL당 4 x 10⁴ 세포/웰의 밀도로 96-웰 조직 배양 플레이트에 씨딩하고, 10% 열-불활성화된 FBS를 함유하는 DMEM중 5% CO₂ 가습된 배양기에서 37°C로 컨플루언시(confluency)까지 배양한 다음, 샘플을 농도별로 넣고 24시간 배양하였다. 이어서, 배지를 FBS-비함유 DMEM으로 교체하고, 혈청 결핍 24시간 후에 전술한 바와 같은 샘플의 농도별 처리 이후에 트립타아제(trypsin)를 첨가하였다. 대조군으로는 0.01 내지 10mg/mL 농도의 헤파린 또는 무혈청 배지를 콜라겐 합성 분석에서 사용하였다. 배양기에서 37°C로 24시간동안 배양한 후에, 섬유모세포의 배양 상청액중 I형 프로콜라겐 C-펩타이드 농도를 측정하였다. 트립타아제의 존재하에 I형 프로콜라겐 C-펩타이드 농도에 대한 항트립타아제 IgG 영향을 연구하기 위해서 트립타아제 첨가 직전에 배양 플레이트에 첨가하였다. 섬유모세포의 또 다른 시리즈를 이용하여, 트립타아제 존재하에 I형 프로콜라겐 C-펩타이드에 대한 항트립타아제 IgG 영향을 대조군인 비면역 다분지성 IgG (다코(Dako))의 것과 비교하였다.

- [0047] 상기 가용성 콜라겐 분석은 상청액 및 세포내의 가용성 콜라겐 양 둘다에 대하여 실시하였다. 가용성 콜라겐 분석으로부터 얻어진 데이터는 NIPP-1 및 NIPP-2 둘다가 상청액 및 세포 둘다에서 가용성 콜라겐을 감소시키는 것을 입증하였다(도 4). 에탄올 첨가는 24시간 및 48시간 배양 후에 프로콜라겐의 양을 각각 214ng/mL 및 237ng/mL까지 증가하였다. NIPP-처리는 증가된 프로콜라겐 양을 24시간 배양 후에 최고 농도(100 μ M) 농도에서 160 ng/mL 감소시켰고, 48시간 경우에는 167ng/mL 감소시켰다. 한편, NIPP-2 처리는 100 μ M 농도에서 24시간 처리시에 프로콜라겐의 양을 187ng/mL까지 감소시켰고, 48시간 배양시에 195ng/mL까지 감소시켰다. NIPP-1은 상청액 및 세포내 콜라겐 양 둘다에 대하여 투약량-의존적인 방식으로 NIPP-2보다 더 높은 활성을 나타내었다.
- [0048] Sircol 콜라겐 분석
- [0049] 세포를 5×10^4 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 씨딩하고, 2일동안 배양하였다. Sircol Collagen Assay Kit(바이오컬러(Biocalor), 영국)를 제조업체 지시에 따라 사용하여 전체 가용성 콜라겐을 분석함으로써 전체 콜라겐 함량을 결정하였다. 각 샘플을 교반하에 4°C에서 24시간동안 배양하였다. 원심분리 후에, 각 상청액 100ml을 분석하였다. 콜라겐에 결합된 Sircol 염료 시약 1mL을 각 샘플에 첨가하고, 각 용액을 30분동안 혼합하였다. 원심분리 후에, 키트에 포함된 알칼리 시약 1mL에 펠릿을 현탁시키고, 분광광도계를 이용하여 540nm 흡광도를 읽었다. 표준 곡선을 작성하기 위하여 콜라겐 표준 용액을 이용하였다.
- [0050] NIPP-1 및 NIPP-2에 대한 반응으로서 LX-2 세포의 프로콜라겐 생성을 24시간 및 48시간 처리 후에 I형 프로콜라겐 C-펩타이드로 확인하였다. 펩타이드 둘다는 프로콜라겐 양을 투약량 의존적인 방식으로 감소시켰다(도 5). 가용성 콜라겐 양은 에탄올 첨가후에 상청액 및 세포내 각각에서 135 μ g/mL 및 31 μ g/mL까지 증가하는 것으로 밝혀졌다. NIPP-1 처리는 상청액중 증가된 가용성 콜라겐 양을 86 μ g/mL까지 감소시키는 한편, NIPP-2 처리는 100 μ M 농도에서 상청액 가용성 콜라겐 양을 96 μ g/mL까지 감소시켰다. 그러나, NIPP-1 및 NIPP-2 처리 둘다는 세포내 가용성 콜라겐 양을 변화시키지 못하였다. 보다 상세하게, 100uM NIPP-1 및 NIPP-2 처리는 세포내 콜라겐 양을 26 μ g/mL 및 26 μ g/mL로 각각 유지시켰다. 또한, 48시간 결과는 NIPP-1 및 NIPP-2 둘다가 프로콜라겐 생성에 대한 보호 효과를 시간-의존적인 방식으로 나타냄을 증명하였다. 24시간 및 48시간결과의 비교로부터, NIPP-1이 투약량 및 시간-의존적인 실험 둘다에서 NIPP-2보다 프로콜라겐 양을 유의적으로 감소시키는 것으로 판명되었다.
- [0051] 배양된 세포의 간접적인 면역형광 염색법
- [0052] 배양한지 2일 후에, 배양된 HSC로부터 상기 배지를 제거하였다. 면역형광 염색을 위해, 세포를 PBS중 3% 포름알데하이드(시그마)에 10분동안 실온에서 고정시키고, 이어서 PBS로 3회 세척하고, 이어서 PBS중 0.3% 트리톤(Triton) X-100을 10분동안 사용하여 투과성으로 만들었다. 이어서, 세포를 하기 일차 항체: 항-액틴, α -평활근 항체(IgG1, 시그마)로 염색하고, 1시간동안 실온에서 PBS-트윈(Tween) 0.1%으로 희석시켰다. 이어서, 샘플을 FITC-결합된 항-염소 항체(IgG2a 특이성; 인비트로젠, 미국 소재)를 사용하여 1시간동안 실온에서 배양하였다. PBS로 세척한 후에, 위상차 Zeiss Axioplan 현미경(Carl Zeiss, 독일 오버코켄 소재)으로 200 또는 400배 확대하여 영상을 관찰하였다.
- [0053] 간접적인 면역형광으로 NIPP-1 및 NIPP-2의 섬유화 억제 효과를 관찰하였다. 면역형광 분석에서 촬영한 영상은 NIPP-1 및 NIPP-2의 억제 활성을 명확히 나타내었다(도 6). 세포내 액틴으로부터 발광된 형광 밀도에 따르면, NIPP-1이 NIPP-2보다 활성인 것으로 관찰되었다. 상기 펩타이드 둘다는 명확한 투약량-의존적인 억제를 나타내었다. 그러나, 동일 농도 수준에서, NIPP-1은 NIPP-2보다 섬유화를 유의하게 억제하였고, 100 μ M 농도에서 NIPP-1은 대조군의 거의 70% 수준까지 섬유증식을 억제하였다.
- [0054] TGF- β 1-유도된 세포 섬유모세포에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 시각적으로 나타내기 위해서, HSC(LX-2 세포) 영상을 도시하였다(도 7). TGF- β 1, NIPP-1 및 NIPP-2 노출하에 세포 영상을 위상차 현미경으로 촬영하였다. 세포 형상 영상은 NIPP-1 및 NIPP-2의 유사한 섬유화 억제 효과를 명확히 증명하였고, NIPP-1이 NIPP-2보다 섬유증식을 약간 더 억제하였다.
- [0055] 웨스턴 블롯 분석

