



등록특허 10-2593487



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월23일

(11) 등록번호 10-2593487

(24) 등록일자 2023년10월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

A01K 2207/25 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0040666

(22) 출원일자 2021년03월29일

심사청구일자 2021년03월29일

(65) 공개번호 10-2022-0135088

(43) 공개일자 2022년10월06일

(56) 선행기술조사문헌

김다현의 연세대학교 의과대학 박사학위 논문, 논문제목 : The function of DLL4, a ligand of Notch signaling, in regulating metabolic disease(2020.06.30.)\*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

전경희

서울특별시 종로구 경교장길 35 경희궁자이3단지 302동 405호

강혁구

서울특별시 강서구 강서로12길 23-13, 504호(화곡동, 창대연립)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 5 항

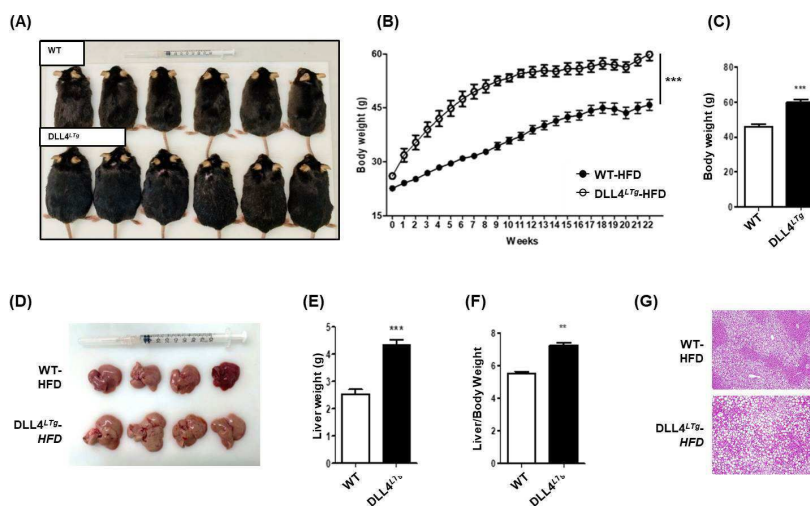
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 비알콜성 지방간염 동물모델 및 이의 제조방법

## (57) 요약

본 발명은 마우스의 간에서 DLL4 를 과발현 시키고 고지방식이를 급여하여 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델을 제조하는 방법 및 이에 의해 제조된 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델에 관한 것이다. 본 발명의 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델 제조방법은 DLL4의 과발현 및 고지방식이 급여에 따라 간 세포에 지방 축적, 간 세포의 섬유화 및 염증에 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 비알콜성 지방간염이 유발된 동물모델을 제공할 수 있다.

## 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01K 2217/052 (2013.01)  
A01K 2227/105 (2013.01)  
C12N 2015/8527 (2013.01)

(72) 발명자

**백정환**

서울특별시 서대문구 독립문로8길 54, 104동 204호(천연동, 천연뜨란채)

**김다현**

경상북도 경산시 삼성현로 347, 102동 601호(상방동, 경산남천리버뷰 우방아이유셀)

(56) 선행기술조사문헌

International Journal of Cancer and Clinical Research, 4권, 페이지 1-9(2017)

JP2020065454 A

US20180303075 A1

World Journal of Gastroenterology, 18권, 11호, 페이지 1141-1153(2012)

BBA - Molecular Cell Research, Vol.1866(10), pp.1663-1675(2019)

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

마우스의 간에서 DLL4 (Delta Like Canonical Notch Ligand 4) 과발현시키는 단계; 및  
상기 DLL4를 과발현하는 마우스에게 고지방식이를 급여하는 단계;를 포함하는 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 과발현은 DLL4 과발현 마우스와 알부민-cre 형질전환 마우스를 교배하여 수행되는 것인 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 고지방식이를 20주 내지 25주간 급여하는 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.

#### 청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 DLL4 과발현 마우스는 프로모터, 서열번호 1로 구성된 DLL4 유전자 및 loxP 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 것인, 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델 제조방법.

#### 청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 DLL4를 과발현하는 비알콜성 지방간염 동물모델 및 이를 제조하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 비알코올성 지방간 질환 (NAFLD)은 세계에서 가장 흔한 간 질환으로, 과도한 지방이 간에 저장되는 상태로 이는 과음(알코올성 간질환)으로 인한 것이 아니다. 비알코올성 지방간 질환은 간 염증 (hepatic inflammation), 섬유증 (fibrosis) 및 간세포 암종 (hepatocellular carcinoma)과 같은 주요 문제를 유발하며, 그 외에도 비만 (obesity), 인슐린 저항성 (insulin resistance), 제2형 당뇨병 (type 2 diabetes) 및 대사 질환 (metabolic disease)의 유병률 (prevalence) 증가와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 미국 인구 내 발생률 (incidence)은 25-30%로 추정되며, 점점 증가하고 있는 추세이다.

[0004] 또한 NAFLD 환자의 약 20 %가 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)을 가지고 있는 것으로 추정되는데, 비알콜성 지방간염은 섬유증을 특징으로 하는 만성 간 질환의 한 형태이다. 이 질환은 간경변 (cirrhosis) 및 간암 (liver cancer)과 같은 합병증을 유발할 수 있으며, 지방질, 조직 변성, 염증, 세포변성, 간경변, 유리 지방산의 증가 등의 병태를 겪는다. 또한, NASH는 일반적으로 고지질혈증, 고혈당증, 비만, 및 제

2형 당뇨병과 관련이 있는 것으로 알려져, 이를 치료하는 것은 비만, 인슐린 저항성, 제2형 당뇨병 및 대사 질환을 치료하는 다른 접근법으로 간주된다.

[0005] 현재 NAFLD 또는 NASH에 대한 효과적인 치료법은 알려진 바가 없다. 따라서 이러한 질환을 치료하는 방법 및 치료제를 발굴하기 위한 동물 모델을 개발하는 것이 바람직하다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 일본 공개특허 제2020-065454호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 비알콜성 지방간염 동물 모델 및 이의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0010] 1. 마우스의 간에서 DLL4 (Delta Like Canonical Notch Ligand 4) 과발현시키는 단계; 및
- [0011] 상기 DLL4를 과발현하는 마우스에게 고지방식을 급여하는 단계;를 포함하는 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.
- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 과발현은 DLL4 과발현 마우스와 알부민-cre 형질전환 마우스를 교배하여 수행되는 것인 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 고지방식을 20주 내지 25주간 급여하는 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방법.
- [0014] 4. 위 2에 있어서, 상기 DLL4 과발현 마우스는 프로모터, 서열번호 1로 구성된 DLL4 유전자 및 loxP 서열을 포함하는 벡터로 형질전환된 것인, 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델 제조방법.
- [0015] 5. 위 1 내지 5 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델.

