



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

李名琚 教授指導

碩士學位 請求論文

3T3-L1 세포의 갈색지방화과정에서
NaCl과 MEK 6 transfection이
adipogenesis에 미치는 영향

2019

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

姜松珠

3T3-L1세포의 갈색지방화과정에서
NaCl과 MEK 6 transfection이
adipogenesis에 미치는 영향

李名淑 教授指導

이 論文을 碩士學位論文으로 提出함

2018年 11月

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

姜松珠

논문 개요

우리나라를 포함하여 전 세계적으로 비만인구가 급증하고 있으며 비만은 유전자, 생활습관, 식습관 등 비만유도환경에 의하여 대사증후군 등 다양한 성인합병증으로 전환되는 근원이 되고 있다. 특히, NaCl섭취는 식습관 관련 연구에서 비만발생의 원인 중의 하나로 추정되고 있지만, 관련 기전(신호전달 및 대사)에 관한 연구는 전무하다. 본 연구의 목적은 1) NaCl이 흰색지방(White FAT;WAT) 및 갈색화지방(Beige FAT; BAT)에서의 세포분화(adipogenesis)에 미치는 영향, 2) MEK6유전자를 과발현한 WAT 및 BAT에서의 비만 관련기전에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

위 목적을 달성하기 위하여 WAT-대조군(CON/W-0), WAT+Salt군(CON/W-50), BAT-대조군(CON/B-0), BAT+Salt(COB/B-50), WAT/MEK6^{+/+}(Tg/W-0), WAT/MEK6^{+/+}+Salt (Tg/W=50), BAT/MEK6^{+/+}(Tg/B-0), BAT/MEK6^{+/+}+Salt(Tg/B-50)으로 총 8군으로 설정하였다. MEK6 과발현은 대조군(Tg^{-/-})과 Tg^{+/+}으로 구분하였다.

NaCl의 농도별 세포독성검사(MTT assay)에 의하여 처치농도는 50mM로 결정하였다. MEK6의 과발현을 위한 형질전환은 chemical 방법(Lipofectamine 3000)을 이용하였다. 형질전환을 확인(PCR 방법)한 결과, 대조군에 비하여 MEK6 RNA 발현은 1.6배 높았고, MEK6의 단백질 발현은 3.5배 높았다. 갈색화유도배지(T³, insulin, rosiglitazone, IBMX 포함)를 이용한 WAT의 갈색화과정은 UCP-1 단백질 발현이 대조군에

비하여 2.5배 높은 것으로 확인하였다. 세포 분화 및 TG 합성확인(Oil Red O staining, DAPI/Nile red staining), 염증성 사이토카인 확인(ELISA assay), 에너지대사 측정(산소 소비량 분석방법) 등을 수행하였다.

WAT와 BAT 모두에서 MEK6 과발현 여부와 관계없이 NaCl을 처치하였을 때 지방구의 크기와 수가 증가하였다. 특히, MEK6 과발현($Tg^{+/+}$) WAT와 BAT는 $Tg^{-/-}$ 에 비하여 지방구의 크기와 수가 증가하였다. Adipogenesis 관련 유전자인 PPAR- γ 와 C/EBP- α 의 단백질 발현은 [Con/W-0]에 비하여 [Con/W-50]에서 모두 1.5배씩 유의적으로 증가하였다. 반면 BAT에서는 MEK6 과발현 여부와 관계없이 PPAR- γ 와 C/EBP- α 단백질 발현이 NaCl처치와 관련이 없었다. MEK6 과발현된 WAT에서는 $Tg^{-/-}$ 에 비하여 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6가 각 6.5배, 6배, 40배 증가하였고, 항염증성인자인 adiponectin은 1/10로 감소하였다. Leptin은 MEK6 과발현과 관련성이 없는 것으로 보이나 adiponectin/ leptin ratio(ALR)는 1/5로 감소하였다. 에너지소비 및 대사를 확인하는 산소소비량측정 결과, MEK6 과발현 여부와 관계없이 WAT와 BAT 모두 NaCl을 처치한 경우 대조군보다 산소소비량이 증가하였다. 반면 MEK6 과발현($Tg^{+/+}$)의 경우 $Tg^{-/-}$ 에 비해 최대 산소소비량에 도달하는 시간이 느리며 이는 대조군에서 발견되지 않는 지체역치구간이 있기 때문이었다. MEK6 과발현이 미토콘드리아의 산소소비를 결정하는 인자와 연관성이 있다는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 MEK6 과발현 및 NaCl 처치 시 WAT와 BAT의 비만관련 대사(adipogenesis, inflammation, 에너지소비량 등)가 활성화되며 WAT가 BAT보다 영향력이 더 크게 나타났다. 또한 MEK6 과발현한 WAT에서 NaCl 처치시 대조군보다 위에서 제시한 비만대사가 유의적으로 증가하였으며 BAT의 경우보다 높았다. 따라서 본 연구에서 국내외 최초로 NaCl 처치에 따라 adipogenesis가 증가하는 연계기전으로 MEK6 pathway를 제안한 것이다. 향후 *in vivo* 실험 및 임상실험을 통하여 MEK6의 pathway기전을 모두 규명한다면 NaCl 섭취증가에 따른 비만을 예방하고 한국인 NaCl섭취 기준설정에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

목 차

논문개요	
I. 서론	1
II. 연구재료 및 방법	5
1. 연구재료 및 시약	5
2. 세포배양	7
1) 3T3-L1 세포배양(Cell treatment)	7
2) 세포분화 및 갈색지방화(Differentiation and beiging)	8
3) 형질전환(트랜스펙션, Transfection)	8
4) 실험샘플 약어	10
3. 세포생존률(Cell viability)	11
4. 세포 염색(Cell staining)	12
1) Oil Red O 염색	12
2) DAPI/Nile 염색	12
5. Brad-ford Protein Assay	13
6. Western Blot Analysis	13
7. PCR Analysis	14
8. ELISA Analysis	16
9. 산소소비량분석(Oxygen Consuming Array)	17
III. 연구 결과	18
1. 세포생존률	18
2. 성질전환(Transfection) 확인	19
3. 갈색지방화 확인	20

4. NaCl에 의한 adipogenesis 증가확인	21
1) Oil Red O Staining	21
2) DAPY/Nile Staining	23
5. MEK6 과발현과 NaCl섭취에 따른 TG의 지방대사 확인	26
1) MEK6 과발현에 의한 TG 지방대사	26
2) NaCl처치에 따른 WAT와 beige fat의 TG 지방대사	28
6. 염증성사이토카인의 변화 확인	34
7. 에너지소비변화 측정 (Oxygen Consumption Array)	37
IV. 고찰	43
참고문헌	
ABSTRACT(영문초록)	

List of Tables

Table 1. Abbreviation of the control group and experimental groups	10
--	----

List of Figures

Table 1. The differentiation process of 3T3-L1.....	7
Table 2. Cell viability of pre-adipocyte 3T3-L1 cells with the various concentration of NaCl.....	18
Table 3. mRNA expression of MEK 6 in differentiated $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	19
Table 4. Protein expression of UCP-1 gene in beiged mature $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	20
Table 5. Oil Red O staining of WAT and beige fat of 3T3-L1 treated with 50mM NaCl.....	22
Fig. 6. DAPI/Nile red staining of $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$.treated with 50mM NaCl.....	25
Fig. 7. Protein expression of MEK6, pERK and adipogenesis factors on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	27
Fig. 8. Protein expression of MEK6 of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	29
Fig. 9. Protein expression of PPAR- γ of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	30
Fig. 10. Protein expression of C/EBP- α of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	31
Fig. 11. Protein expression of aP2 of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$	32

Fig. 12. Protein expression of UCP-1 of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$ 33

Fig. 13. Expression of inflammatory cytokine factors on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$35

Fig. 14. Protein expression of adiponectin and lieptin on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$ 36

Fig 15. Oxygen consumption measurement of $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$.
..... 39

Fig 16. Oxygen consumption Intensity (RFU/hr) of $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$42

I. 서론

World Health Organization(WHO)의 2016년 통계에 따르면 전 세계에서 만18세 이상의 성인 52%가 과체중 또는 비만이다[1]. 비만은 심장질환 및 뇌졸중과 같은 심혈관 질환과 당뇨병을 포함한 대사증후군 외에도 간경화, 암, 근골격계 질환의 원인이 된다[2,3]. 비만의 원인은 에너지섭취와 에너지소비의 불균형에 따라 지방조직에 지방이 축적되는 현상으로 유전적요인 외 다양한 비만유도환경(Obesogenic Environments; OE)이 그 원인이다. OE에는 호르몬이상, 과도한 식품섭취(지방, 알코올, NaCl), 신체활동부족, 스트레스 등이 해당한다[4].

많은 연구자들이 과도한 NaCl섭취의 부작용 및 그 역할에 대해 논쟁의 여지가 있으나, 소금섭취와 비만발생 간 인과관계 혹은 연관성이 있다고 추정하고 있다[5,6]. 역학 및 임상연구에서 연관성을 연구하였으나 관련 기전에 관한 연구는 미흡하다[6]. 비만관련기전으로 adipogenesis, lipogenesis, lipolysis, cell signaling, insulin resistance, inflammation, metabolic syndrome등이 제시되고 있다[7].

지방생성과정인 adipogenesis와 lipogenesis 관련 세포신호체계는 mitogen-activated protein kinase(MAPKs)와 insulin receptor substarte(IRS), reactive oxygen species(ROS) 등을 제안할 수 있다. MAPKs는 크게 p38 kinase(p38), jun amino-terminal kinases(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK)로 분류한다[8,12]. MAPKs은 각종 세포증식인자 또는 발암촉진제의 자극에 의해 활성화하는 세린과 트레오닌에 특이적인 단백질인산화효소이다. 증식인자, 인슐린, 신경성인자 등의 분화인자, 면역세포의 활성화자극 등에 의해 활성화 되며 유전자 발현, 분화, 세포 생존 및 세포 사멸 등을 포함한 다양한 세포기능을 조절하는 역할을 한다[8]. 최근 연구에서 3T3-L1 세포의 지방생성 후에 바로

MAPKs가 활성화된다는 것을 확인하였다[9]. 그 중, ERK는 지방생성인자인 proliferator-activated receptor gamma(PPAR- γ)와 CAAT/enhancer-binding protein alpha(C/EBP- α)의 발현직후에 활성화 되었다[10].

백색지방조직(White Adipose Tissue, WAT)의 역할은 에너지를 중성지방(triglyceride, TG)의 형태로 저장하는 것이다. WAT에서 에너지가 필요할 때, TG는 리파아제에 의해 지방분해과정을 거쳐서 유리지방산 및 글리세롤을 방출하게 한다[11]. JNK와 ERK의 활성화인자이며 염증인자인 TNF- α 분비는 페릴리핀 mRNA 및 단백질의 하향조절(down-regulation)로 인해 지방분해를 증가시킨다[11,12,15]. 특히, ERK는 세린600(Ser 600)에서 호르몬민감성 리파아제(hormone sensitive lipase)의 인산화에 의해 지방분해조절, 촉매 활성 증가, 지방산으로부터 유리지방산 방출 등 세포의 증식 및 분화에 중추적인 역할을 한다[10,14]. 지방생성은 세포성장, 증식 및 분화에 의해 조절되며 MAPKs/ERK(MEK) pathway가 필요하다는 것이 *in vivo*실험과 *in vitro*실험에서 증명되었다[10,16]. Pre-adipocyte인 3T3-L1세포에서 ERK가 감소됨에 따라 지방생성이 현저히 줄어들었으며 ERK가 결핍된 쥐(mice)는 지질세포가 적고, 지방 조직량이 감소되었다[17]. 지방세포특이적인 PPAR- γ 는 인산화되면 지방분화전사활성을 감소시키고 ERK는 이 과정을 억제한다[18].