- [0056] α -SMA, TGF- β 1 및 PDGF 단백질 및 mRNA 발현 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 각각에 의해 결정하였다.
- [0057] 표준 절차에 따라 웨스턴 블롯을 실시하였다. 즉, 무혈청 배지를 함유한 6 웰 플레이트 배양 디쉬에서 1×10^5 세포/mL의 밀도로 세포를 배양하였다. 24시간동안 배양한 후에, 세포를 10, 50 및 100 μ M 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드로 1시간동안 처리하고, 이어서 48시간동안 무혈청 배지와 함께 2ng/mL TGF- β 1로 처리하였다. 50mM 트리스(Tris)-HCl (pH 8.0), 0.4% 노니데트(Nonidet) P-40, 120mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 2mM 페닐 메틸설포닐 플루오라이드, 80 μ g/mL 루페틴(leupeptin), 3mM NaF 및 1mM DTT를 함유하는 세포용해(lysis) 완충액에서 4℃로 30분동안 세포용해하였다. 세포 용해물을 10분동안 12,000 x g로 원심분리하고, 표준물질로서 소혈청 알부민을 사용하는 로우리(lowry) 방법에 의해 상청액의 단백질 농도를 결정하였다. 전체 단백질을 추출하고, 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 및 5% 농축 겔을 이용하여 100 μ g/mL 단백질을 분리하고, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켰다(아머샴 파마시아 바이오테크(Amersham Pharmacia Biotech), 영국 잉글랜드 소재). 0.1% 트윈-20 및 5% BSA를 함유하는 TBS-T 완충액을 이용하여 1.5시간동안 37℃에서 상기 막을 차단하였다. 상기 막을 TBS-T으로 2회 세척한 후에, 상기 블롯을 25℃에서 α -SMA, TGF- β 1 및 PDGF, 콜라겐 등과 같은 단백질 발현 항체와 함께 1시간동안 배양하였다. 화학발광성 ECL 분석 키트(아머샴 파마시아 바이오사이언스(Amersham Pharmacia Biosciences), 미국 뉴저지 소재)를 제조업체 설명서에 따라 이용하여 각각의 단백질을 검출하였다. LAS-3000 시스템을 이용하여 웨스턴 블롯 밴드를 시각화하고, 멀티 게이지(Multi Gauge) V3.0 소프트웨어(후지필름 라이프 사이언스(Fujifilm Life Science), 일본 도쿄 소재)에 의해 정량화하였다.
- [0058] TGF- β 1은 인간 섬유증식에서 핵심적인 매개자이다. HSC에서, TGF- β 1은 근섬유모세포-유사(myofibroblast-like) 세포로 유리하게 전이되고, ECM 단백질 합성을 촉진하며, TGF- β 1 신호 경로를 통한 분해를 억제한다. 따라서, TGF- β 1은 PDGF-매개된 경로를 통해 세포 증식을 촉진한다. 웨스턴 블롯 분석에서, TGF- β 처리는 비-처리된 군에 비해 α -SMA, TGF- β 1 및 PDGF 단백질 발현을 충분히 명확하게 증가시켰다(도 8). 이러한 자극된 α -SMA, TGF- β 1 및 PDGF 단백질 발현 수준은 48시간동안 NIPP-1 처리(10, 50 및 100 μ M/mL)에 의해 명확하게 감소하였다(도 8A).
- [0059] 역전사(RT)-PCR 분석
- [0060] RT-PCR은 TGF- β 1, α -SMA, TIMP-1,2, MMP, PDGF 및 사이토카인(TNF- α , IL-1, IL-6, IL-4)의 mRNA 발현 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 영향을 밝히기 위하여 실시하였다. TGF- β 1(2ng/mL) 처리 후에 상이한 농도(10, 50 및 100 μ M)의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드로 48시간동안 처리한 후에 LX-2 세포로부터 전체 RNA를 추출하였다. 세포를 트리졸(Trizol: 등록상표)로 세포용해하고, 15분동안 25℃에서 12,000rpm으로 원심분리한 후에 클로로포름을 첨가하였다. 상청액을 분리하고, 여기에 이소프로판올을 1:1의 비로 첨가하였다. 1000rpm으로 10분동안 원심분리하여서 RNA 펠릿을 수득하였다. 에탄올로 세척한 후에, 추출한 RNA를 다이에틸 파이로카보네이트-처리된 RNase-비함유 물에 용해시키고, GENios(등록상표) 마이크로플레이트 판독기(테칸 오스트리아 게엠베하(Tecan Austria GmbH))를 사용하여 260nm 흡광도를 측정하여서 정량화하였다. 수득된 RNA(1 μ g)를, 1x 역전사효소(RT) 완충액, 1mM의 dNTPs, 500ng의 올리고(dT) 15 프라이머, 140U의 몰로니 쥐과 백혈병 바이러스(MMLV) 역전사효소 및 40U의 RNase 억제제를 함유하는 마스터믹스(mastermix) 중에서 45분동안 42℃에서 cDNA로 역전사하였다. 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 자동 와트만써머사이클러(Whatmanthermocycler)(바이오메트라(Biometra), 영국 켄트 소재)에서 실시하여서 TGF- β 1, α -SMA, TIMP-1,2, MMP, PDGF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-4 및 글리세르알데하이드-3-포스페이트 디하이드로게나아제(GAPDH) mRNA를 증폭시켰다. 각각의 전사는 특이적 정방향 및 역방향 프라이머(프로메가 매디슨(Promega Madison), 미국 위스콘신주 소재)을 제조업체 설명서에 따라 사용하여 확인하였다. GAPDH 발현이 내부의 항존유전자(housekeeping) 대조군으로 포함되었다. 증폭 사이클을 위한 조건은 30초동안 95℃, 30초동안 55℃ 및 1분동안 72℃를 35회 사이클로 하는 것이었다.
- [0061] 48시간동안 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 처리는 α -SMA, TGF- β 1 및 PDGF mRNA의 TGF- β 자극된 발현을 억제하였다. 이들 데이터의 총체적인 분석은 상기 펩타이드 둘다가 상기 단백질의 유전자 발현에 대하여 억제 활성을 가짐을 나타낸다. 웨스턴 블롯 분석 결과와 유사하게, NIPP-1이 NIPP-2보다 높은 활성을 나타내었다(도 9).
- [0062] 중합효소 연쇄 반응(PCR) 후에, 100V에서 30분동안 1 x TAE 완충액 중 1.5% 아가로즈 겔상에서 전기영동된 생

성물은 알파이즈(AlphaEase: 등록상표) 겔 이미지-분석 소프트웨어(알파 이노테크(Alpha Innotech), 미국 캘리포니아주 샌 리엔드로 소재)를 이용하여 에티움 브로마이드로 시각화하였다. 목적하는 cDNA를 증폭하는데 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 기재되었다.