### 발명의 효과

[0017] 본 발명의 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델 제조방법은 DLL4의 과발현 및 고지방식이 급여에 따라 간 세포에 지방 축적, 간 세포의 섬유화 및 염증에 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 비알콜성 지방간염이 유발된 동물모델을 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 DLL4를 과발현시킨 마우스의 간에 지방이 축적됨을 확인하고, 야생형 대비 DLL4 과발현한 마우스의 체중 및 간의 무게가 증가되었음을 확인한 결과이다.
- 도 2는 DLL4 과발현 마우스에 고지방 식이(high-fat diet, HFD)를 진행한 결과, 해당 마우스의 몸무게 증가 및 비알콜성 지방간염(NASH)가 발생하였음을 조직면역 염색(IHC)으로 확인한 결과이다.
- 도 3은 DLL4 과발현 마우스에 고지방 식이를 진행한 후, 지방 축적, 섬유화 및 염증에 관련된 유전자들의 mRNA 발현 수준을 정량적 PCR로 확인한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명은 마우스의 간에서 DLL4 (Delta Like Canonical Notch Ligand 4) 과발현시키는 단계; 및 상기 DLL4를 과발현하는 마우스에게 고지방식을 급여하는 단계;를 포함하는 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델의 제조 방

법을 제공한다.

- [0023] DLL4 (Delta Like Canonical Notch Ligand 4) 유전자는 *Drosophila delta* 유전자의 상동체로, 델타 유전자 패밀리는 DSL 도메인, EGF 반복 서열 및 막관통(transmembrane) 도메인으로 특징지어지는 Notch 리간드를 암호화하는 유전자로, T-세포 발달을 효율적으로 개시하기 위해 Notch 1에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 그 유래는 제한되지 않으며, 마우스의 DLL4 유전자(Gene ID: 54485)로 서열번호 1의 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 고지방식이 (high-fat diet, HFD)는 지방함량이 높은 식이를 말하며, 지방함량은 예를 들면 50 내지 70%, 60 내지 80%, 50 내지 80% 또는 60 내지 70%일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 고지방식이의 급여는 비알콜성 지방간염을 유발하는 때까지 이루어지는 것으로 그 기간은 제한되지 않으나, 예를 들면 15 내지 30주, 20 내지 30주, 22 내지 28주, 25 내지 28주일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 비알콜성 지방간염 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)은 지방 축적, 간세포 손상과 함께 염증을 동반하는 만성 간 질환으로 간섬유화, 간경변증, 간세포 암종을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한 비알콜성 지방간염은 과도하게 지방이 침착된 상태로 임상적으로 예후가 양호한 양성질환인 단순지방간(simple steatosis)과는 구분되는 것으로, 지방침착과 함께 간세포손상 및 염증이 동반되므로 5년 생존율이 67%, 10년 생존율이 59%로 낮아진다고 보고되어 있다.
- [0028] 본 발명에서 마우스의 간에 DLL4를 과발현시키는 것은 DLL4 과발현 마우스와 알부민-cre 형질전환 마우스를 교배하여 수행되는 것일 수 있고, 구체적으로 간세포에서 DLL4를 과발현하는 마우스를 제조하는 방법은 DLL4 과발현 마우스와 알부민-cre 형질전환 마우스를 교배시키는 단계; 유전자형을 확인하여 hetero type의 마우스를 선별하는 단계; hetero type의 마우스끼리 교배시키는 단계; 및 유전자형을 확인하여 homo type의 마우스를 선별하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 DLL4 과발현 마우스는 당 분야에 공지된 특정 유전자를 포함하고 있는 발현 벡터를 형질 도입하는 방법에 의해 구현될 수 있으며, 상기 발현 벡터는 프로모터, 특정 유전자, loxP 유전자를 포함하는 벡터일 수 있다.
- [0030] 상기 발현 벡터는 형질전환된 마우스를 선별하기 위한 유전자를 추가적으로 포함할 수 있으며, 예를 들면 CAT (Chloramphenicol acetyltransferase) 유전자일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 형질전환된 마우스를 선별하기 위한 유전자는 예를 들면 2개의 loxP 사이트의 사이에 위치할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 loxP 유전자는 cre/loxP 시스템의 필수 구성요소로서, 동일한 또는 별도의 DNA 조각에 위치하는 2개의 loxP 사이트가 cre 재조합 효소(recombinase)에 의해 인식되고, loxP 사이의 부위가 절단되어 부위 특이적 재조합이 유도된다. 상기 cre/loxP 시스템은 P1 박테리오파지에서 유래된 2가지 유전자(cre 및 loxP)의 발현을 조절하는 강력한 시스템으로, 특히 쥐 형질전환에 많이 이용되는 부위-특이적 재조합효소 시스템이다.
- [0033] 본 발명은 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델을 제공할 수 있다.
- [0034] 상기 비알콜성 지방간염은 지방 축적, 간세포 손상과 함께 섬유화 및 염증을 동반하는 복잡한 병리학적 특성을 나타내는 만성 간 질환으로, 간 또는 간암 세포주는 상기 병리학적 특성을 모두 반영하지 못하므로 비알콜성 지방간염의 연구 모델로서 적합하다고 볼 수 없다. 따라서 지방축적, 섬유화 및 염증 등의 병리학적 특성을 나타내는 비알콜성 지방간염 동물모델이 요구되는데, 본 발명에서는 상기 병리학적 특성에 관여하는 유전자(FABP4, CEPb, PPARg, aSMA, Col1a1, Col3a1, CCL2)의 발현이 높아진 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델을 제공할 수 있다.
- [0035] 상기 비알콜성 지방간염 마우스 동물모델은 간 조직 특이적으로 DLL4를 과발현하는 마우스에 고지방식이를 급여하여 제조할 수 있으며, 간 조직 특이적으로 DLL4를 과발현하는 마우스는 DLL4 과발현 마우스와 알부민-cre 형질전환 마우스를 교배시키는 단계; 유전자형을 확인하여 hetero type의 마우스를 선별하는 단계; hetero type의 마우스끼리 교배시키는 단계; 및 유전자형을 확인하여 homo type의 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] **실시예**
- [0040] **1. 실험 방법**

[0041] (1) 전체 RNA 분리 및 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)

[0042] RNA는 제조업체의 지침에 따라 TRIzol®시약 (Invitrogen)을 사용하여 분리되었다. 역전사-중합 효소 연쇄 반응 (RT-PCR)은 역전사 시스템 (TOYOBO) 및 표 1에 나열된 프라이머를 사용하여 수행되었다. PCR은 Ex-Taq (TaKaRa) 메뉴얼에 제공된 지침에 따라 이루어졌다. 실시간 PCR은 SYBR Premix Ex Taq (Clontech Laboratories)를 사용하여 ABI 기기 (Applied Biosystems Inc.)로 수행되었으며, 모든 결과는 베타-액틴에 의해 정규화되었다.