소아비만 코호트 선행연구 결과, 소아비만 발생에 기여하는 유전자로 MEK6 유전자가 도출되었다.[15] MEK6는 MAPK family로 MAPK/ERK 기전에 영향을 미친다. MAPK/ERK pathway는 3T3-L1 세포 안에서 중요지방생성조절제인 PPAR- γ 와 C/EBP- α, β 의 발현을 증가시켜서 지방분화기전에 중대한 역할을 끼친다[10,19,20]. 또한, 인슐린 저항성은 실험 모델과 인간 모두에서 비만과 연관이 있으며 지방생성 자극제인 인슐린은

MAPK/ERK pathway를 활성화시킨다는 것이 정상 및 병리학적 지방형성에 대해서 연구되어 오고 있다[21,22].

Brown adipose tissue(BAT)은 WAT와 반대로 에너지를 방출하는 역할을 한다. 진핵세포의 미토콘드리아는 양성자 전기화학 농도차로 인한 잠재에너지를 adenosine triphosphate(ATP)형태로 생산하는 반면, BAT에서는 ATP 대신 세포 내막의 thermogenin 채널인 uncoupling protein-1(UCP-1)을 통해 열의 형태로 발생시킨다[23]. UCP-1의 발생은 BAT로 제한되어 있고, 조직의 열 생성 메커니즘을 제공하므로 에너지 항상성에 기여한다. UCP-1은 BAT 안의 지방산에 의하여 활성화되고, 뉴클레오타이드에 의하여 억제 된다[23,24].

BAT는 신생아에게 가장 많이 분포해 있고 나이가 들면서 점차 감소한다고 알려져 있다. WAT내에 산발적으로 존재하는 BAT는 beige 또는 brite adipose tissue라고 불리며 성인의 체내에도 존재한다. 이는 저온상태, 호르몬 등에 의해 활성화되는 갈색지방화(beiging또는 browning)에 의해 발생한다[24,25]. 3T3-L1 세포의 WAT내에서 갈색지방화는 thyroid hormones(TH)의 한 종류인 triiodothyronine(T_3)와 UCP-1 발현에 의해 일어난다[26]. WAT에서의 UCP-1발현의 증가는 비만을 예방을 위한 메커니즘으로 제안되어 왔다[26,27]. UCP-1 발현의 조절자는 p38- α 으로 염증반응, 세포사멸, 성장, 세포 분화, 종양형성 등 다양한 기전에 연관되어 있다. p38- α 인산화효소는 낮은 온도에서 활성화되며 상위활성인자인 MEK6에 의해서 조절 된다[28,29]. MEK6 유전자가 MAPK/ERK pathway의 활성화를 증가시킴으로서 지질대사가 활발해지면, p38- α 와 UCP-1이 발현이 억제되어 열발생과 에너지방출 및 발생이 감소하여 비만을 발생시킨다[29,30].

본연구의 목적은 1)비만을 촉진하는 유전자로 알려진 MEK 6을 과발현 (over expression)한 3T3-L1 세포를 제작하여 WAT에서의 에너지대사 변화를 관찰하고, 2)비만유도환경인자 중 대표적인 식이인자인 고NaCl을 투여할 경우 1)의 효과를 관찰하며 3)MEK 6을 과발현한 BAT에서도 1)과 2) 효과의 차이를 관찰하는 것이다. 따라서 고농도NaCl을 섭취할 때 WAT와 BAT의 에너지대사변화를 관찰함으로써 비만발생기전을 제안하고자 한다.

II. 연구내용 및 방법

1. 연구재료 및 시약(Reagents and Materials)

실험에 포함된 연구재료 및 시약은 다음과 같이 구입하여 사용하였다.

Bovine calf serum(Gibco, New Zealand), Fetal bovine serum(FBS, Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Germany), Dulbecco's modified Eagle's medium, penicillin-streptomycin, trypsin-EDTA (DMEM, Welgene, Deagu, Republic of Korea), insulin (Ins), dexamethasone(DEX), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), Rosiglitazon(Rosi), Triiodothyronine(T_3), Oil Red O staining powder, (Sigma-Aldrich CO., ST.Louis county, the USA), BODIPY powder, Nile red powder (Thermofisher, messachusetts, USA), Lipofectamin 3000(Invitrogen, California, USA), MTT assay powder(Duchefa Biochemie, Amsterdam, Netherland), TRIzol reagent(Ambion, California, the USA), protein assay-dye reagent, Laemmli 4x buffer(BioRad, california, USA), bovine serum albumin(BSA; Bovogen, Melbourne, Australia). Ponceau S solution(AMRESCO.Inc, Pennsylvania, USA), PPAR- γ antibody, UCP-1 antibody(abcam, Cambridge, UK), C/EBP- α antibody(Novus biologycals, Colorado, USA) , Vinculin antibody, MEK-6 antibody(Invitrogen, California, USA), ERK antibody, p-ERK antibody, leptin antibody, adiponectin antibody (Cell signaling, Massachusetts, USA), aP2(adipocyte fatty acid binding protein)(Santa cruz biotechnology, Texas, USA), ECL(GE healthcare, Chicago, USA), TRIzol reagent(Ambion,

California, the USA), PCR premix (BioNeer, Republic of Korea), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Plasminogen activator inhibitor ELISA assay kit(R&D systems, Minesota, USA), interleukin6(IL-6), interleukin 10(IL-10), interleukin1-beta(IL-1 β) (Biolegend[®], California, USA), MitoXpress oxygen consuming array kit(Agilent, California, USA).

2. 세포배양

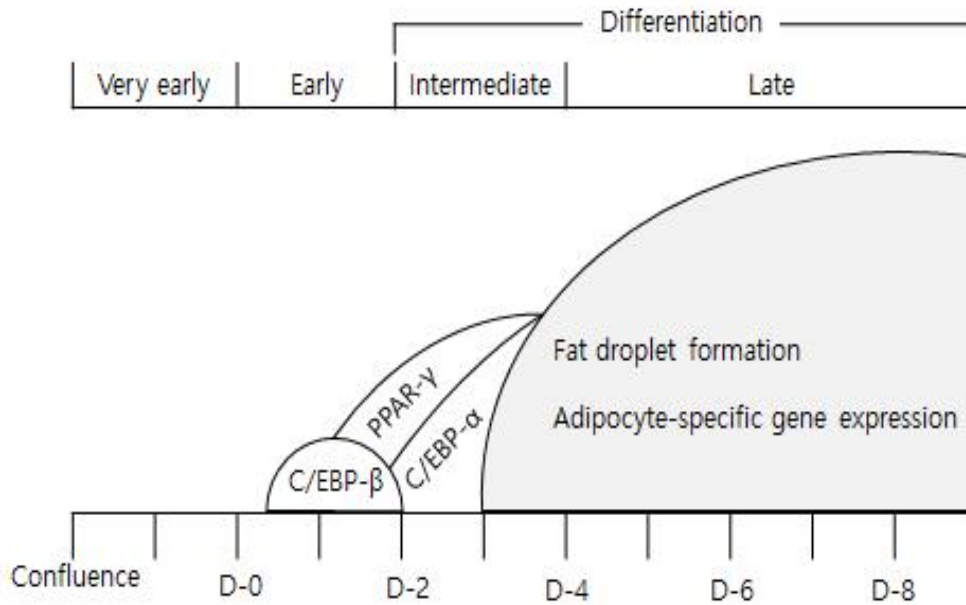


Fig. 1. The differentiation process of 3T3-L1 cells

(1) 3T3-L1 세포배양(Cell treatment) 및 NaCl처리

실험에 사용된 3T3-L1 preadipocyte는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. pre-adipocyte는 90%의 DMEM 미디어와 10%의 BCS 그리고 1%의 penicillin/streptomycin solution이 포함된 배지를 사용하여 37°C, 5% CO² 조건하에서 배양하였다. 세포수의 유지를 위하여 성장배지는 매 48시간마다 교환하였다. NaCl은 NaCl의 형태로 1M 농도의 stock을 DMEM배지에 50mM로 희석하여 사용하였으며, 배지교환때마다 새롭게 만들어 주었다. 8일째 되는날 완전히 분화된 세포를 harvest하여 3T3-L1세포의 지방 분화 및 축적 등에 NaCl이 미치는 영향을 확인하였다.

(2) 세포 분화 및 갈색지방화(Differentiation and beiging)

3T3-L1 pre-adipocyte에서 mature adipocyte로의 분화유도를 위해서 10%의 FBS-DMEM을 이용하여 배양하였다. pre-adipocyte를 세포배양 용 6well plate에 4×10^4 cells/well의 농도로 confluent 상태까지 배양한 후, MDI(0.5uM IBMX, 0.1 uM dexamethasone, 10ug/ml insulin)가 포함된 분화유도배지로 교환하여 2일(Day0-1) 동안 분화유도 하였다. 10ug/ml insulin만 첨가한 배지에 2일(Day2-3)동안 배양하여 지방세포를 성숙시켰다. 이틀마다 10% FBS-DMEM으로 교환하며 4일(Day4-7) 동안 배양하고, 8일째 되는 날 분화가 완료된 white 3T3-L1 세포를 harvest하였다.

세포의 갈색지방화(beiging)를 위해서 분화유도 배지에 50nM T_3 를 추가하여 WAT와 같은 방법으로 이틀간 분화유도하였다. 그리고 남은 6일 동안 갈색지방유도배지(10% FBS-DMEM, 10ug/ml Ins, 0.5uM IBMX, 50nM T_3 , 1uM Rosi)를 48시간 마다 교환하여 beige 3T3-L1 세포를 유도 및 배양하고, UCP-1의 단백질 발현도로 갈색지방화를 확인하였다.

(3) 형질전환(트랜스펙션, Transfection)

3T3-L1의 MEK6 과발현(over expression)을 위하여 Lipofectamine 3000을 구입하여 사용하였다. Lipofectamine3000 reagent를 이용한 형질전환은 고전적인 화학적방법(Chemical method)이다. Lipofectamine은 liposome계열로 (+) charge를 가지고 있다. (+) charge를 가진 Lipofectamine이 (-) charge인 DNA를 감싸서 (-) charge를 띠는 세포막사이를 통과하게 된다. 이때 lipofectamine자체가 lipid이기 때문에 세포에 toxic한 영향을 줄 수 있다.

본 실험에서 사용한 Lipofectamin 3000은 독성을 낮추고 transfection효율이 다른 reagent에 비해 10배정도 높은 제품이기에 선택하였다. 6 well-plate에 3×10^5 cells/well의 농도로 confluent상태까지 24시간 동안 37°C, 5% CO² 조건하에서 배양하였다. Opti-MEM, lipofectamine 3000 reagent, P3000 reagent, 그리고 DNA를 각각 250ul, 7.5ul, 5ul, 2500ng/ul만큼 섞어 DNA mater mix를 만들었다. DNA mater mix를 상온에서 15분 동안 반응시키고 250ul/well을 분주하여 섞어주었다. 3~4시간동안 37°C, 5%의 CO² 조건에서 incubate하고, antibiotics-free media를 800ul추가하여 위와 같은 조건에 다시 24시간 배양하였다.