표 1

Target gene		Primers Sequence
α -Smooth Muscle Actin (ASMA)	Sence antisence	5'-AGG CAC CCC TGA ACC CCA A-3' 5'-CAG CAC CGC CTG GAT AGC C-3'
TIMP-1	Sence antisence	5'-TGA CAT CCG GTT CGT CTA CA-3' 5'-TGATGT GCA AGA GTC CAT CC-3'
TIMP-2	Sence antisence	5'-AAG CGG TCA GTG AGA AGG AA-3' 5'-GGG GGC CGT GTA GAT AAA CT-3'
MMP-1	Sence antisence	5'-ATG CTG AAA CCC TGA AGG TG-3' 5'-CTG CTT GAC CCT CAG AGA CC-3'
MMP-2	Sence antisence	5'-CCC CAA GCT CAT CGC AGA T-3' 5'-GGT CCA CGA CGG CAT CC-3'
MMP-9	Sence antisence	5'-CAC TGT CCA CCC CTC AGA GC-3' 5'-CAC TTG TCG GCG ATA AGG-3'
MMP-13	Sence antisence	5'-AAC ATC CAA AAA CGC CAG AC-3' 5'-GGA AGT TCT GGC CAA AAT GA-3'
Type 1 collagen	Sence antisence	5'-CAG TCG CTT CAC CTA CAG CA-3' 5'-GGT GGA GGG AGT TTA CAC GA-3'
Type 2 collagen	Sence antisence	5'-GGC TTC CCT GGT CTT CCT GG-3' 5'-CCA GGG GGT CCA GCC AAT -3'
PDGF	Sence antisence	5'-CCAGAA GCC ATC AGC AGC AAG-3' 5'-AGG CCC TGA GAG ATC TGT GG-3'
TGF- β 1	Sence antisence	5'-CGAGTG CCAAAT GAA GAG GAC C-3' 5'-AAACCT GAG CCA GAA CCT GAC G-3'
GAPDH	Sence antisence	5'-TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC-3' 5'-CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3'

[0063]

[0064] TGF- β 1 처리에 의해 자극된 LX-2 세포에서 TIMP 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향

[0065] TIMP-1 및 TIMP-2의 mRNA 발현 변화를 RT-PCR에 의해 TGF- β 1 처리하에 LX-2 세포에서 평가하였다. TIMP-1은 MMP 활성 및 ECM 분해의 핵심 조절자인 기질 금속단백분해효소의 특이적 억제제이다. 그러므로, TIMP는 콜라게나아제 효소 활성 억제를 통한 콜라겐 합성 감소에 대한 핵심 매개자이다. 따라서, TIMP는 섬유증과 직접 관련된 단백질이며, TIMP 발현은 섬유화 억제로 이어진다.

[0066] NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드의 부재하 또는 존재하에 TGF- β 1로 처리된 LX-2 세포에서의 TIMP-1 발현은 TIMP-2 발현과 유사하였다. 활성화된 HSC에서 mRNA 발현은 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드에 의해 감소되었다. 상기 펩타이드 둘다는 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석에서 관찰되는 바와 같이 투약량 의존적 방식으로 TIMP-1 및 TIMP-2 단백질 전사 및 유전자 발현을 감소시켰다(도 10과 11). 상기 펩타이드 둘다에서, RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석은 유사한 패턴을 나타내었다. 그러나, 이전 결과와 유사하게, NIPP-1이 NIPP-2보다 높은 활성을 나타내었다.

[0067] TGF- β 1에 의해 자극된 LX-2 세포에서 MMP 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향

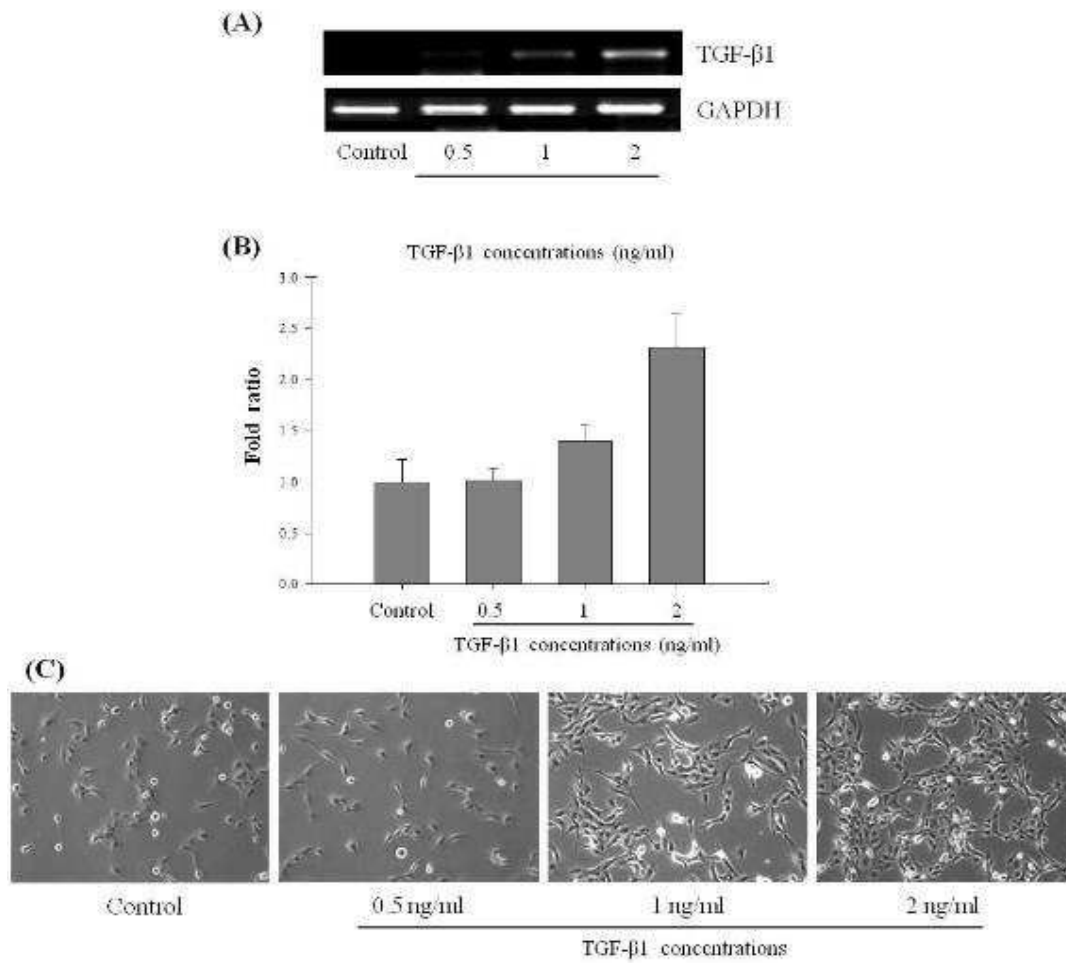
[0068] MMP는 콜라겐 섬유 분해에 중요한 역할을 한다. 따라서, MMP 활성은 HSC에서의 섬유증과 직접 관련된다. 알코올성 간 섬유증은 MMP 수준을 직접 낮추며 증가된 수준의 TIMP를 야기한다. 그러므로, 섬유증에서 MMP의 증가는 알코올성 간 독성 개선에 중요하다.