표 1

[0044]

프라이머	서열 (5'-3')
β-actin	정방향: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT (서열번호 2) 역방향: GGCTGTATTCCCCTCCATCG (서열번호 3)
DLL4	정방향: CAGCATCCCCTGGCAGTGTC (서열번호 4) 역방향: GCTGGCACACTTGCTGAGTCCC (서열번호 5)
CD36	정방향: GATGACGTGGCAAAGAACAG (서열번호 6) 역방향: TCCTCGGGGTCCTGAGTTAT (서열번호 7)
FABP4	정방향: TGAAATCACCGCAGACGACAGG (서열번호 8) 역방향: GCTTGTACCATCTCGTTTCTC (서열번호 9)
CEBPb	정방향: AGAAGACCGTGGACAAGCACAG (서열번호 10) 역방향: CTCCAGGACCTTGCTGCGT (서열번호 11)
Pparg	정방향: GACTGTTCGGTTTCAGAAGTGCC (서열번호 12) 역방향: ATCTCCGCCAACAGCTTCTCCT (서열번호 13)
α-SMA	정방향: CTATGCCTCTGGACGCACAACT (서열번호 14) 역방향: CAGATCCAGACGCATGATGGCA (서열번호 15)
Col1a1	정방향: CCTCAGGGTATTGCTGGACAAC (서열번호 16) 역방향: CAGAAGGACCTTGTTGCCAGG (서열번호 17)
Col1a2	정방향: ATCCAACTAAGTCTCCTCCCTTGG (서열번호 18) 역방향: CTCTGTGGAAGATAGTCAGATGG (서열번호 19)
Col3a1	정방향: GGATCAGGCCAGTGGAAATGTAAAGA (서열번호 20) 역방향: CTTGCGTGTTCGATATTCAAAGACTGTT (서열번호 21)
Col4a1	정방향: CTGGCACAAAAGGGACGAG (서열번호 22) 역방향: ACGTGGCCGAGAATTCACC (서열번호 23)
IL-10	정방향: ATCGATTCTCCCCTGTGAA (서열번호 24) 역방향: TTCCGGAGAGAGGTACAAACGA (서열번호 25)
CCL2	정방향: TAAAAACCTGGATCGGAACCAA (서열번호 26) 역방향: GCATTAGCTTCAGATTACGGGT (서열번호 27)
TNFα	정방향: CGTCAGCCGATTTGCTATCT (서열번호 28) 역방향: CGGACTCCGCAAAGTCTAAG (서열번호 29)
TNFβ	정방향: CGTCAGCCGATTTGCTATCT (서열번호 30) 역방향: CGGACTCCGCAAAGTCTAAG (서열번호 31)

[0045] (2) 웨스턴 블로팅

[0046] 세포 용해물(cell lysate) 추출은 RIPA 버퍼 (1% Triton X-100; 1% 나트륨 데옥시콜레이트; 0.1 나트륨 도데실 설페이트; 150mM NaCl; 50mM Tris-HCl, pH 7.5; 및 2mM EDTA, pH 8.0)로 준비되었다. 세포 용해물을 얼음에서 20분간 배양한 뒤, 4 °C에서 25분간 13,200 rpm로 원심 분리하였다. 상청액을 새로운 마이크로 튜브로 옮기고, 단백질 분석 시약 (Thermo Scientific)을 사용하여 상청액의 농도를 측정하였다. 단백질 샘플을 SDS-PAGE 젤에 로딩하고 PVDF 또는 니트로 셀룰로오스 멤브레인 (Merck Millipore)으로 트랜스퍼하였다. 멤브레인은 실온에서 1시간 동안 5 % 스킵 밀크 또는 BSA로 블로킹한 후, 1차 항체와 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. 멤브레인을 PBST로 10분간 3회 세척하고 HRP-접합 2차 항체 (Bethyl Laboratories)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양했다. 멤브레인을 PBST로 10분간 3회 세척하였다. FUSION SOLO S (Vilber)는 제조업체의 지시에 따라 이미지 검출에 사용되었으며, 모든 결과는 베타-액틴에 의해 정규화되었다.

[0048] (3) 조직면역 염색



[0049] 조직 표본은 4 % 파라포름알데히드 (바이오세상)으로 고정되었다. 고정된 조직은 파라핀 블록에 포매되고, 0.4  $\mu$ m 두께의 섹션으로 얇게 절단되었다. 간 슬라이드의  $\alpha$ -SMA, DLL4 및 F4 80은 제조업체의 지침에 따라 Vectastain ABC 키트 및 DAB 기질 키트 (Vector Laboratories)를 사용하여 면역 조직 화학적으로 검출되었다.

[0051] **(4) 동물 실험**

[0052] 모든 동물 실험은 연세대학교 의과 대학 기관 심의위원회의 승인을 받았으며 실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 대학 지침 (2015-0376)에 따라 특정 병원균이 없는 시설에서 수행되었다. 6주된 C57BL/6 마우스는 Orientbio에서 구입하였다. 쥐 안정화 1주 후, 60% 지방이 포함된 고지방식(Research Diets사의 60kcal% Fat)을 22 주간 먹였다 (12시간 빛 - 12시간 어둠 주기).

[0054] **(5) 마우스 형질전환**

[0055] DLL4 과발현 형질전환 마우스(BRC No: RBRC01372, ICR strain)는 Priken BRC에서, Alb-cre 형질전환 마우스 (Stock No: 003574, C57BL/6 strain, homozygous 상태로 다른 실험실에서 분양받았음)는 The Jackson Laboratory에서 구매하였으며, 간 특이적 DLL4 과발현 마우스를 제조하는데 이용하였다.

[0056] DLL4 과발현 마우스는 sperm 상태로 구매하였으며, 체외수정 (In vitro fertilization, IVF)을 진행하여 대리 모 마우스(Balb/C strain)를 통해 자손을 생산하였다. Genotyping을 진행하여 DLL4 과발현 마우스를 선별하였으며, 상기DLL4 과발현 마우스는 야생형C57BL/6 마우스와 역교배 (backcrossing)를 수행하여 DLL4 과발현 C57BL/6 를 확보한다. 이후, Homozygous Alb-cre 마우스와 확보한 DLL4 과발현 마우스를 교배하여 DLL4 과발현 (hetero) / Alb-cre (hetero) 마우스를 제작한다. 제작된 이 마우스끼리 교배하여 야생형 / Homozygous Alb-Cre 마우스와 DLL4 과발현 (homo) / Homozygous Alb-Cre 마우스를 생산한다.