(4) 실험샘플 약어

본 실험에서 사용한 기본 세포는 3T3-L1이며 50mM NaCl은 NaCl의 형태로 처치하였고, 형질전환(과발현, Over-expression)과 갈색지방화 실험을 하였다. 위 목적을 달성하기 위하여 WAT-대조군(CON/W-0), WAT+Salt군 (CON/W-50), BAT-대조군(CON/B-0), BAT+Salt(COB/B-50), WAT/MEK6^{+/+} (Tg/W-0), WAT/MEK6^{+/+}+Salt (Tg/W=50), BAT/MEK6^{+/+} (Tg/B-0), BAT/MEK6^{+/+}+Salt(Tg/B-50)으로 총 8군으로 설정하였다. MEK6 과발현은 대조군(Tg^{-/-})과 Tg^{+/+}으로 구분하였다.

Table1. Abbreviation of the control group and experimental groups.

실험샘플 약어	MEK 6 과발현	50mM NaCl처치	갈색지방화
Con/W-0	-	-	-
Con/W-50	-	+	-
Tg/W-0	-	-	-
Tg/W-50	-	+	-
Con/B-0	+	-	+
Con/B-50	+	+	+
Tg/B-0	+	-	+
Tg/B-50	+	+	+

3. 세포생존률(Cell viability)

MTT assay 실험을 통해 3T3-L1의 세포생존률(cell viability)을 확인하였다. 세포배양용 96 well plate에 5×10^3 /well로 동일하게 seeding하여 10% BCS-DMEM에 24시간 배양했다. 미디어 제거 후, NaCl을 0, 25, 50, 100, 150, 200mM 농도 별로 더해준 10% BCS-DMEM에서 24시간 배양하였다. 농도별 NaCl이 포함된 media를 제거해 준 후, 10% MTT assay reagent를 100ul/well씩 분주하여 2시간동안 incubate안에서 반응시켜 주었다. MTT assay reagent가 제거하고 DMSO를 100ul/well씩 넣어 30분 동안 상온에서 교반기를 이용하여 반응시켰다. Plate reader로 590nm, 650nm에서 detection하였다.

MEK6 과발현한 3T3-L1은 짧은 생존기간으로 NaCl 첨가 시, cell viability를 측정할 정도의 세포 수가 부적합하여 결과를 제시하지 않았다.

4. 세포염색 (Cell staining)

(1) Oil-Red O staining (ORO staining)

지질 축적량에 반영된 분화의 정도는 분화 8일째에 (Day 8) Oil Red O 염색으로 확인하였다. 6well culture plate에 8×10^4 /well씩 3T3-L1를 배양 및 분화하여 분화 8일째 (Day 8)에 배지를 제거하고 1x PBS를 이용하여 2회 이상 세척한 뒤, 4% para-formaldehyde에서 한 시간 동안 고정시켰다. 1x PBS로 고정액을 세척하고 완전히 건조시켰다. 세포내 생성된 lipid droplet과 특이적으로 반응하는 10% Oil Red O 용액으로 염색하고, 1x PBS로 3회 이상 세척하고 건조시켰다. 염색된 세포는 현미경으로 모니터 하였다.

(2) DAPI/Nile Staining

분화가 완료된 3T3-L1세포를 1x PBS로 세척하여 미디어를 제거하고, 4% Paraformaldehyde로 실온에서 10분 동안 고정하였다. 1x PBS로 5분씩 3회 세척한 후, 1x PBS에 Nile Red solution 과 BODIPY solution을 1:2000 그리고 1:1000으로 희석하여 세포에 더해주고 실온에서 15분간 염색시켰다. 1x PBS로 5분 동안 3번 세척하고 DAPI solution을 1x PBS에 1: 5000으로 희석하여 실온에서 30분간 세포핵 염색을 하였다. 다시 1x PBS로 5분 동안 3번 세척한 후에 각 샘플마다 wet mount만들어 Confocal Laser Scanning microscope (ZEISS, Oberkochen, Germany)으로 400배로 확대하여 모니터하였다.

5. Brad-ford protein assay

단백질농도측정은 Brad-Ford 방법을 따랐으며, 시판되는 protein assay-dye reagent를 사용하였다. 단백질농도를 측정하기 위하여 bovine serum albumin standard curve를 농도 0mg/ml부터 30mg/ml까지 측정하였다. 샘플의 단백질 농도는 BSA standard curve를 기준으로 계산하였다.

6. Western blot analysis

Trypsin-EDTA로 6well culture plate에서 분화된 3T3-L1 세포를 떼어내어 12,000 rpm, 4°C에서 10분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 pellet을 분리했다. 총 단백질 추출을 위하여 1x cell lysis buffer에 protease inhibitor 그리고 phosphates inhibitor를 1:100으로 희석하였다. Pellet양에 따라 적정한 1x cell lysis buffer을 넣고 vortex한 후, 10분간 얼음에 두는 것을 3회 반복 하였다. 12,000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 단백질이 있는 상층액을 분리하였다. 단백질농도는 Brad-Ford방법으로 정량 및 계산하였다. 단백질정량 후, 25ug의 단백질이 포함된 샘플 용액과 Laemmli 4x buffer을 섞어 100°C에서 10분간 가열시켰다. 준비된 단백질추출액을 10%NaCl dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE gel)에 100-120V전력으로 120분 동안 로딩하여 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose 또는 polyvinylidene difluoride membrane(GE healthcare, Chicago, USA)에 280mA전력으로 90분 동안 transfer하였다. 로딩한 단백질을 확인하기 위해서 20%의 Ponceau S solution으로 염색하여 밴드를 확인 하였다. Membrane은 3%

BSA 또는 5% Skim milk(Neogen, Michigan, USA)를 이용하여 1시간 이상 blocking하였다. 1차 안티바디를 3% BSA 또는 5% Skim milk에 1:1000으로 희석하여 4℃에서 16시간 이상 overnight하고, TBST로 5분씩 3회 교반기 위에서 세척하였다. 2차 안티바디는 3% BSA 또는 5% skim milk에 1:1000~10000으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시키고, TBST로 10분씩 5회 교반기 위에서 세척하였다. 단백질 발현은 ECL system(GE healthcare, Chicago, USA)과 Chemidoc system(BioRad, California, USA)으로 확인하였다.

7. Polymerase chain reaction(PCR)

(1)RNA 추출

8일째에 6well culture plate에서 분화가 완료된 3T3-L1를 1x PBS로 2회 세척하고, TRIzol reagent 1ml을 넣어 상온에 5분 동안 반응시켰다. TRIzol reagent로 3T3-L1를 모아 e-tube에 담고, 200uL의 chloroform을 더해 20초 동안 vortex하여 3분간 상온에 두었다. 12,000rpm에 10분간 원심분리하여 상층액만 새로운 e-tube에 옮겨 담고, 500mL의 Iso-propanol을 넣고 섞은 뒤에 상온에 10분간 두었다. 12,000rpm에 10분 원심분리하고 Iso-propanol층을 제거하고, 75% ethanol을 500uL 넣어 다시 12,000rpm에 5분 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 다시 12,000rpm에 1분간 원심분리하여 잔여용액을 파이펫으로 제거하고, 상온에서 5분간 자연건조 하였다. RNA free water(Welgene, Namcheon, Korea)을 pellet양에 따라 30~50ul을 넣고 nano-drop software(Thermo-fisher, Massachusetts, USA)으로 정량하였다.

(2)PCR analysis

(1)의 방법으로 정량한 RNA를 RNA mix를 만들어 주었다. RNA mix의 총 용량은 13ul을 기준으로 하여 샘플의 RNA(ng/ul)가 3ug의 양으로 mix에 들어갈 수 있도록 계산해주고, 1ul dNTP , 1ul Random reagent와 3차 증류수를 더해 주었다. 그리고 PCR기계(Biorad, california, USA)로 65℃에서 5분간 반응시켜 주었다. Master mix에는 4ul 5x FS 와 1ul 0.1-MDTT , 1ul 3차 증류수, 1ul RTase 을 섞어 총 7ul으로 만들어 주었다. RNA mix 13ul와 master mix 7ul를 섞고, Thermal cycler으로 cDNA cycle을 25℃ 5분, 50℃ 60분, 70℃ 15분으로 설정하여 cDNA를 만들었다. Premix에 1ul cDNA와 19ul primer set(reverse&forward) reagent (Cosmo-genetech, Republic of Korea)을 섞어. Thermal cycler으로 94℃ 5분 후, 36cycle(94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초)을 진행하고, 75℃에서 5분 반응시켜 RNA를 증폭시켰다. 2% agar gel에 30분 동안 전기영동 하였다.

8. ELISA Analysis

ELISA assay를 위해서 IL-1beta, IL-6, IL-10, MCP-1 등 염증인자의 ELISA MAXTM set kit를 Biolegend에서 구입하여 실험하였다. 분화가 완료된 3T3-L1 세포의 media 1ml를 e-tube에 모아서 10,000g에 10분간 spin down하고, 상층액만 새로운 튜브에 옮겨 -20℃에 보관하였다. ELISA assay 하루 전날, 1x PBS와 Wash buffer(1x PBS, 0.05% tween20), stop solution(2N H₂SO₄)를 만들어 각 용액의 특성에 맞게 냉장 또는 상온 보관하였다. 1x coating buffer를 capture antibody와 1:200 비율로 섞어 NuncTM MaxiSorpTM ELISAplate에 100ul씩 분주하여 4℃에 overnight하였다. 약 16~18시간 후, wash buffer로 4회 세척하고 1x assay diluent A solution을 well당 100ul씩 분주하고 1시간 동안 상온에 두었다. Wash buffer로 4회 세척한 후, 샘플과 standard 용액을 well당 100ul씩 분주하고 상온에 2시간 동안 교반기 위에 두었다. 다시 wash buffer로 4회 세척을 하고 1x assay diluent A solution에 1:200 비율로 희석한 detection antibody를 100ul/well씩 분주하고 상온에서 1시간동안 교반기 위에 두었다가 4회 세척을 하였다. 1x assay diluent A solution에 1:1000 비율로 희석한 avidin-HRP solution을 100ul/well씩 분주하고 상온에서 30분 동안 교반기 위에서 반응시켰다. Avidin-HRP solution반응이 끝나고 wash buffer로 5회 세척을 하였다. Wash buffer를 넣고 30초~1분간 기다린 후에 wash buffer를 제거하고 다시 세척을 진행하였다. TMB substrate solution을 100ul/well씩 분주하고 plate를 호일로 감싸 빛을 차단하여 상온에서 15분 동안 반응 시켰다. Stop solution을 100ul/well씩 더하고 15분 동안 반응 시킨 후, 흡광도 450nm와 570nm값을 측정하였다.

9. 산소소비량분석 (Oxygen Consumption Array)

산소소비량분석을 위해서 MitoXpress Xtra Oxygen consumption assay kit를 이용하였다. 96-culture plate에 3×10^4 /well만큼 3T3-L1을 seeding하여 10% BCS, 1% P/S가 포함된 배양배지에 4일, MDI(IBMx, DEX, Insulin)가 포함된 10% FBS 분화배지에 2일(Day0-1), 인슐린을 2일(Day2-3)동안 처치하고 harvest전까지 10% FBS DMEM에서 37°C, 5% CO²의 조건하에서 배양하여 지방분화를 완료시켜 주었다.