- [0069] TGF- β 1 유도된 특이적 MMP 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드 영향을 연구하기 위하여, TGF- β 1(2ng/mL)에 의해 미리 자극된 10, 50 및 100 μ M 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 펩타이드와 함께 LX-2 세포를 배양하였다. mRNA 및 단백질 수준에서의 특이적 MMP(MMP-1, -2, -9 및 -13) 발현을 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 실험에 의해 결정하였다.
- [0070] MMP의 mRNA 발현 변화는 RT-PCR에 의해 TGF- β 1 처리하에 LX-2 세포에서 평가하였다. MMP-2는 ECM 구성성분을 분해하여서 세포-기질 조성을 조절하는 것으로 널리 알려져 있다. MMP-2 mRNA 발현의 수준은 TGF- β 1으로 처리된 LX-2 세포에서 유의하게 상향 조절되었다. 총괄적으로, MMP-1, -2, -9 및 -13의 단백질 수준은 웨스턴 블롯 분석에 의해 증명되었으며(도 12와 13), mRNA 발현 수준과 동일한 패턴을 나타내었다(도 14와 15). NIPP-1 처리는 MMP-2, -9 및 -13의 단백질 수준을 유의하게 증가시켰으나, MMP-1의 단백질 수준을 전혀 변화시키지는 않았다. MMP 수준의 경우에 모든 농도에서 NIPP-1은 성공적으로 효능을 나타내었다.
- [0071] 10 내지 100mM/mL 범위 농도의 NIPP-1은 mRNA 및 단백질수준에서의 MMP-2, MMP-9 및 MMP-13의 두드러진 증가를 투약량 의존적인 방식으로 나타내는 반면, MMP-1 발현에 대하여는 영향을 주지 않았다. NIPP-2 처리는 MMP-2 및 MMP-9의 단백질 및 mRNA 발현만을 증가시켰으며, MMP-2 결과는 MMP-9보다 더 명확하였다.
- [0072] TGF- β 1에 의해 자극된 LX-2 세포에서 콜라겐 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향
- [0073] 증식인자 자극된 ECM 확장은 1형 및 2형 콜라겐을 직접 증가시킨다. 증가된 수준의 콜라겐은 섬유증과 관련되어 있으며, 따라서 1형 및 2형 콜라겐 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 연구하였다. 10 내지 100 μ M 범위 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2 처리 둘다는 HSC(LX-2)에서 1형 및 2형 콜라겐 수준을 감소시켰다(도 16과 17). NIPP-1 처리는 상기 유형 둘다의 콜라겐 수준을 투약량 의존적인 방식으로 유의하게 감소시켰다. 그러나, NIPP-2 처리는 1형 콜라겐 수준을 투약량 의존적인 방식으로 유의하게 감소시켰으나 2형 콜라겐은 100 μ M 농도에서만 감소시켰다(도 16).
- [0074] 1형 및 2형 콜라겐 수준 분석의 결과를 증명하기 위해서, 콜라겐 mRNA 발현 수준은 RT-PCR 분석에 의해 연구하였고, 1형 및 2형 콜라겐의 mRNA 발현 수준은 10, 50 및 100 μ M 농도의 NIPP-1 및 NIPP-2로 처리된 세포이었다(도 17).
- [0075] TGF- β 1에 의해 자극된 LX-2 세포에서 사이토카인 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향
- [0076] 간세포에서 알콜이나 바이러스와 같은 독소에 대한 만성 노출은 사이토카인 수준을 증가시킨다. 그러므로, 알콜 노출에 의해 감소되는 TNF- α , COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 및 IL-4와 같은 전술한 사이토카인의 단백질 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향을 웨스턴 블롯 분석에 의해 연구하였다. NIPP-1 처리는 TNF- α , COX-2, iNOS, IL-1 β 및 IL-6의 수준을 투약량 의존적인 방식으로 감소시켰다(도 18과 19).
- [0077] NIPP-2 처리는 TNF- α 의 단백질 수준에 대해서를 제외하고는 NIPP-1에 대하여 유사한 활성을 나타내었다(도 18). IL-4 경우에, 상기 펩타이드 둘다는 TGF- β 1 자극 후에 고도로 감소된 단백질 수준을 유의하게 증가시켰다. NIPP-1 및 NIPP-2는 모든 농도에서 동일한 패턴으로 IL-4 수준에 대하여 작용하였다(도 19).
- [0078] TGF- β 1에 의해 자극된 LX-2 세포에서 NF- κ B 및 MAPK 발현에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2 영향
- [0079] 간 세포에서의 알코올-유도된 염증은 NF- κ B 및 MAPK 캐스캐이드를 촉진한다. 그러므로, NF- κ B 경로에 대한 NF- κ B p65, NF- κ B p50 및 I κ B α 의 수준 및 MAPK 경로에 대한 ERK, JNK 및 p38의 수준을 NIPP-1 및 NIPP-2의 존재하에 또는 부재하에 연구하였다. 상기한 매개자의 단백질 수준에 대한 NIPP-1 및 NIPP-2의 영향을 웨스턴 블롯 분석에 의해 증명하였다. 그 결과, 상기 펩타이드 둘다는 NF- κ B 관련된 매개자에 대한 상기 펩타이드 둘다의 억제 활성을 나타내었다. 그러나, NIPP-1 또는 NIPP-2는 NF- κ B p65, NF- κ B p50 및 I κ B α 의 수준을 명확히 감소시키지만 ERK, JNK 및 p38의 단백질 수준을 감소시키지 않았다. NIPP-1 및 NIPP-2 둘다는 투약량 의존적인 방식으로 NF- κ B 캐스캐이드를 감소시켰다(도 20과 21).
- [0080]
- [0081] 통계적 분석