[0057] Western blot, PCR 분석을 통해 DLL4 과발현 마우스의 간 조직에서 정상 쥐에 비해 DLL4의 발현이 증가되어 있는 것을 확인하였다.

[0059] **(6) 유전자형 분석 (Genotyping)**

[0060] DLL 과발현 마우스를 선별하기 위해 서열번호 2 내지 5의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 PCR 버퍼 (10X), dNTP 및 프라이머 (서열번호 32 내지 35)와 대상 마우스로부터 추출한 DNA 및 Taq polymerase(Cat. No. BM1418432, Roche)를 사용하여 수행하였으며, 조건은 94  $^{\circ}$ C로 5 분, 94  $^{\circ}$ C로 30 초, 55  $^{\circ}$ C로 30초 진행한 후, 72  $^{\circ}$ C로 60초 진행하는 단계는 35사이클 반복하고, 최종적으로 72  $^{\circ}$ C로 5분 진행하였다.

[0061] 서열번호 34 및 35에 의해 만들어지는 PCR 생산물은 324 bp로 내재적 대조군 (인터루킨-2)이고, 서열번호 32 및 33에 의해 만들어지는 PCR 생산물은 389bp로 형질전환되었음을 확인할 수 있다.

[0063] **(7) 시리우스 레드 염색**

[0064] 간 형태를 검사하고 간 섬유증을 평가하기 위해 H&E 염색과 Sirius red 염색을 각각 수행하였다. 간 표본은 10 % 중성 완충 포르말린 (Sigma)에 고정되고, 파라핀에 포매되어 4 $\mu$ m 섹션으로 절단했다. 다음으로, 표본은 표준 방법으로 파라핀 제거, 수화 및 염색되었다.

[0066] **(8) 통계적 분석**

[0067] 데이터의 통계적 평가는 평균  $\pm$  SEM으로 표시되었다. 치료군에 대한 평균 값 간의 차이의 통계적 유의성은 소프트웨어 GraphPad Prism 소프트웨어 (버전 6; GraphPad Software Inc)를 사용하여 Student 's t-test 및 일원 분산 분석 (ANOVA)에 의해 분석되었다. 데이터는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다 (\*p<0.05, \*\*p<0.01 및 \*\*\*p<0.001).

[0069] **2. 실험 결과**

[0070] **(1) HFD 유발 비만 마우스 간 조직 내 DLL4 발현 수준 상승 확인**

[0071] 먼저 Notch 신호 관련 유전자의 mRNA 발현 수준을 대조군과 HFD를 먹인 비만 마우스에서 측정하였다. 흥미롭게도 DLL4의 발현 수준은 대조군보다 HFD를 먹인 비만 마우스에서 더 높았다 (도 1A). 마우스 간에서 DLL4의 역할을 확인하기 위해 DLL4의 간-특이적 과발현 마우스 (DLL4 TG x Alb cre)가 제작되었다 (도1B). DLL4 TG 마우스에게 20주간 정상식이를 먹였을 때 수컷 마우스는 야생형 마우스 그룹에 비해 체중이 매우 증가하였고 (도 1C), 간 무게 또한 매우 증가했다 (도1D). 이러한 결과를 바탕으로 DLL4와 간 대사 사이에 관련이 있다고 가정할 수 있다.

[0073] (2) DLL4 과발현 비만 마우스는 체중이 더 높고 지방간이 악화되었다.

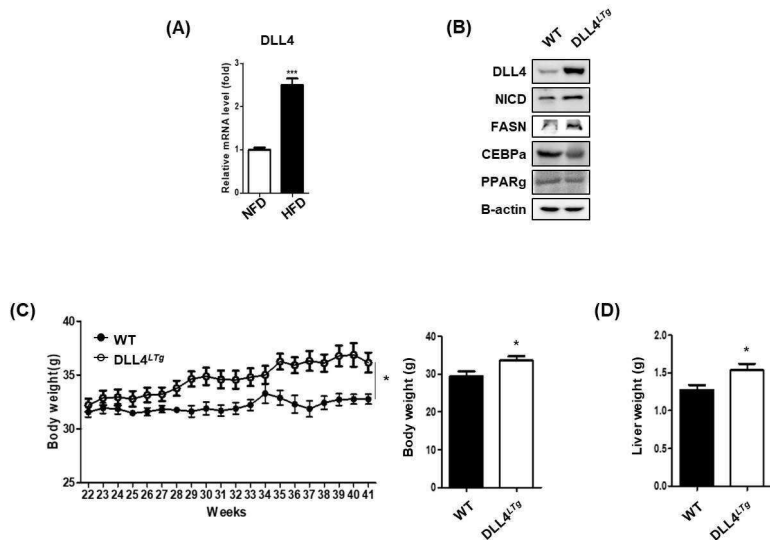
[0074] 간 특이적 DLL4 과발현 마우스 모델에 고지방식이(HFD)를 먹여 비만을 유도하고 표현형을 특성화하였다 (도 2A). HFD의 22 주 동안, DLL4 TG x Alb cre 마우스의 수컷 그룹은 WT 마우스 그룹보다 점차적으로 체중이 더 증가하였다 (도 2B). 22 주 후, DLL4 TG x Alb cre 마우스의 체중은 WT보다 훨씬 높았다 (도 2C). 또한 DLL4 TG x Alb cre 마우스의 간은 상대적으로 베이지 색이 더 많고, 더 크고 무거웠다 (도 2D-2F). 간 색전의 H&E 염색에서 DLL4 TG x Alb cre 마우스는 WT 마우스에 비해 더 많은 지질 방울이 더 많았다 (도 2G). 이러한 생체 내 데이터는 간-특이적으로 DLL4를 과발현하는 비만 마우스가 지질 축적 및 체중 증가에 더 취약함을 시사한다.

[0076] (3) DLL4 과발현 마우스는 HFD를 먹인 후 NASH 표현형이 발생한다.