산소소비량측정 전에 37°C의 waterbath에서 따뜻하게 예열한 media를 1ml에 Xpress reagent를 섞어주었다. Xpress reagent를 cell culture media에 1:9의 비율로 희석하여 working concentration을 만들었다. 기존의 media를 제거하고 미리 만들어놓은 Xpress reagent 내용액을 100ul씩 넣고, Cell-free blank control을 측정할 wells에는 reagent를 대신하여 culture media를 동량 넣어주었다. 따뜻하게 예열한 HS미네랄 오일을 각 well에 두 방울씩 더해주고, 즉시 M5 fluorescence plate reader(Molecular devices, California, USA)로 380nm와 650nm의 wavelength로 17초마다 기록을 하도록 설정하고 90분간 모니터하였다.

Ⅲ. 연구결과 및 고찰

1. 세포생존률(Cell viability)

3T3-L1 세포에 대한 NaCl의 독성을 측정하였다. 대조군, 25, 50, 100, 150, 200 mM 농도의 NaCl을 pre-adipocyte 상태의 3T3-L1 세포에 24시간 동안 처리한 결과, 대조군에 대비하여 NaCl의 농도가 높아짐에 따라 세포생존률이 유의적으로 증가하였다(Fig. 2). NaCl 150mM 이상의 농도에서는 세포생존률이 50%이하로 cell death가 일어나는 것을 확인하였다(Fig. 1). 따라서 세포 성장에 영향을 주지 않는 50mM 농도에서 분화 조건을 결정하였다.

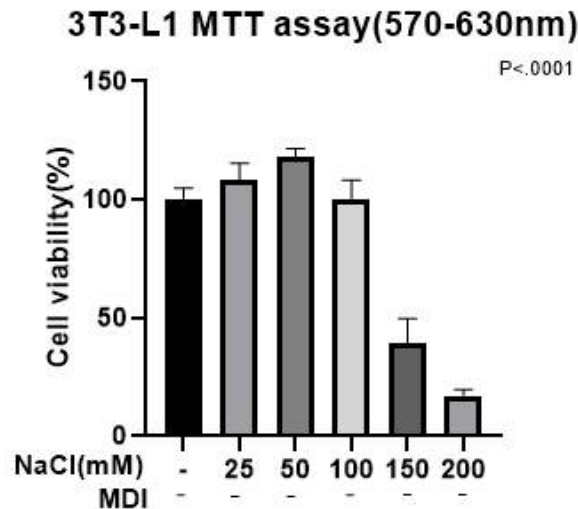


Fig. 2. Cell viability of pre-adipocyte 3T3-L1 cells with the various concentration of NaCl.

Pre-adipocyte 3T3-L1 cells were cultured in the various concentration of NaCl for 24 hours. Cell viability were measured by MTT assay. Data are shown as mean \pm S.D. of three separate experiments. Significant differences of individual NaCl treatments versus control are indicated as obtained by unpaired *t*-test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

2. 형질전환(Transfection) 확인

Lipofectamine 3000 reagent를 사용하여 3T3-L1세포 안에 MEK6 유전자를 과발현하는 형질전환을 하였다. $Tg^{+/+}$ 군은 분화 시작 전날 형질전환을 하고 $Tg^{-/-}$ 군과 같이 기존의 프로토콜에 따라 mature WAT으로 분화시켰다. $Tg^{-/-}$ 군과 $Tg^{+/+}$ 군의 MEK6 유전자 발현도 차이를 확인하기 위하여 PCR실험을 하였다. mRNA 수준의 MEK6 발현은 $Tg^{+/+}$ 군이 $Tg^{-/-}$ 군에 비해 1.5배 이상 높았다(Fig. 3, A and B). 지방분화가 완료된 mature adipocyte 3T3-L1세포의 RNA를 사용하였기 때문에, 지방분화와 대사에 영향을 주는 MEK6가 $Tg^{-/-}$ 군에서도 발현된 것을 확인할 수 있었다.

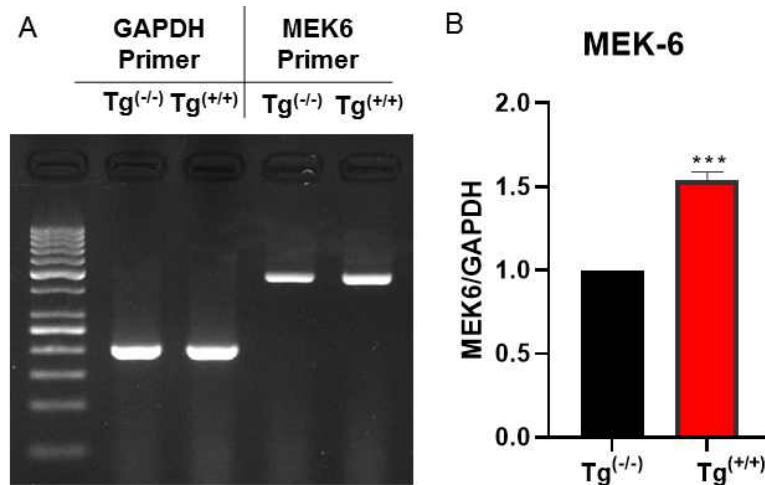


Fig. 3. mRNA expression of MEK 6 in differentiated $Tg^{-/-}$ and $Tg^{+/+}$.

mRNA expression was determined by RT-PCR. (A) Gel electrophoresis of RT-PCR products using mRNA-specific primers on RNA from $Tg^{-/-}$ cells and transfected $Tg^{+/+}$ cells. (B) Fold change value compared with controls were plotted as mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by unpaired *t*-test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

3. 갈색지방화 확인

Tg^(-/-)군과 Tg^(+/+)군의 갈색지방유도 배지에 의한 갈색지방화를 확인하기 위하여 BAT의 유일한 확인인자인 UCP-1 유전자의 단백질 발현을 western blot analysis을 진행하였다. Con/w-0에 비하여 Con/B-0과 Tg/B-0의 UCP-1 발현이 각각 2.5배, 1.8배 증가하였다(Fig. 4). Con/B-0가 Tg/B-0에 보다 약 1.4배 증가하였다(Fig. 4). Beiging reagent와 protocol에 의한 갈색지방분화유도가 정상적으로 일어났다는 것을 뜻한다.

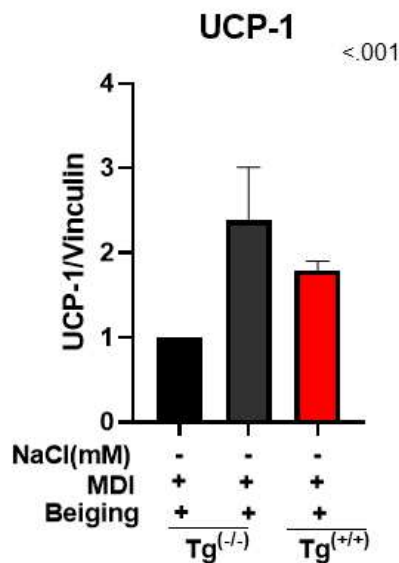


Fig. 4. Protein expression of UCP-1 gene in beiged mature Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

Protein expression of UCP-1 gene was determined by western blotting. All data are shown as mean \pm S.D. of three separate experiments. Significant differences of individual NaCl treatments versus control are indicated as obtained by unpaired ANOVA-test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

4. NaCl에 의한 adipogenesis 증가 확인

(1) Oil Red O 염색 (Oil Red O staining)

NaCl에 의해 3T3-L1 세포의 지방합성이 증가하는지 확인하기 위하여, 지방을 특이적으로 염색하는 Oil Red O 염색실험을 일차적으로 진행하였다. Con/W-0군에 비해 50mM NaCl을 처치한 Con/W-50군의 지방구 (Lipid droplet)의 크기가 크고, 양이 현저히 많았다(Fig.5A). 이를 통해 NaCl이 WAT의 지방합성에 영향을 준다는 것을 확인할 수 있다. 3T3-L1의 갈색지방화를 위하여 기존 분화배지에 T³와 Rosi를 추가하여 mature adipocyte로 분화시킨 후, WAT과 같은 조건으로 beige 3T3-L1 세포의 지방에 ORO염색을 하였다. Con/B-50군에서의 지방합성이 Con/B-0보다 증가하였다(Fig.5A).

WAT와 beige의 염색정도를 보다 정확하게 비교하기 위하여 현미경으로 염색된 지방을 모니터하였다. WAT가 beige보다 전체적인 지방구의 수가 많고, 크기가 비대해졌다. 특히, 50mM NaCl을 처치한 Con/W-50의 지방구의 크기와 수가 다른 군들에 비해 현저히 크고 많았다(Fig. 5, A and B). 이를 통해 지방형성 및 성장에 NaCl이 영향을 준다는 것을 확인하였다(Fig. 5, A and B).

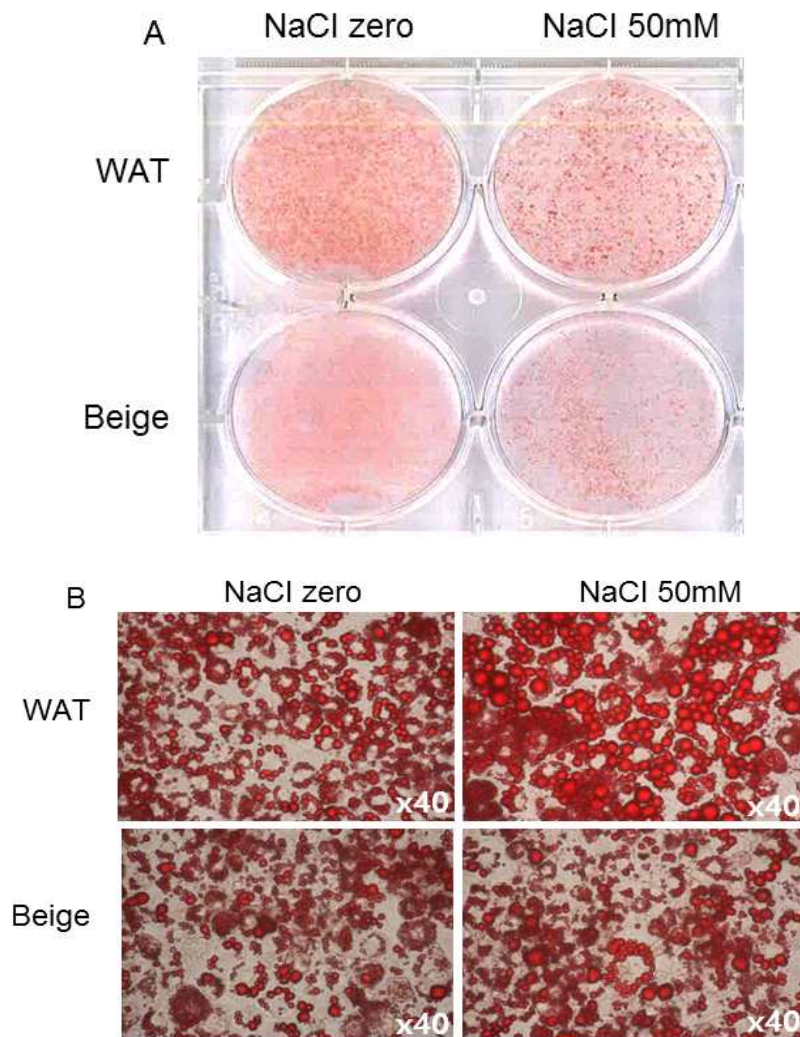


Fig. 5. Oil Red-O staining of WAT and beige fat of 3T3-L1 treated with 50mM NaCl.