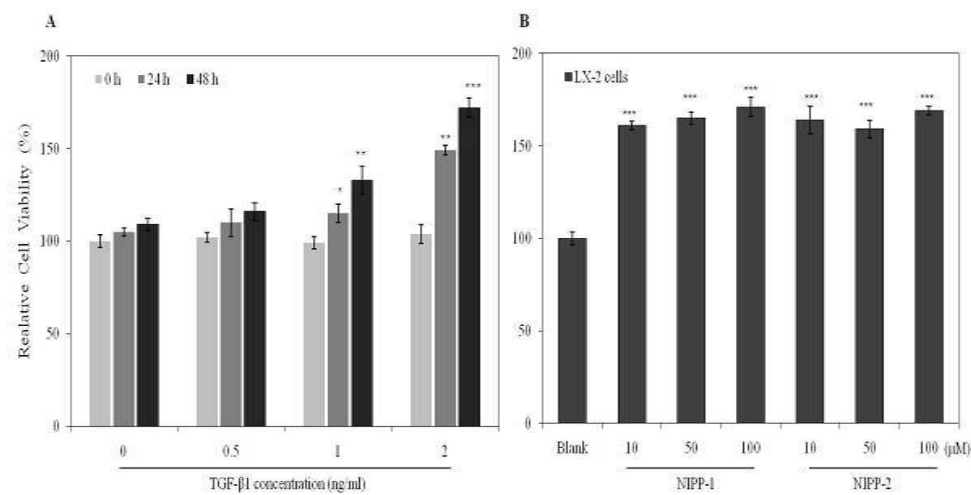
[0082] 각각의 수치는 평균 $\pm$ S.E.M(n=3)으로 표기하였다. 차이의 통계학적 유의성은 SPSS를 이용하는 스튜던트 (Student) t-테스트(미국 일리노이주 시카고 소재)에 의해 분석하였다.