[0077] 마우스 모델의 간에서 DLL4의 역할을 조사하기 위해 이들 마우스의 혈청을 분석한 결과, ALT와 AST가 모두 DLL4 과발현 마우스에서 더 높았으며, 이는 간 손상을 의미한다 (도 3A). 더욱이, DLL4 과발현 마우스의 총 TG, 포도당 수준, 총 콜레스테롤 및 유리 지방산은 WT 마우스보다 유의하게 높은 수준을 보였다. 그 후, 22주간 HFD를 먹인 WT 및 DLL4 TG x Alb cre 마우스의 간 색전을 추가 분석에 사용했다. (도 3B). H&E 염색에 의하면, 더 크고 더 많은 지질 방울이 관찰되었다. 간의 섬유증 수준을 분석하기 위해 Sirius red 염색이 수행되었다. 결과에 따르면, DLL4 TG x Alb cre 마우스는 콜라겐 분포가 더 많았다. 또한  $\alpha$ -SMA의 IHC 염색은 섬유화가 발생했음을 확실시하고 F4/80 염색은 DLL4 TG x Alb cre 마우스 간에서 더 많은 염증이 발생했음을 보여준다. 따라서 이들 간에서 NASH 마커의 mRNA 발현 수준을 분석하였다. 지질 축적, 섬유증 및 염증 관련 유전자 발현 수준은 DLL4 과발현 마우스에서 더 높았다 (도 3C-3E).

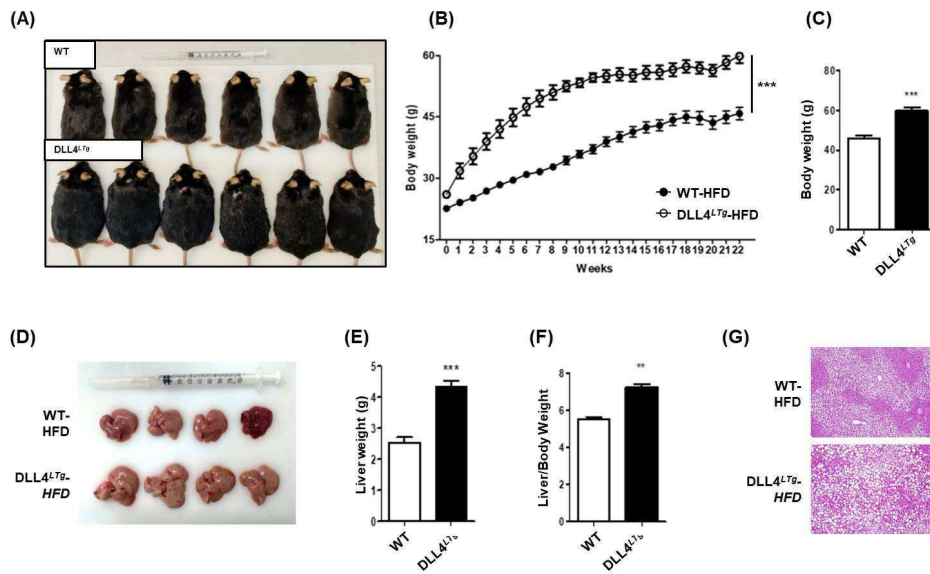
## 도면

### 도면1

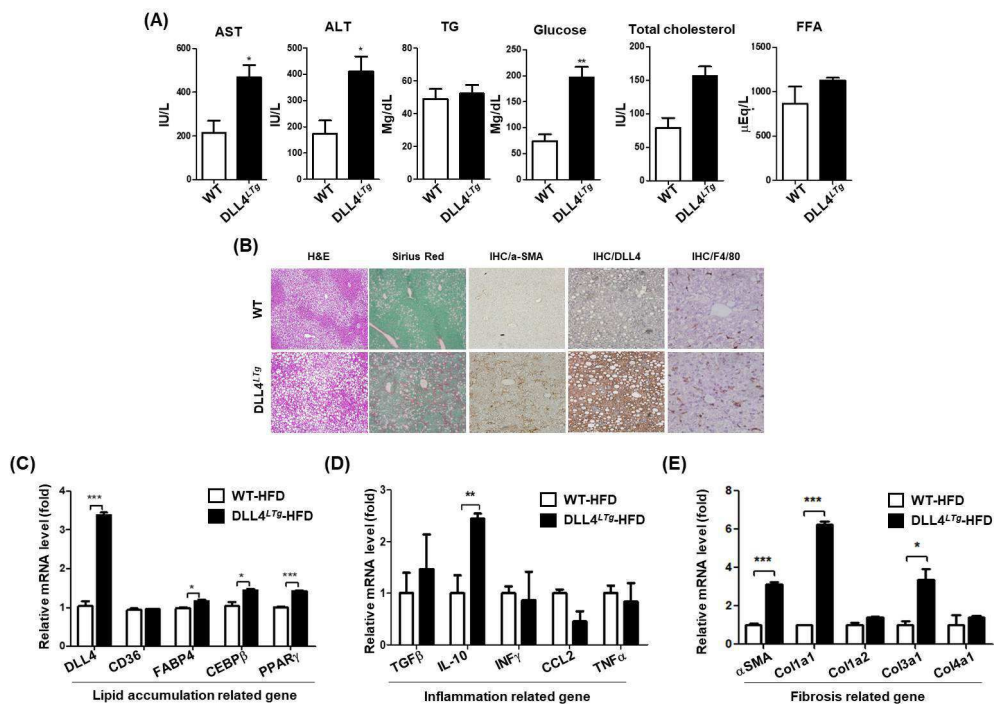




## 도면2



## 도면3



## 서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Animal model of nonalcoholic steatohepatitis and method of manufacturing the same
- <130> 21P01039
- <160> 35