Effect of NaCl on adipocytes differentiation and adipogenesis by Oil Red O staining for lipid droplets confirmed adipocyte differentiation of WAT 3T3-L1 adipocyte and induced beige 3T3-L1 adipocyte. (A) The WAT and beige fat accumulation in cells with 50mM of NaCl on day 8. (A) were taken picture the plate. (B) was taken picture by microscope at 400x magnifications.

(2) DAPI/Nile red staining

Oil Red O 염색 실험을 통하여, 3T3-L1세포의 WAT와 beige fat의 지방합성에 미치는 NaCl을 영향을 확인하였다. 하지만 $Tg^{+/+}$ 군은 NaCl과 transfection reagent의 독성에 의해 세포생장과 성장에 부정적인 영향으로 인한 cell death가 일어날 수 있다. 세포의 생존여부와 NaCl에 의한 지방합성 증가를 함께 확인하기 위하여 살아있는 세포핵을 염색하는 DAPI와 특이적으로 TG를 염색하는 Nile red를 이용하여 DAPI/Nile red염색 실험을 하였다.

$Tg/W-0$ 은 핵의 수가 $Con/W-0$ 에 상대적으로 적었다. 하지만 beige로 유도한 $Con/B-0$ 의 염색된 핵의 수가 $Tg/W-0$ 와 비슷한 것을 보면, transfection reagent 독성이 세포에 특이적인 부작용을 주어서 cell death가 일어난다고 할 수 없다(Fig. 6, A and B).

WAT 확인 결과, 대조군에 비하여 MEK6가 과발현된 $Tg/W-0$ 에 형성된 지방구의 수가 두드러지게 많다. 지방구의 크기는 전체적으로 비슷하나 $Con/W-0$ 에 비하여 $Tg/W-0$ 에는 부분적으로 커다란 지방구가 존재한다(Fig. 6A). 50mM NaCl을 처치한 WAT는 대조군에 비하여 지방구가 집약적으로 분화하였다. $Tg/W-50$ 은 $Con/W-50$ 에 상대적으로 집약적으로 모인 지방세포의 양이 많아 크기가 크고 많다(Fig. 6A).

Beige fat에서도 WAT와 같은 경향으로 $Tg^{+/+}$ 군이 $Tg^{(-/-)}$ 군보다 지방합성이 증가하였다(Fig. 6B) NaCl을 처치한 군의 지방합성과 성장이 NaCl을 처치 하지 않은 군에 비하여 상대적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6B).

$Tg^{+/+}$ 군에서의 지방구의 수와 크기가 $Tg^{(-/-)}$ 군에 상대적으로 증가한 것을 통해 MEK6의 과발현이 adipogenesis에 긍정적인 영향을 준다는 것

을 확인하였다(Fig. 5, A and B). 두 개의 $Tg^{(+/+)}$ 군과 $Tg^{(-/-)}$ 군 모두 beige fat의 지방 합성이 WAT에 비하여 적었다(Fig. 5, A and B). NaCl 처치가 adipogenesis에 미치는 영향이 지방의 종류에 따라 다르다. NaCl 처치는 $Tg^{(-/-)}$ 군과 $Tg^{(+/+)}$ 군의 WAT에서 지방 형성과 성장에 긍정적인 영향을 주는 것으로 보인다.

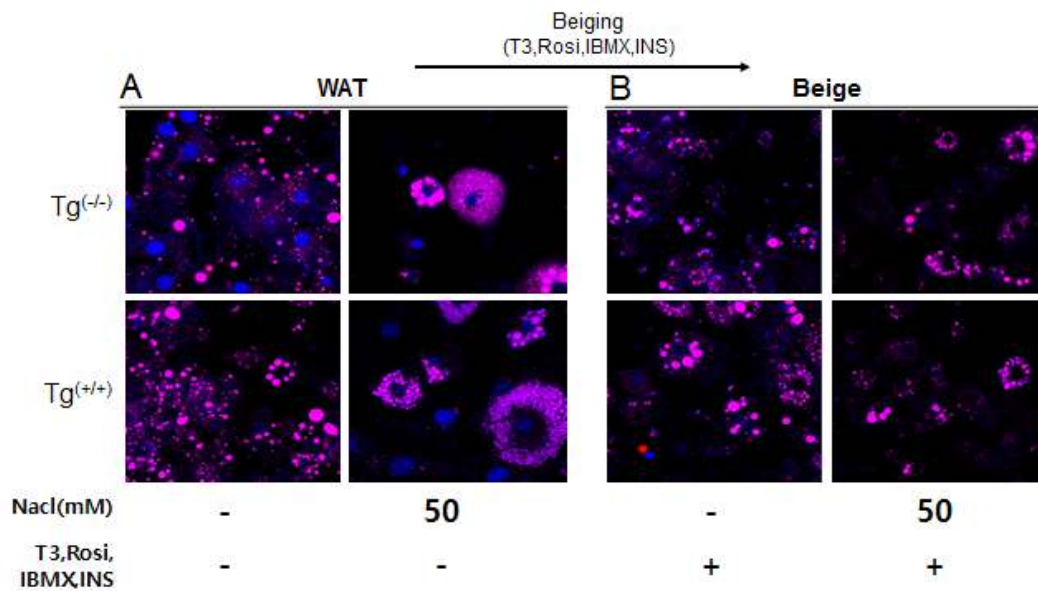


Fig. 6. DAPI/Nile red staining of Tg^(-/-) and Tg^(+/-) treated with 50mM NaCl.

Effect of 50mM NaCl in adipogenesis on Tg^(-/-)Cells and Tg^(+/-)Cells stained with DAPI(blue), BODYPI(blue) and Nile red staining. Tg^(-/-)Cells and Tg^(+/-) cells were differentiated with INS, IBMS, DEX in 10% FBS DMEM. Tg^(+/-) cells were transfected by Lipofectamine 3000 with the manual protocol of Lipofectamine 3000. Ins, IBMX, T³, Rosi were used for beiging on both type of cells. 3T3-L1 adipocytes were fixed with p-formaldehyde, stained with DAPI, then Nile red staining for lipid droplets. (A) and (B) Comparison stained nucleus and lipid droplets of WAT and beige fat of Tg^(-/-) and Tg^(+/-). Fluorescent images were captured at X400 magnification by confocal laser scanning microscope.

5. MEK6 과발현과 NaCl처치에 따른 TG의 지방대사 확인

고NaCl섭취가 지방합성과 성장을 증가시키는 것을 ORO와 DAPI/Nail Red 염색실험으로 확인하였다. MEK6유전자와 고NaCl섭취가 지방분화와 대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 western blot 실험 진행하였다.

(1) MEK6 과발현에 의한 TG 지방대사

MEK6유전자는 비만을 촉진하는 유전자이며 ERK의 상위조절인자이다. WAT에서 MEK6가 지방대사에 미치는 영향을 확인하기 위하여 $Tg^{(-/-)}$ 와 $Tg^{(+/+)}$ 를 비교 하였다. $Tg^{(+/+)}$ 의 MEK6와 pERK/ERK 단백질 발현이 $Tg^{(-/-)}$ 보다 3.5배, 1.5배 증가하였다.(Fig. 7A). 비만대사관련 유전자인 PPAR- γ , C/EBP- α , aP2 단백질 발현이 각각 약 4배, 3배, 1.5배 증가하였다(Fig. 7B). MEK6의 과발현에 의해 MEK/ERK pathway가 비만관련 유전인자를 자극하여 adipogenesis 또는 lipogenesis가 활성화 된다.

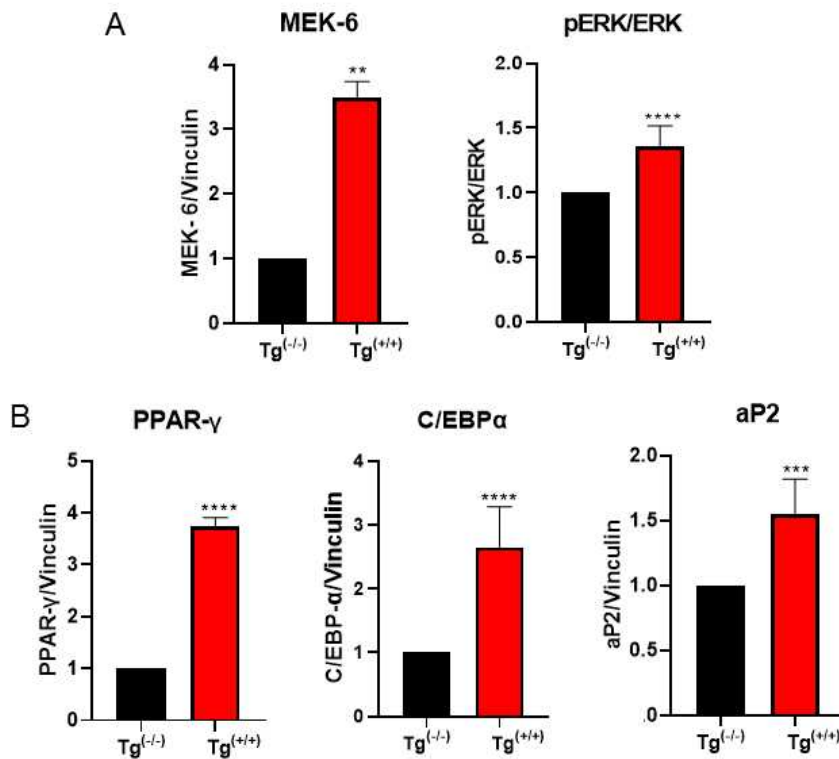


Fig. 7. Protein expression of MEK6, pERK and adipogenesis factors on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/-)}$.

MEK6 stimulates MEK/ERK pathway which is related to adipogenesis and lipogenesis. (A) Protein expression of MEK6 and pERK of $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/-)}$. (B) Protein expression of adipogenesis factors of the both groups. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. $Tg^{(-/-)}$ was control group. $Tg^{(+/-)}$ was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by unpaired *t*-test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$.

(2) NaCl 처치에 따른 WAT와 beige fat의 TG 지방대사

WAT에 NaCl을 처치하였을 때, MEK6는 Con/W-0와 Tg/W-0에 비하여 Con/W-50와 Tg/W-50에서 각 1.5배씩 증가하였다(Fig. 8). 비만대사 관련 유전자인 PPAR- γ , C/EBP- α , aP2 단백질 발현은 Tg^(-/-)군과 Tg^(+/+)군 모두에서 NaCl처치에 따라 유의적으로 증가하였다.(Fig. 8)

Beige fat의 western blot analysis 결과, MEK6 단백질 발현은 대조군에 비하여 Tg^(+/+)에서 약 1.5배 증가하였으나 WAT의 단백질 발현의 1/2 수준에 그쳤다(Fig. 8). PPAR- γ , C/EBP- α , aP2 단백질 발현이 Con/B-0에 비해 Tg/B-0에서 각각 3배, 2.5배, 2.5배 증가하였다. NaCl을 처치한 Con/B-50과 Tg/B-50에서도 비만관련 유전인들이 유의적으로 증가하였다(Fig. 8, C, D and E).