도면

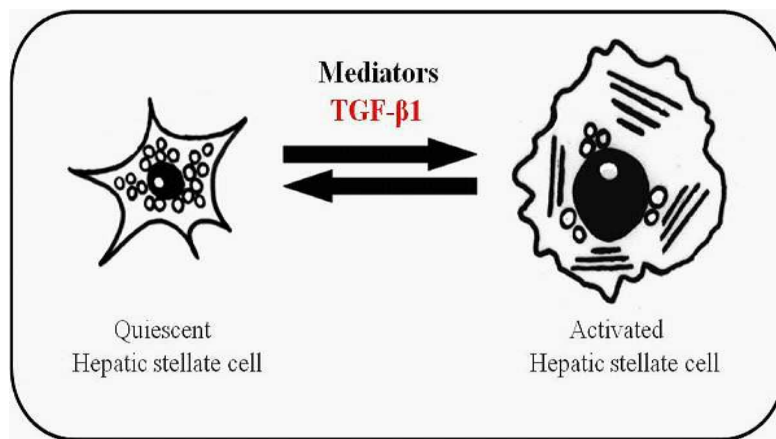
도면1



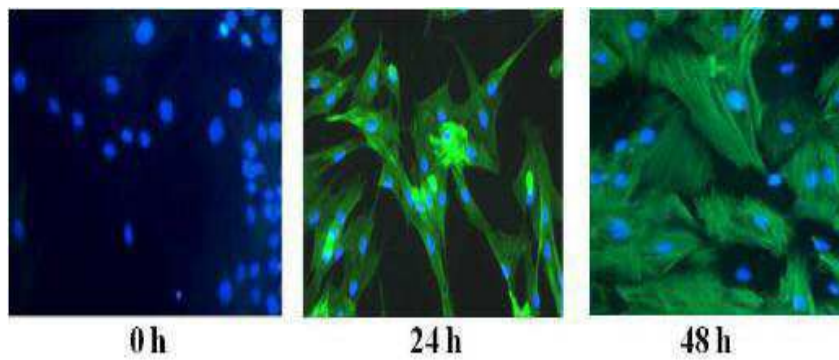
도면2



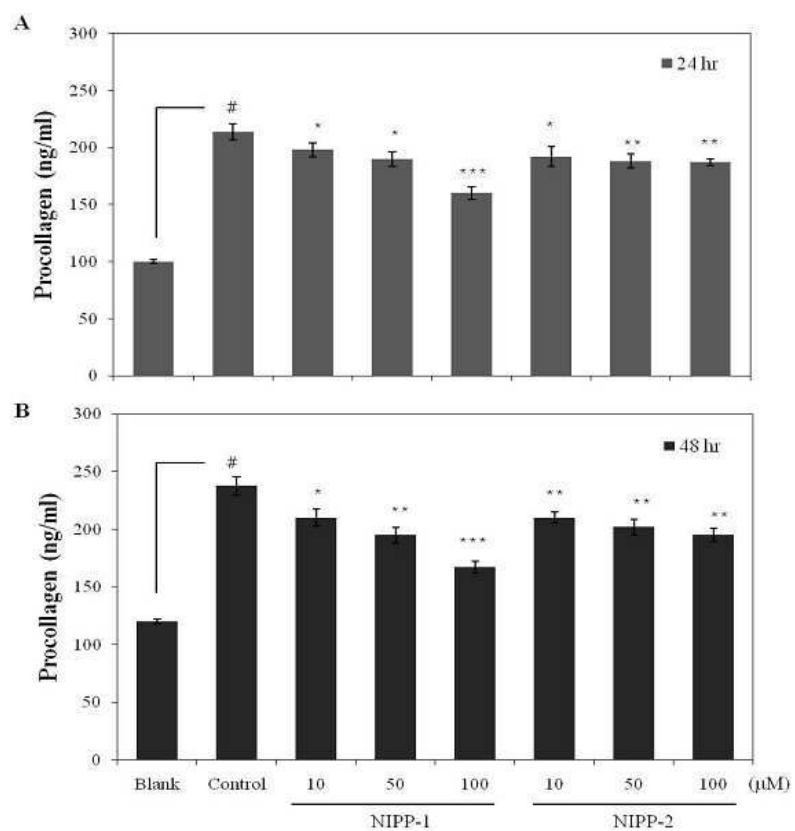
도면3a



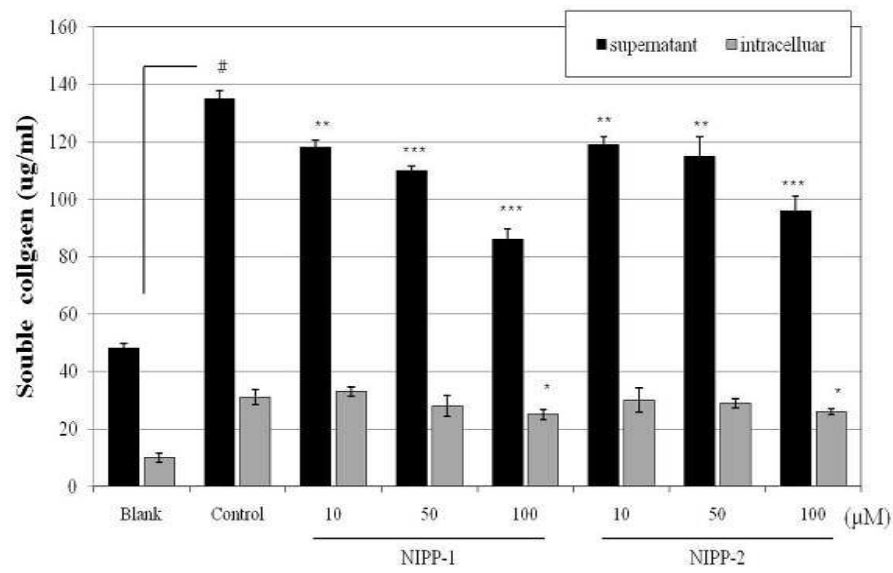
도면3b



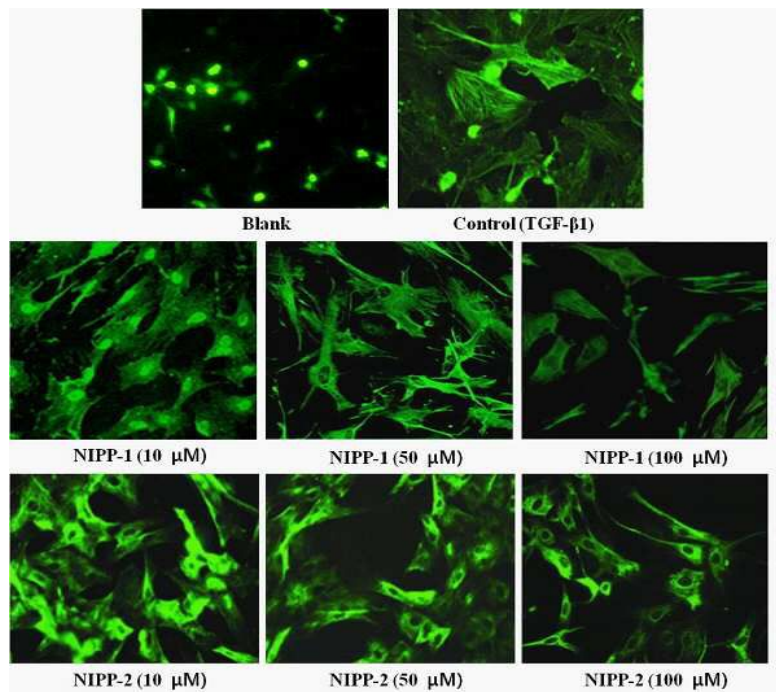
도면4



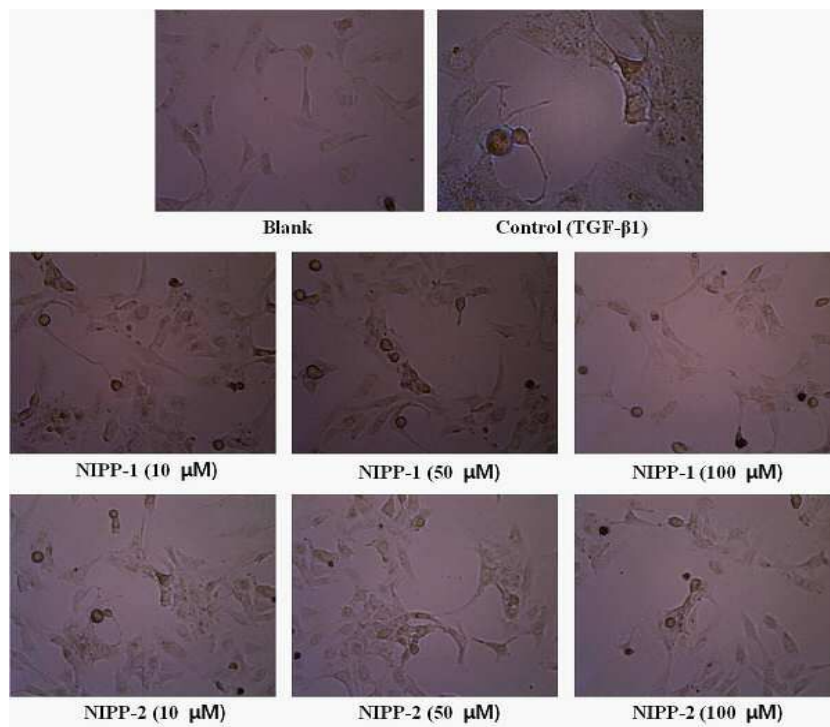
도면5



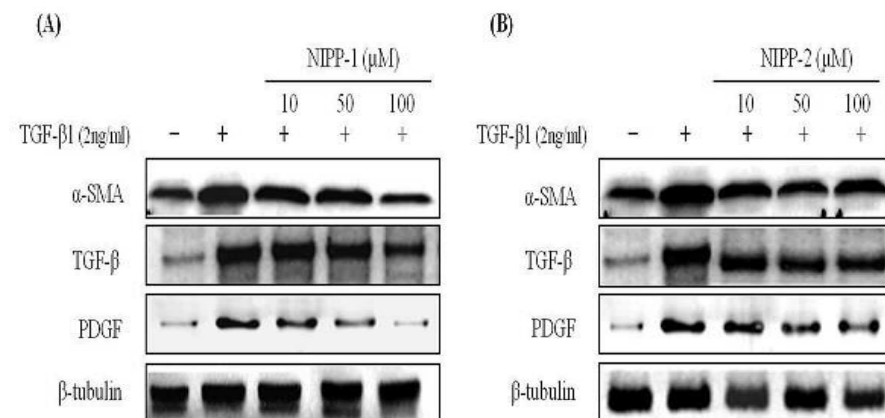
도면6



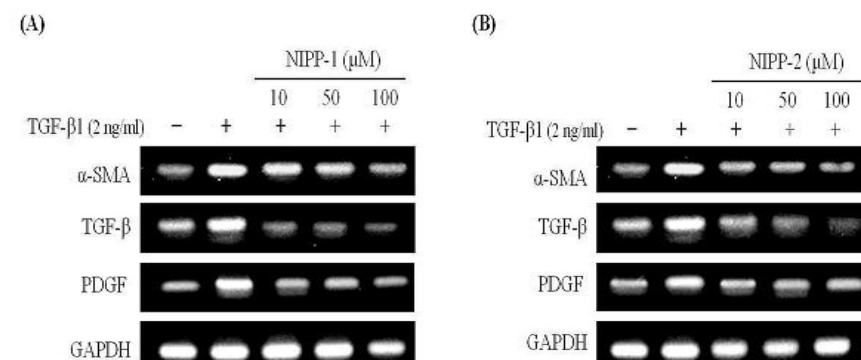
도면7



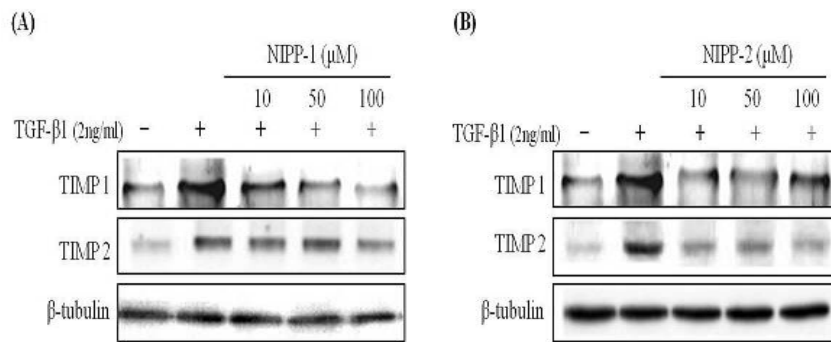
도면8



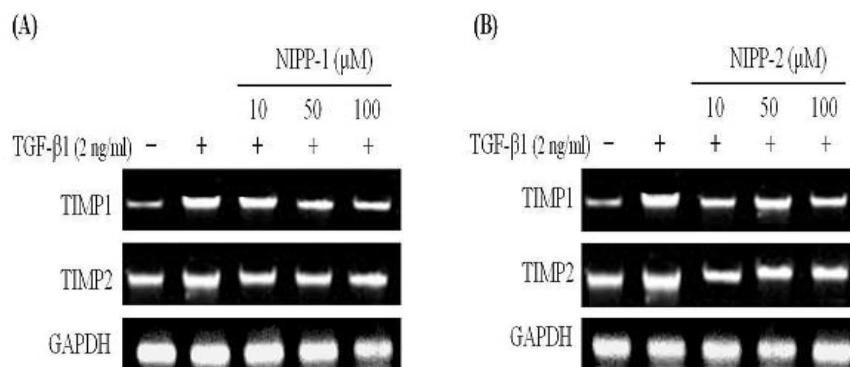
도면9



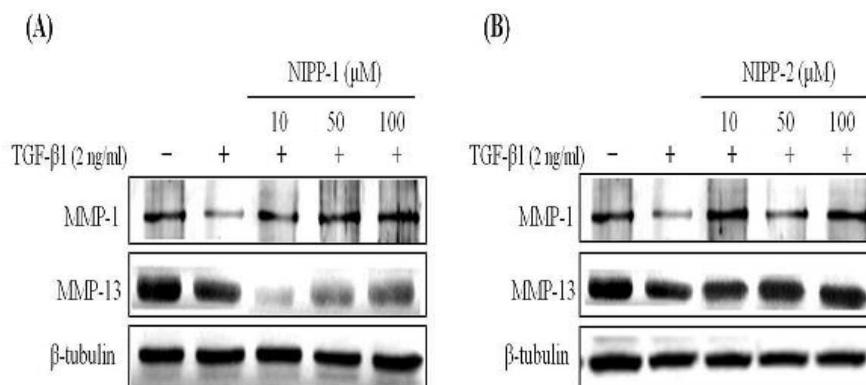
도면10