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 9883

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atataagaaa ggctctggag caagcagggt tcagtagcgg cgctgctcgc aggctaggaa	60
cccgaggcca agagctgcag ccaaagtcac ttgggtgcag tgtactccct cactagcccc	120
ctcgagacc taggatttgc tccaggacac gtacttagag cagccaccgc ccagtgcgcc	180
tcacctggat tacctaccga ggcatcgagc agcggagttt ttgagaaggc gacaaggagg	240
cagcgtcccc aggggaatca gcttttcagg aactcggctg gcagacggga ctgctgggag	300
agcgacatcc ctaacaagca gattcggagt cccggagtgg agaggacacc ccaagggatg	360
acgcctgcgt cccggagcgc ctgtcgtctg gcgctactgc tgctggcggt actgtggccc	420
caggtaatgt ctcacgtcct ctccgcccc tcccgcagcg ctccgggctt gcgccccggc	480
cccggtgtag cctgaccgct ctctccctc cttctctcgg tccctgtgca gcagcgcgt	540
gcgggctccg gcatcttcca gctgcggctg caggagtctg tcaaccagcg cggtatgctg	600
gccaatgggc agtctgcga accgggctgc cggactttct tccgcatctg ccttaagcac	660
ttccaggcaa cttctccga gggaccctgc acctttggca atgtctccac gccggtattg	720
ggcaccaact cttcgtcgt cagggacaag aatagcggca gtggtcgcaa ccctctgcag	780
ttgcccttca attcacctg gccgtaagc acaacttaaa tgcaccggga gataaccgaa	840
gggaaagaag ggagcgcgg gacaccagag ctctttcca aagcgtctc tggagagccc	900
caagggtct tttctctcgc ccccgcccc ctgtttctc cataggatca tcccggagag	960
gctttgggta gtctttctc ccagtttct ccttttctt ctccccaatt cttgggatac	1020
gaatttcatt accaaacccc caacgcggcg cgcgccccc accccccggc tctcaattac	1080
actcccgcat cctcatccc tcccctgcct tctcagctc gcgcgagcgc tgcggaaca	1140
ccagttatgt tgagccgagc tccgtaacta tatctgcaa ttagattaat taaacaggct	1200
gtgctgaggc acccctcct ttcctccct gtgatatcg ctatctctaa tgtccccac	1260
ccccctttt gcttccagg gaaccttct actcaacatc caagcttggc acacaccggg	1320
agacgacctg cgccagggtg agtatctaac ttctcgcca caggggggcg acatcacaca	1380
gcgccgaaag agttaaccag ttataggcgg ggggtgggggt tggggacgca ggcttggggg	1440
gtgggggcca ggacgcttag cttggccgga gctgcgccc gcctggacg ctcgattcc	1500

gctcgtgcc tggactcaga gcacaattgc gtttcctgcg ggttatTTTT ggctgggaa	1560
cgcggggagc acggcggtga gaaaggccga ggctgccagc gccgtgacg ggcctcttcc	1620
tgtatTTTtac acTTTTtgcg aattccgctc ctttggaaag ggaataatgg ctttgggatg	1680
ttgttctgac acagaggaaa aggatatttc accagcacia caattctcac ttgaaaagg	1740
aaaaagaaaa accattacct acgtctagaa cagaaccctt tgctcccagt tctcgaacca	1800
gaaaacttcc ccttttaaat tttttctttt ttccatttt gacctctttt cctctttccc	1860
ctccgtatct gcctccacia ccctaggata tcttaacatc cgtccattgt accctTTTT	1920
gaatgctatc aagccccctg cacatgcaca caccaggga gactaagtag caagattctg	1980
ggacctctg gcctgtgctt acttgacagt agagttaatc tagataatta gagtgtgaac	2040
tgaccacatc agtcacaact aaagagagag ttggcagcag tcaactctct ctgaatcagg	2100
ttggctttct gaatcaggtt ctctgaccaa agcctctttc tgcagagact tcgccaggaa	2160
actctctcat cagccaaatc atcatccaag gctctcttgc tgtgggtaag atttggcgaa	2220
cagacgagca aaatgacacc ctcaccagac tgagctactc ttaccgggtc atctgcagtg	2280
acaactacta tggagagagc tgttctcgcc tatgcaagaa gcgcgatgac cacttcggac	2340
attatgagtg ccagccagat ggcagcctgt cctgcctgcc gggctggact gggaagtact	2400
gtgaccagcg taagtagcca ggccccctgt gagaatagaa gggatgggat ttccaaga	2460
aagcactcag aatgggtctg tgctgggtct caggaccagc tggggatgct gtactgtacc	2520
cttagtctca gagcctctc cgcagtgtt aagcctacag ggtccttatt cttcatccca	2580
tgcagtgtga tgttctccca cccctctg ccttggtccc ctttaagata accatggctc	2640
ctcttggagg ccaagagcag gaagtgagcc caggggagca ggagaggagg ttgaagcttc	2700
agagtccatg gtaccacaac ctcaccagc ccaatttctt ttccttagct atatgtctt	2760
ctggctgtca tgagcagaat ggttactgca gcaagccaga tgagtgcag taagtgggga	2820
caggaaacgg gactaggggg gctctccctt gtgagcaggt ctccatctt acactgggt	2880
ccctcttgt cttaacagct gccgtccagg ttggcagggt cgcctgtgca atgaatgtat	2940
ccccacaaat ggtgtctgct atggcacctg cagcatcccc tggcagtgtg cctgcgatga	3000
gggatgggga ggtctgtttt gtgaccaagg tgagtaaggg aaggagagat ggggtggcag	3060
ggcctgaaac tagagatggt gactggacac ctttcttggg ggtcagtaac tgactttct	3120
attattctat tattgttcaa ggacaagtct caggacttgt ctatgtgcac atgtgtgtgt	3180
gtgtgtgtgt tgtgtgtgtg tgaggtatta ggaatggaac tcagggtctc taacatacta	3240
ggcaagcact ccacctgtga gctctacccc agtcactca ctgcttttaa aggctcttta	3300
caactgacct aaaatgggat ggtgggacat tcttctccac atcctaaga gccaggatga	3360

ctaaagaggc caggggtaac agcttggcag cctgcagctc atactcataa attctagcaa	3420
gactaaagag aaaggaagg ttagcgctgt tcctctttct gcctttagt tacctattaa	3480
ccccctgagt gtttgtcac ctccaaggc tctcccctaa acagctgtct ggtggggtgt	3540
gccactggc tgcctgggc ttagccaat ccaggccttt ggatagaggg aacatgtaac	3600
tgccttttta gtgtggccac agccacctgc cttctccag tgacacttgc caggcagctg	3660
cctgagctca cacagtctct acctgacatt tgagggttgc cactcttttg cccacatagg	3720
agtcttttag ctccagtctt atagagaggg aatcttttct ttacatccc ttagccagc	3780
tgcactctcc cattttcagg gtcaagtact gtgcctgtg ccatggcaac accacacggg	3840
cctggagagg atggggagtg ggtttgcaa gctggaaaa gcttgcttag gtcctgactt	3900
attgccagaa tgaattcag tccttgtatg tttccccct tcttcccct cactcctctc	3960
ctctccccc ccgcatctct ctctctctct gacacacaga acttctcttc tttatttctg	4020
atccaacac acacacacac acacacacac atacatacac acacacacac atatacacac	4080
accacacaca cacaccacac acacacacac atatacatc acacacacac acatatacac	4140
accacacaca caccacacca cacacacata cacacataca tacacacag tacacacaca	4200
cacaccacac cacacacacc ataccacaca cacatacaca cacacacaca cctttctgc	4260
cgccacatt tgctcccagg tgacagtctg ttactcactg tatgcaaaca caacccttc	4320
aaccctctg tttgctttgt ctggctctcc ctcttcttc ttccaaca agaaaacaaa	4380
tagctatcat tcaaaataca ctttcaacac ctctttaga agatgccgt cctgcctgta	4440
gtggctctta tgccccctca ctctttccac ctgttgaatt ttactcttc ctctagtc	4500
ttccaggcat gcacctctc tatgaagcct ttctgactt cctcattggc taagggcctc	4560
ttcttcatct tgctctggtt ggaaatgttt gtgagcatc ccagcaggat gctggccaat	4620
tgtgctttgt ctccacttt tggatatact atacagtta gatgtagttt caggcgagt	4680
aatgctcagg atttcacagg cagagaaagg agggatgcct gggcctggaa aacttatgag	4740
tttaaacctt tttgggcaa atacagggtg atcttgagtg gaggtgggag agttcctggt	4800
cccactcagc tggttttttc ctgtctccac agatctcaac tactgtactc accactctcc	4860
gtgcaagaat ggatcaactg gttccaacag tgggccaag ggttatcct gcacctgtct	4920
cccaggctac actgggtgagc actgtgagct gggactcagc aagtgtgcca gcaaccctg	4980
tcgaaatggt ggcagctgta aggtgagacc cacatcagct caggaaggca caggtctaac	5040
caggtagcat ccagtcagtg tggttgtata tgcatgcatg gatgggcact ctggacaagt	5100
agaggttagg caccaacctc atacatcctt gtccatccc ccgggcccac ctttagcctg	5160