UCP-1 단백질 발현은 Tg^(-/-) 와 Tg^(+/+) 모두 WAT에 비해 beige fat에서 약 2배 증가하였다. WAT의 Tg^(+/+)의 UCP-1 단백질 발현보다 낮은 경향을 보였다(Fig. 8F). Beige fat은 WAT와 BAT의 중간 단계의 지방이기 때문에 비만관련 유전자 단백질 발현이 WAT에 비하여 전체적으로 낮았다(Fig.8, C, D and E). Tg/B-0과 Tg/B-50의 경우, UCP-1 단백질 발현도가 Con/B-0과 Con/B-50에 비해서 유의적으로 낮았다(Fig. 8F).

MEK6 유전자가 있으면 TG 비만기전의 활성화로 인하여 갈색지방화가 제한받게 된다. NaCl 처치는 WAT의 합성과 분화 및 대사에 긍정적인 영향을 끼쳐서 세포가 비만해지도록 하는 기전을 활성화 시키나, beige fat에는 NaCl의 영향이 미치지 않는 것으로 보인다.

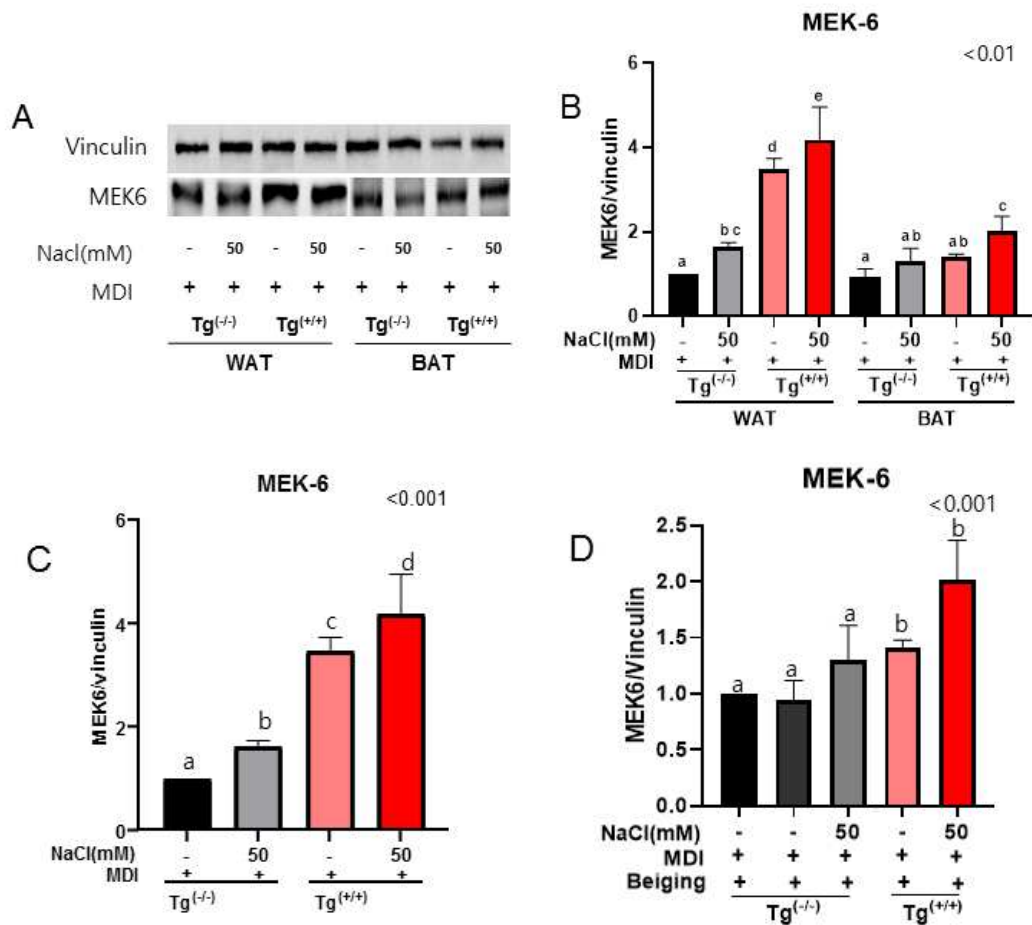


Fig. 8. Protein expression of MEK6 of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$.

Effect of NaCl on the lipid metabolism of WAT and beige fat. (A–D) Protein expression of obesity, MEK 6 gene, and beige fat determinants on the effects of NaCl on fat (WAT & beige) metabolism. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. $Tg^{(-/-)}$ was control group. $Tg^{(+/+)}$ was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$.

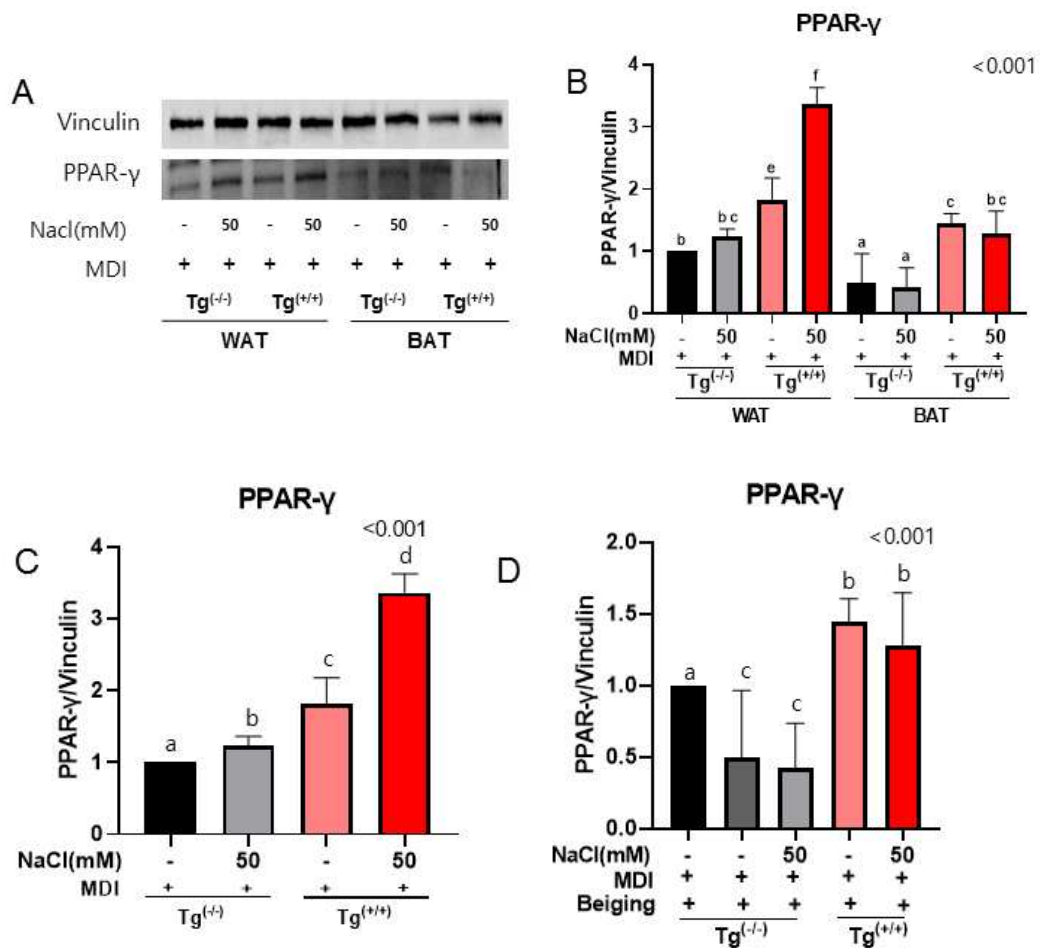


Fig. 9. Protein expression of PPAR- γ of WAT and beige fat on Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

Effect of NaCl on the lipid metabolism of WAT and beige fat. (A–D) Protein expression of obesity, PPAR- γ gene, and beige fat determinants on the effects of NaCl and MEK6 on fat (WAT & beige) metabolism. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. Tg^(-/-) was control group. Tg^(+/+) was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$.

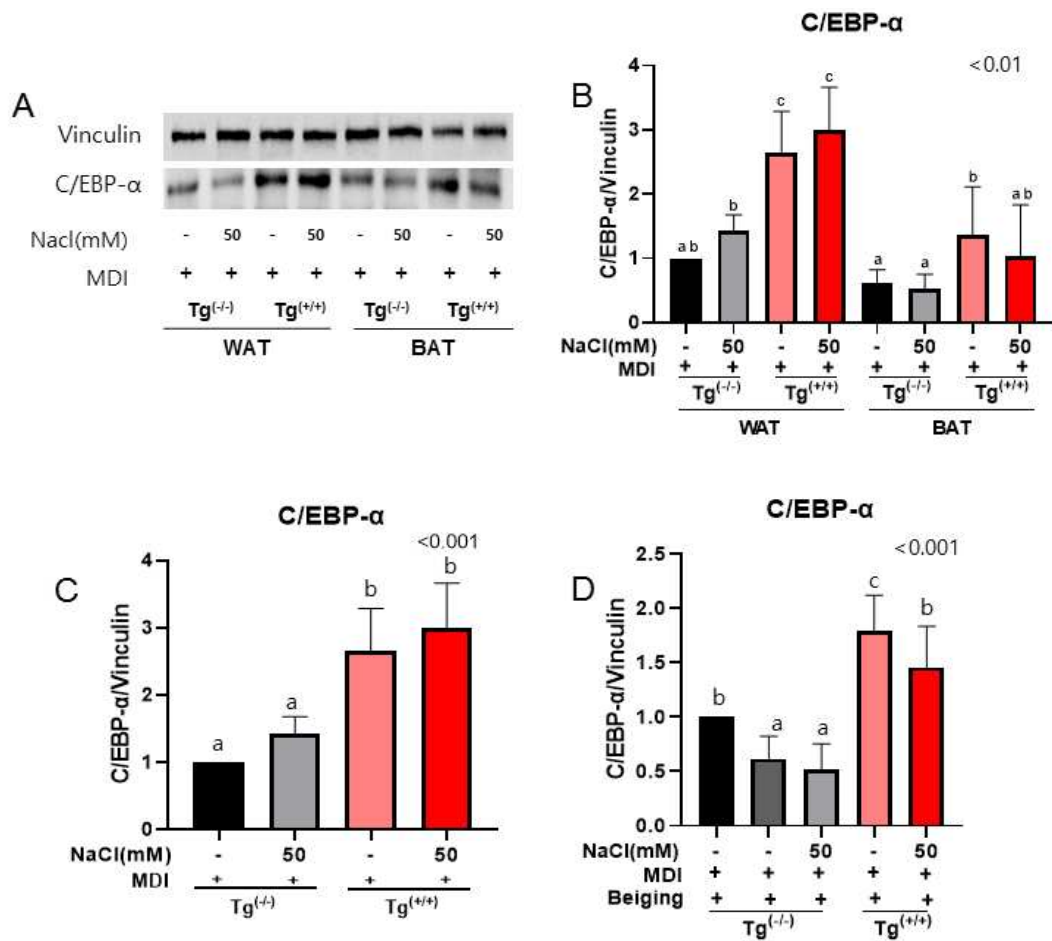


Fig. 10. Protein expression of C/EBP- α of WAT and beige fat on Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

Effect of NaCl on the lipid metabolism of WAT and beige fat. (A–F) Protein expression of obesity, C/EBP- α gene, and beige fat determinants on the effects of NaCl and MEK6 on fat (WAT & beige) metabolism. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. Tg^(-/-) was control group. Tg^(+/+) was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$.