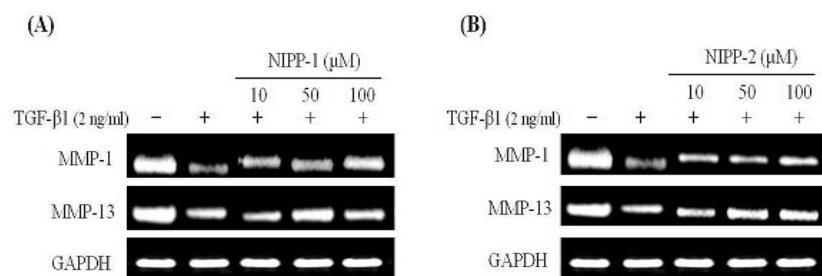
도면11



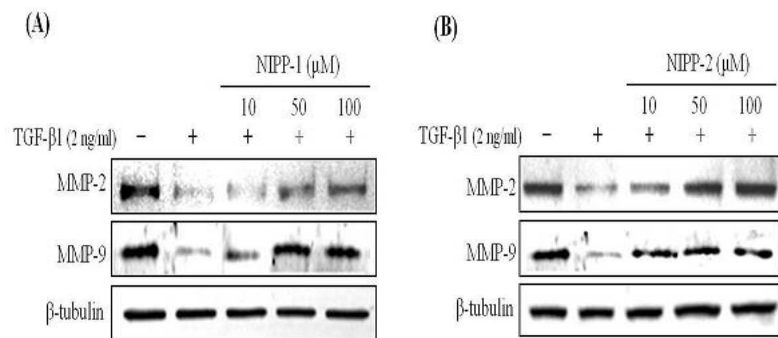
도면12



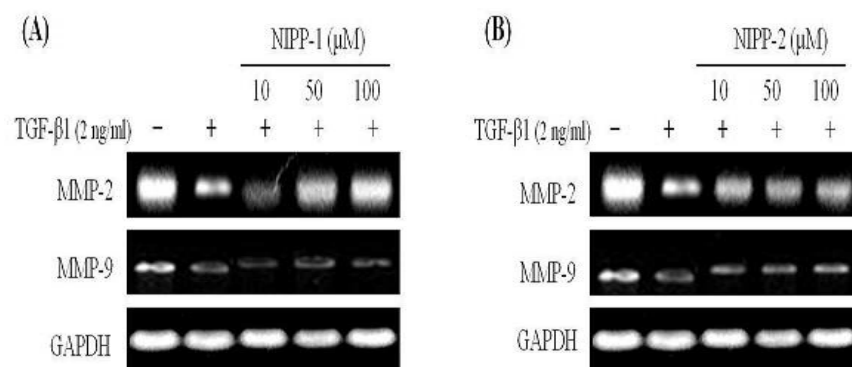
도면13



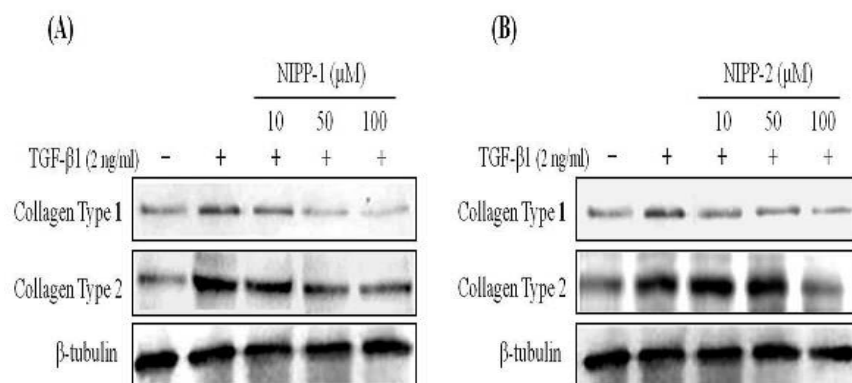
도면14



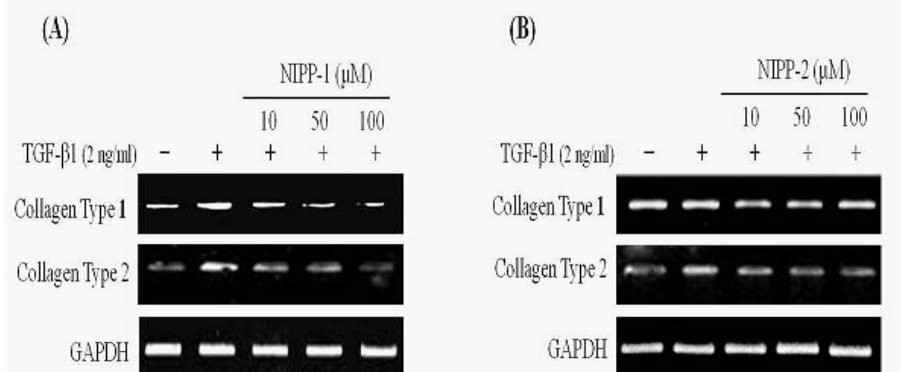
도면15



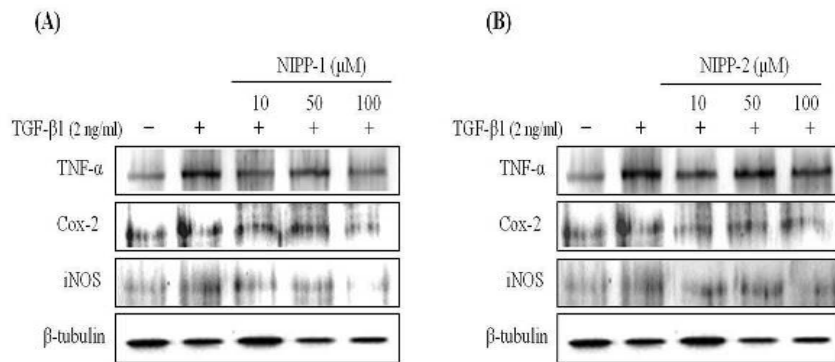
도면16



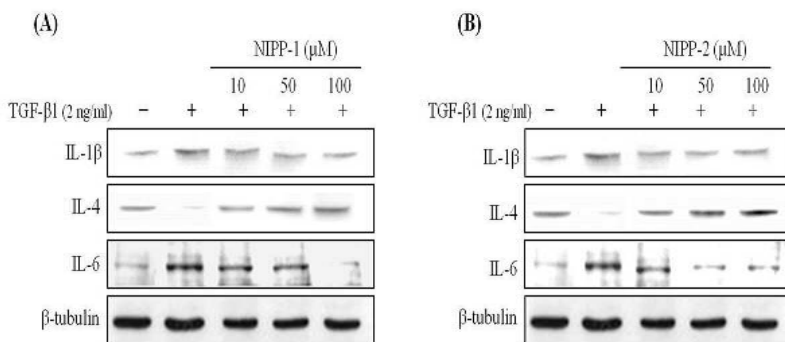
도면17



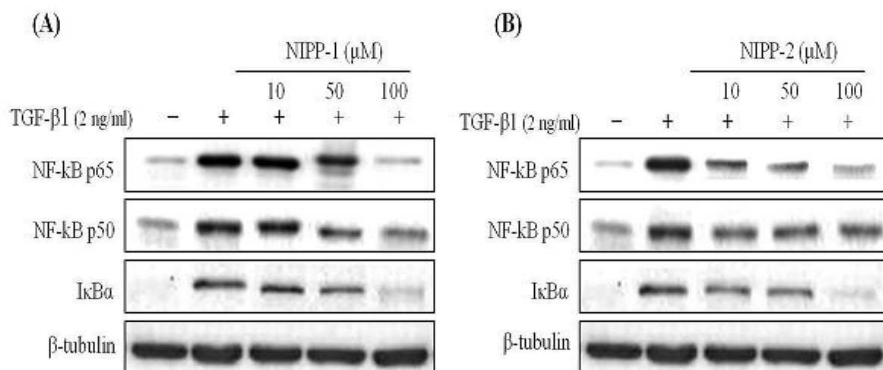
도면18



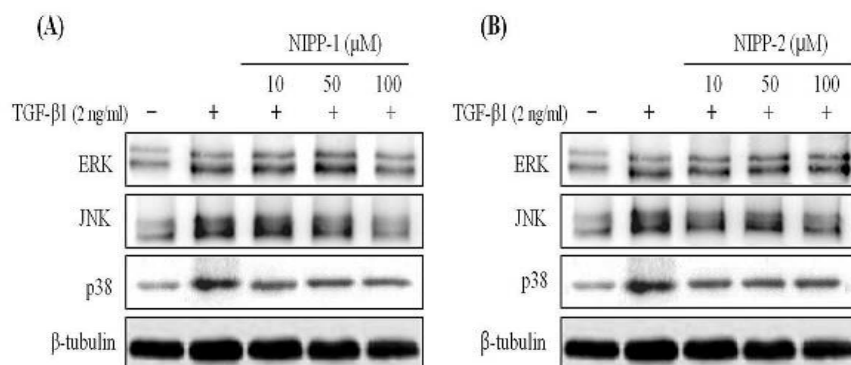
도면19



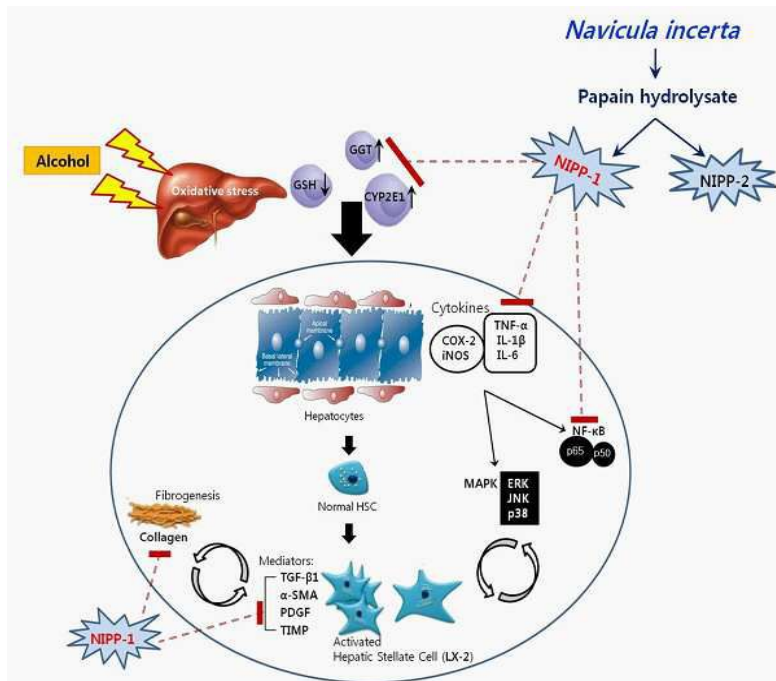
도면20



도면21



도면22



서열 목록

- <110> PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY SANHAK
- <120> Peptides derived from microalgae *Navicula incerta* protein hydrolysate for inhibiting liver fibrosis, and health food containint the same
- <130> 0000
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> NIPP-1 peptides derived from microalgae *Navicula incerta*
- <400> 1
- Pro Gly Trp Asn Gln Trp Phe Leu
- 1 5
- <210> 2
- <211
- > 9
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NIPP-2 peptides derived from microalgae *Navicula incerta*

<400> 2

Val Glu Val Leu Pro Pro Ala Glu Leu

1

5