tttatattct ctctccagga ccaggagaat agctaccact gcctgtgtcc cccaggctac	5220
tatggccagc actgtgagca tagtaccttg acctgcgcgg actcacctg cttcaatggg	5280
ggctcttgcc gggagcgcaa ccaggggtcc agttatgcct gcgaatgccc ccccaacttt	5340
accggctcta actgtgagaa gaaagtagac aggtgtacca gcaaccctg tgccaatggt	5400
aagctcttct gtcaccttac caacctgctg aagtggcccc ggggccagag agcctgagaa	5460
aatcgtgagg agagagacct gtctgctatt gtggtcaggc tgactgaaac aggctcctct	5520
ttggtttgga ggggaagaa ctttatgcat tatggagagt agggcttttg agaagaaggt	5580
catcgatagg ctgtaggga gggtagtgcc catctgtatg acctctgttc ttattccatg	5640
ggtagcctc tgcctgacaa ggctagcttg tgcctcctc aggaagcctt gaattagaaa	5700
aaaggatgtt ggaggcttca cattcccttt tcaaggagg ctggtgatag agctctgtac	5760
cttgaagcct catcttcccc gacattcacc tagaacaagt gtagcacaaa gaatctggaa	5820
taccagtgc tttttgatac acagaacacg ttggtagggt atggtctaag aggcaggcag	5880
gcaggcaggc aaccattcag gagctgacaa ggccctggga gtggcaatgt gatctattcg	5940
cactctctg tgcgtggtct atactattct accttgcgtc ttcctactg atcctcaggg	6000
ctacctgtga aaggatcaaa ttctccagtt tagcagggtga ggaaaccaag actaagggat	6060
caggtgaagc tacagggtgc agatccctg ccagagagat caagccaagc atatctgtct	6120
gacctaaat tciggaagac gccagtaact attatccaat agccactgt ggcatagaga	6180
accaggatta cccagaggc caggactttg gactctttgt acagttctct gtagagagct	6240
ctctgtccac gcaggctgaa cacacggtgg tagaagagct taagctcgtg ggggagacct	6300
cattcccttc acccgggaat ccacaggcta ttgctgatgc gggtcctgtg cccttacagg	6360
aggccagtgc cagaacagag gtccaagccg aacctgccgc tgccggcctg gattcacagg	6420
caccactgt gaactgcaca tcagcgattg tgcccgaagt cctgtgccc acgggggcac	6480
ttgccacgat ctggagaatg ggctgtgtg cacctgcccc gctggcttct ctggaaggcg	6540
ctgcgaggtg cggataacct acgatgctg tgcctccgga cctgttca atggggccac	6600
ctgtacact ggctctccc caaacaactt cgtctgcaac tgtccttatg gctttgtggg	6660
cagccgtgc gagtttcccg tgggcttgcc acccagcttc ccctgggtag ctgtctcgt	6720
gggcgtgggg ctagtgtac tgcgtgtgt cctggtcatg gtggtagtgg ctgtgcggca	6780
gctgcggctt cggaggcccg atgacagag cagggaagcc atgaacaatc tgtcagactt	6840
ccagaaggac aacctaatcc ctgccgcca gctcaaaaac acaaaccaga agaaggagct	6900

ggaagtggac tgtggtctgg acaagtccaa ttgtggcaaa ctgcagaacc acacattgga	6960
ctacaatcta gccccgggac tcctaggacg gggcggcatg cctgggaagt atcctcacag	7020
tgacaagagc ttaggagaga aggtgccact tcggttacac aggtaaagcca cacctggaag	7080
cccatagctt ggicacagac ccttccatag tttagacagga tctcctaggc tgagtgggag	7140
gctggcatca ggccttggca acttttaatc aagtaagatt gtagtactga caagaagaca	7200
ctctagttaac atttatTTTT ttttgtgggg ggtgggtggg ggttttttga gacaaagttt	7260
ctctgtgtag ccctagctgt cctggaactc actttgtaga ccaggctggc ctccaactca	7320
gaaattcacc tgcctctgcc tcccagatgc tgggattaaa ggcgtgcgtc accacgccag	7380
gcttctagtt acatttctat agggacccag gcacagtggc acagactttg tagccctacc	7440
tacttaggct aagacaggag gattgctagt ttgatgctag cctgggtaac atagcagcag	7500
atcatgtctc aaaaacattg agatggctca gagagtaaag gcacctgtg ccaagcctgg	7560
tgactgaatc tgacctcag gacctacata ttagaagtcc ttttaacttct gagacggtgc	7620
agtcacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac acacacacac	7680
taatttttaa gaattctgct aggtggccgg gtgtgggtggc gcatgccttt aatcccagca	7740
ctcgggaggc agaggcaggc ggatttctga gttcgaggcc agcctggtct acaaagtga	7800
ttccaggaca gccagggcta cacagagaaa cctgtttca aaaaacaaa aaaccaaaaa	7860
aaaaaaaaa aaaaagaatt ctgctaggaa tcttttacta ggggaagtccc tctattcat	7920
tcattcattc attcattcat tcattcattc agtcttaact cccaaatacc aagtgtccac	7980
agtatatctc tcgtggttcc catcttccca cagtagggct tgtctctagt ggcaatactg	8040
gcttttttct gggttggctg gctcctgtag ctcccttaga ggctattct aacccctgc	8100
ccctgaaggc cagcactgag catctcccc gatgcctcc ccgaaccct cgggaccct	8160
gcagcacata ccctaaagg gatctctggg atctagactg acagctcctt gettgtcccc	8220
tcctattcc ttctttctta cctccctgtc ttctgttct tcagtgagaa gccagagtgt	8280
cgaatatcag ccatttgctc tcccaggac tctatgtacc aatcagtgtg ttgatataca	8340
gaagagagga acgagtgtgt gattgccaca gaggtgagtt cttccctcta agcatgtccc	8400
ctcctgcttt gtgtgggtggg aaaaaaatgt cctgttcact agcaatctca ttctgaagg	8460
ggtgggtcag agatctcttc ttgtgtgtgt agtggctctt gggtgccctg ctggcccat	8520
tgccacagag ggagtgtac tggagccagg tggatatcct gacttggcag ctgtgccagg	8580
gaaagggaca tagtcaagga gcaggagaag gctcaggcag agctttcagg aactatttcc	8640
catttgcctt tgggtgaaga cacagggtta cctgtgtctg cttctccat tgaactctc	8700
ttgtgtgtct tagagcagga ggctgagggt actaactccc tcagtgggtgt ctccatagaga	8760