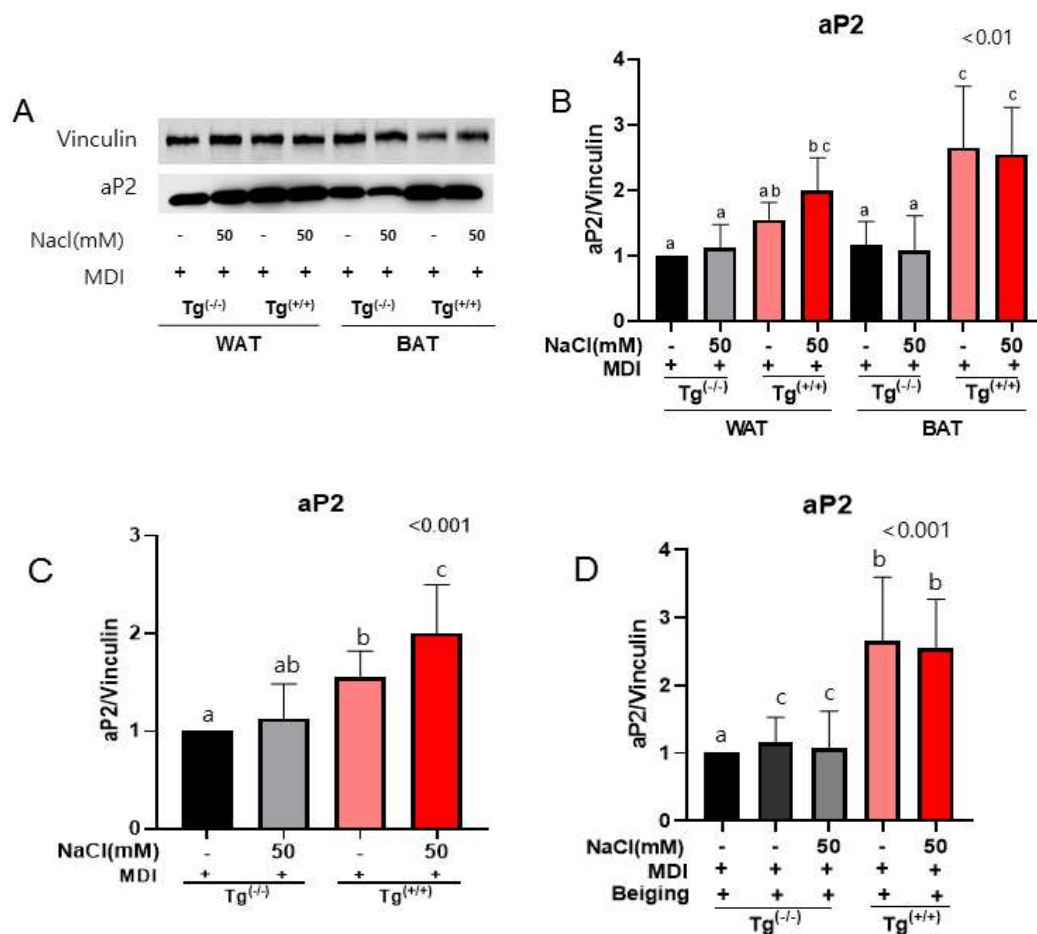


Fig. 11. Protein expression of aP2 of WAT and beige fat on Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

Effect of NaCl on the lipid metabolism of WAT and beige fat. (A–D) Protein expression of obesity, aP2 gene, and beige fat determinants on the effects of NaCl and MEK6 on fat (WAT & beige) metabolism. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. Tg^(-/-) was control group. Tg^(+/+) was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$

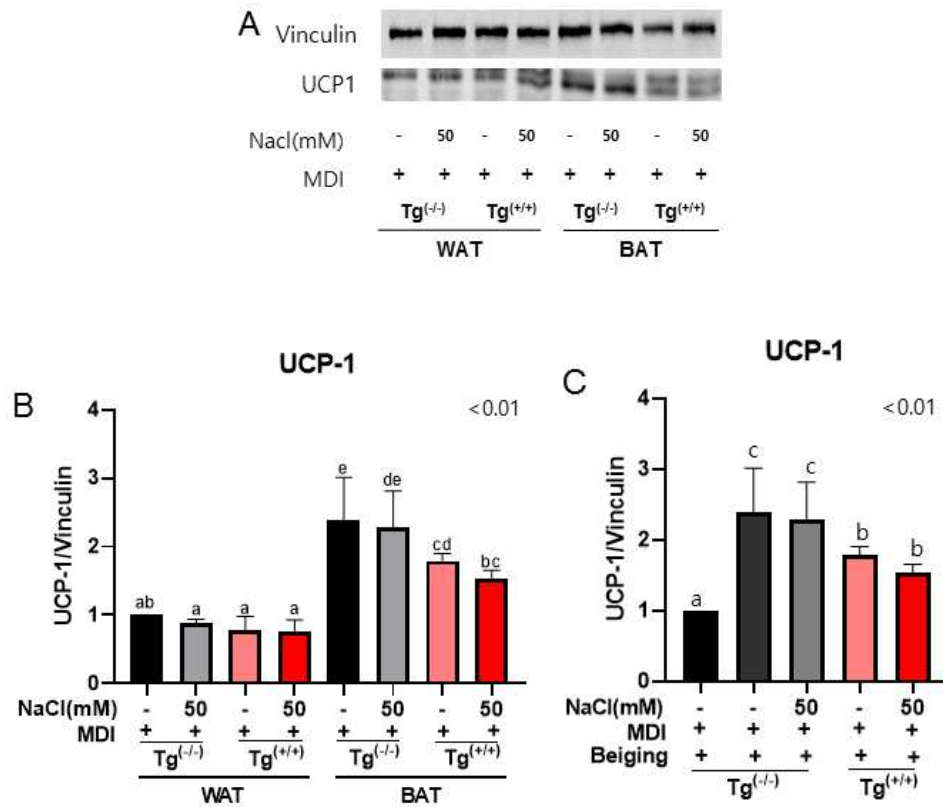


Fig. 12. Protein expression of UCP-1 of WAT and beige fat on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/+)}$.

UCP-1 is the only factor to confirm beige WAT fat. Protein expression of obesity, UCP-1 gene, and beige fat determinants on the effects of NaCl and MEK6 on fat(WAT & beige) metabolism. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. $Tg^{(-/-)}$ was control group. $Tg^{(+/+)}$ was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$

6. 염증성사이토카인의 변화 확인

지방합성, 분화 및 대사에 의해 세포내에 염증이 발생하게 된다. WAT에서 MEK6 과발현 시, 염증성사이토카인의 변화를 확인하기 위하여 ELISA 실험을 진행하였다. 본 실험에서 interleukin-10(IL-10), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemo-attractant protein-1(MCP-1), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) 등과 같은 염증인자를 확인하였다. Adiponectin과 leptin은 western blotting으로 확인하였다.

Pro-inflammatory 마커인 TNF- α 와 IL-1 β 는 대조군에 비하여 Tg^(+/+)에서 각각 3.5배, 7배 증가하였다(Fig. 9, A and B). Anti-inflammatory 마커인 IL-10또한 Tg^(+/+)에서 1.6배 증가하였다(Fig. 9C). CD-14와 PAI-1는 Tg^(-/-)에 비해 Tg^(+/+)에서 각각 1.5배, 2.5배 증가하였다(Fig 9, D and E). MCP-1은 세포간 유의적인 차이는 없었으나 Tg^(+/+)에서 약간 증가하였다(Fig. 9F).

MEK 6 유전인자가 세포의 지방합성과 분화를 유도 및 증가시켜서 염증 기전이 활성화 된 것이다. Tg^(-/-)군과 Tg^(+/+)군 모두 NaCl처치에 의하여 WAT의 염증인자 발현도가 약 세배이상 증가하는 것을 보였으며, beige fat에서도 두 배 정도의 차이를 보였다. (Fig.9)

항염증성 인자인 adiponectin은 Tg^(-/-)에 비하여 Tg^(+/+)에서 1/10로 감소하였으나, leptin은 MEK 6 과발현과 관련성이 없는 것으로 보인다(Fig. 10, B and C). 반면, MEK 6 과발현시 adiponectin/leptin ratio는 1/5로 감소하였다(Fig. 10D).

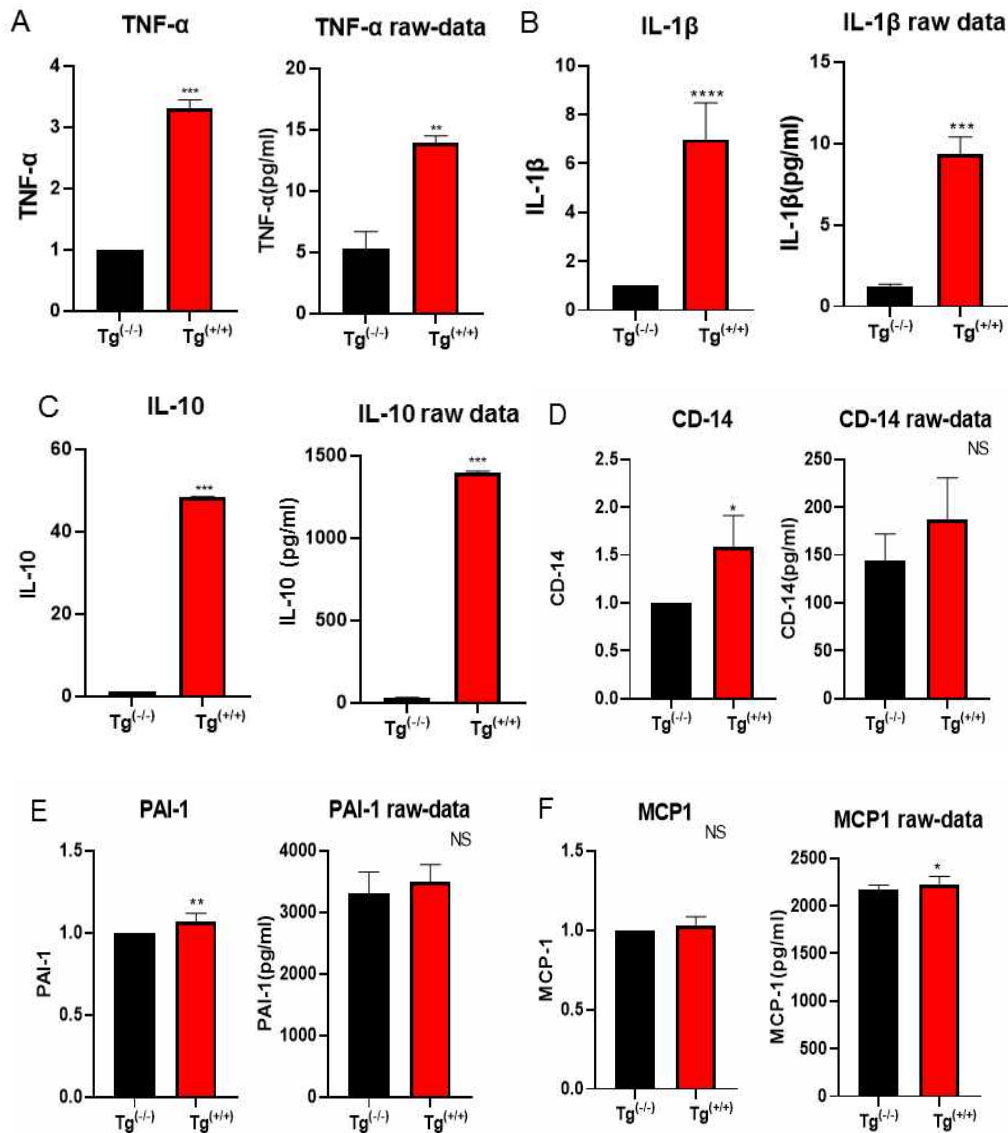


Fig. 13. Expression of inflammatory cytokine factors on $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/-)}$.