ggtccagagc acctctggat cattgcatac cgcccccccc cacccecggt ataaccattt 8820  
 tcccattttg tatgtgatcc ccaggtataa ggcaggagcc tactcagaca cccagctccg 8880  
 gcccgagcagc tgggccttcc ttctgcattg ttacattgc atcctgtatg ggacatcttt 8940  
 agtatgcaca gtgctgctct gcggaggagg aggaaatggc atgaactgaa cagactgtga 9000  
  
 acccgccaag agtcgcaccg gctctgcaca cctccaggag tctgcctggc ttcagatggg 9060  
 cagccccgcc aagggaacag agttgaggag ttagaggagc atcagttgag ctgatatcta 9120  
 aggtgctctc cgaacttggc cttgctctgc caacagtggg catcatggag ctcttgactg 9180  
 ttctccagag agtggcagtg gccctagtgg gtcttggcgc tgctgtagct cctgtgggca 9240  
 tctgtatttc caaagtgcct ttgccagac tccatcctca cagctgggcc caaatgagaa 9300  
 agcagagagg aggccttgca aggataggcc tcccgcaggc agaacagcct tggagtgttg 9360  
 cattaagcag gagctactct gcaggtgagg aaagcccag gaggggacac gtgtgactcc 9420  
  
 tgcctccaac ccagtaggt ggagtgccac ctgtagcctc taggcaagag ttggtccttc 9480  
 ccctggctct ggtgcctctg ggctcatgtg aacagatggg cttagggcac gcccttttg 9540  
 ccagccaggg gtacaggcct cactggggag ctgaggcctc tcatgctaaa ctcccaataa 9600  
 gggagatggg gggaaggggg ctgtggccta ggcccttccc tccctcacac ccatttctgg 9660  
 gcccttgagc ctgggtccca ccagtgccca ctgctgcccc gagaccaacc ttgaagccga 9720  
 tcttcaaaaa tcaataatat gaggttttgt ttgtagttt attttggaa ctagtatttt 9780  
 gataatttaa gaatcagaag cactggcctt tctacatttt ataacattat ttgtatata 9840  
  
 atgtgtattt ataatatgaa acagatgtgt acaggaattt att 9883  
  
 <210> 2  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> b-actin-F  
 <400> 2  
 ccagttggta acaatgccat gt 22  
 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> b-actin-R  
 <400> 3

ccagttggta acaatgccat gt	22
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DLL4-F	
<400> 4	
cagcatcccc tggcagtgtg c	21
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> DLL4-R	
<400> 5	
gctggcacac ttgctgagtc cc	22
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD36-F	
<400> 6	
gatgacgtgg caaagaacag	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CD36-R	
<400> 7	
tcctcggggt cctgagttat	20
<210> 8	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> FABP4-F

<400> 8

tgaaatcacc gcagacgaca gg 22

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FABP4-R

<400> 9

gcttgtcacc atctcgtttt ctc 23

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEBPb-F

<400> 10

agaagaccgt ggacaagcac ag 22

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CEBPb-R

<400> 11

ctccaggacc ttgtgctgcg t 21

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PPARg-F

<400> 12

gtactgtcgg tttcagaagt gcc 23

<210> 13

<211> 22

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PPAR $\gamma$ -R  
 <400> 13  
 atctccgccacacagcttctc ct 22  
 <210> 14  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> a-SMA-F  
 <400> 14  
 ctatgcctctggacgcacaa ct 22  
 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> a-SMA-R  
 <400> 15  
 cagatccagacgcatgatgg ca 22  
 <210> 16  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Colla1-F  
 <400> 16  
 cctcagggtattgctggaca ac 22  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Colla1-R  
 <400> 17  
 cagaaggacc ttgtttgccagg 22  
 <210> 18

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Colla2-F  
 <400> 18  
 atccaactaa gtctcctccc ttgg 24

<210> 19  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Colla2-R  
 <400> 19  
 ctctgtggaa gatagtcaga tgg 23

<210> 20  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Col3a1-F  
 <400> 20  
 ggatcaggcc agtggaaatg taaaga 26

<210> 21  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Col3a1-R  
 <400> 21  
 cttgcgtgtt cgatattcaa agactgtt 28

<210> 22  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Col4a1-F  
 <400> 22

ctggcacaaa agggacgag	19
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Col4a1-R	
<400> 23	
gcttgtcacc atctcgtttt ctc	23
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10-F	
<400> 24	
atcgatttct cccctgtgaa	20
<210> 25	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IL-10-R	
<400> 25	
ttccggagag aggtacaaac ga	22
<210> 26	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCL2-F	
<400> 26	
taaaaaacct ggatcggaac caa	23
<210> 27	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CCL2-R	



<400>	27	
gcattagctt cagatttacg ggt		23
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFa-F	
<400>	28	
cgtcagccga ttgctatct		20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFa-R	
<400>	29	
cggactccgc aaagtctaag		20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFb-F	
<400>	30	
cgtcagccga ttgctatct		20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TNFb-R	
<400>	31	
cggactccgc aaagtctaag		20
<210>	32	
<211>	21	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CAT2 primer	
<400>	32	
	cagtcagttg ctcaatgtac c	21
<210>	33	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CAT3 primer	
<400>	33	
	actggtgaaa ctcacca	18
<210>	34	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oIMR0042	
<400>	34	
	ctaggccaca gaattgaaag atct	24
<210>	35	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	oIMR0043	
<400>	35	
	gtaggtggaa attctagcat catcc	25