Inflammatory cytokine were measured by ELISA assay in $Tg^{(-/-)}$ and $Tg^{(+/-)}$. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.001$

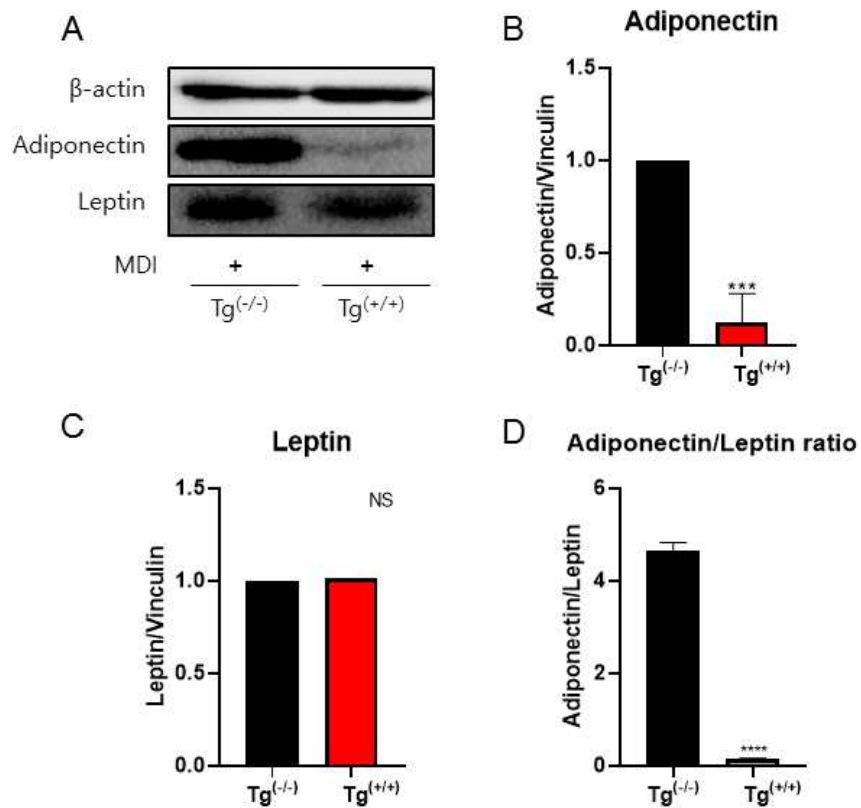


Fig. 14. Protein expression of adiponectin and leptin on Tg^(-/-) and Tg^(+/-).

Protein expression of adiponectin and leptin was determined by western blotting. (A) Western blotting analysis adiponectin of Tg^(-/-) higher than Tg^(+/-) (B) Protein expression of adiponectin. (C) Protein expression of Leptin, (D) Adiponectin and Leptin' s ratio. Each bar represents the mean \pm SE. Protein expression was determined by western blotting. Tg^(-/-) was control group. Tg^(+/-) was over-expressed MEK6 group. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by unpaired *t*-test (P-value: *, *P* < 0.05, **, *P* < 0.01, ***, *P* < 0.001)

7. 에너지소비변화 및 대사

WAT와 beige fat 에너지소비 및 대사를 확인하기 위하여 산소소비량을 microplate reader으로 17초마다 100분 동안 측정하였다. 산소소비 데이터는 Agilent MitoXpress pH-Xtra data visualization tool system(Agilent,California, USA)을 이용하여 분석하였다.

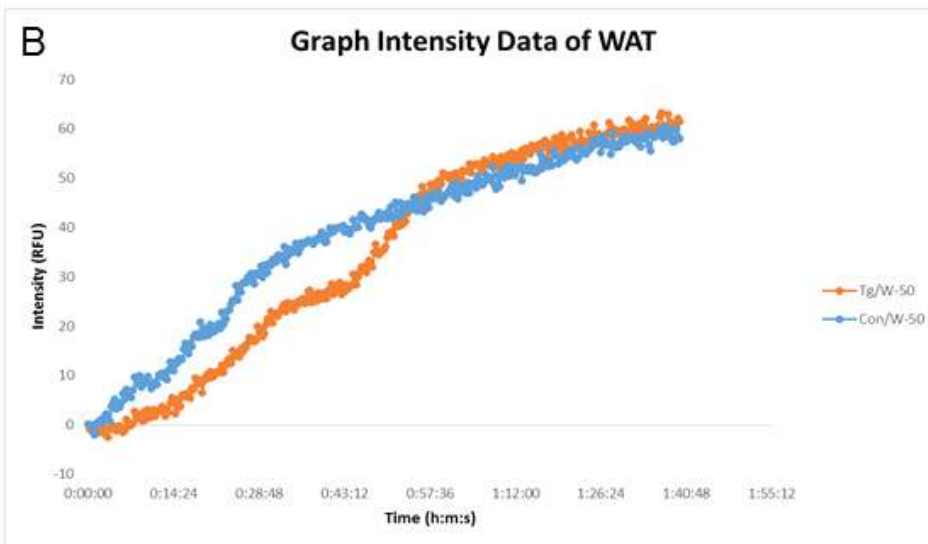
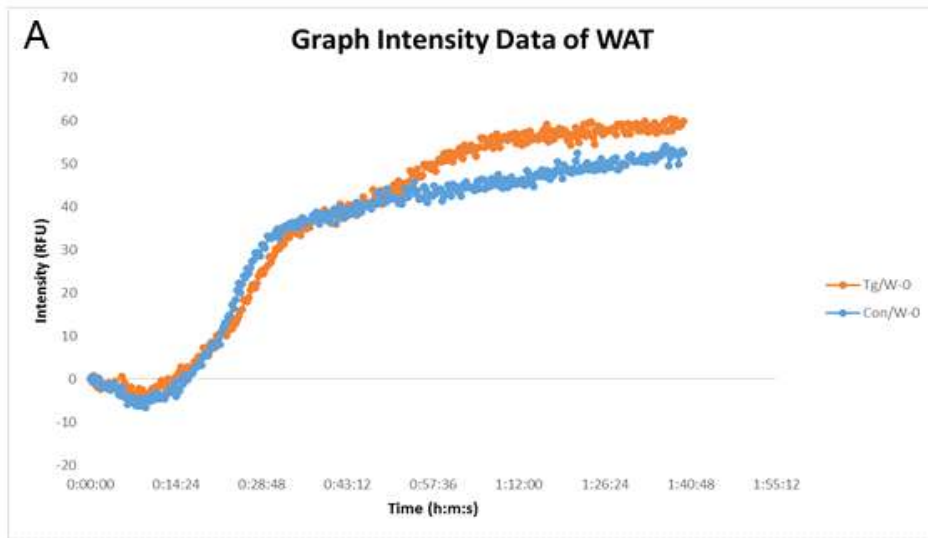
Con/W-0와 Tg/W-0의 산소소비량의 변화를 확인해보면, 처음 15분 동안에는 두 세포가 비슷하게 산소를 소비한다. 그 이후, Tg/W-0의 산소소비는 급격하게 증가하고 Con/W-0의 산소소비량의 변화는 작다(Fig. 11A). 대조군의 최종산소소비량이 50RFU인 것에 비하여 Tg^(+/+)의 최종산소소비량은 60RFU로 높다(Fig. 10A). 50mM NaCl를 처치한 군의 경우, 초반 30분 동안의 산소소비량은 Con/W-50이 Tg/W-50에 비하여 많았다(Fig. 11, B and E). 43분부터 약 10분 동안 Tg/W-50의 산소소비량이 증가하여 최종산소소비량이 대조군에 비하여 근소한 차이로 많았다(Fig. 11, B and E).

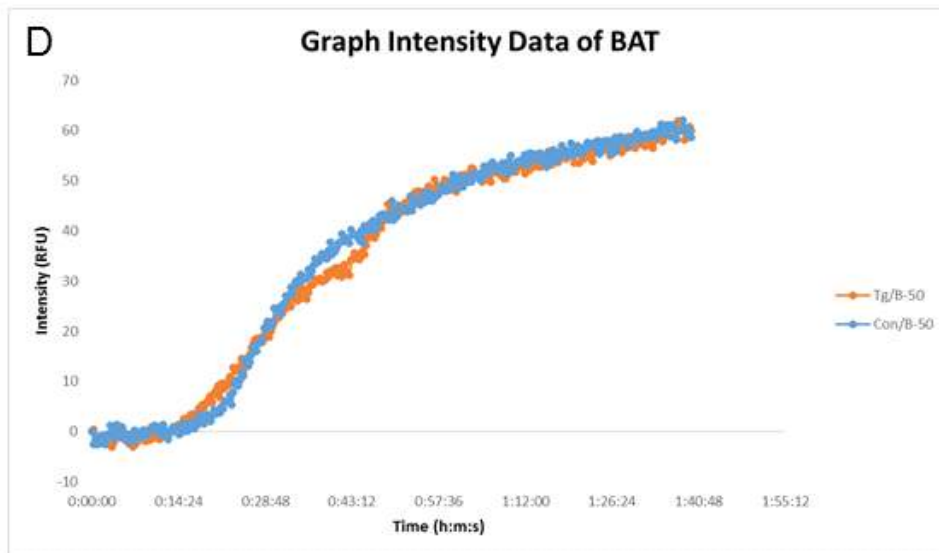
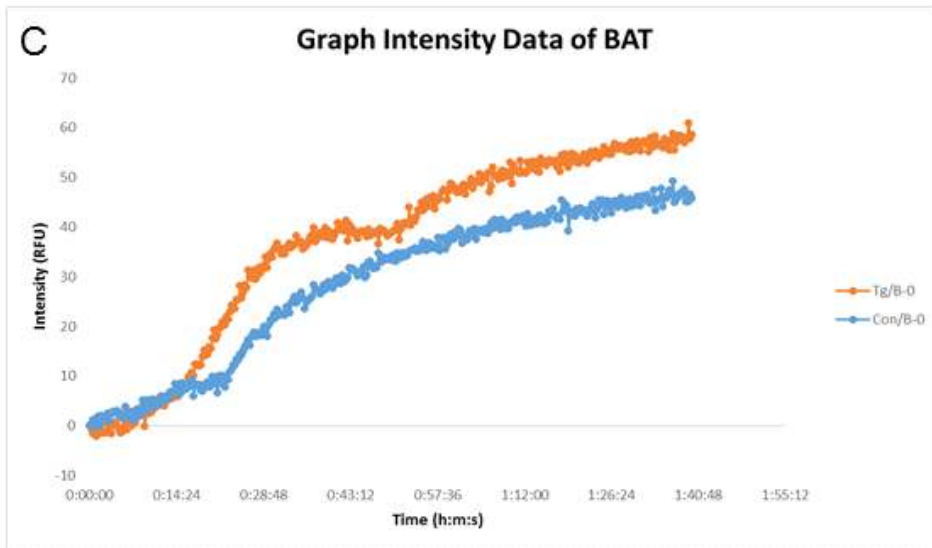
Tg^(+/+)와Tg^(-/-)의 WAT의 산소소비량 경향 확인 결과, Tg^(+/+)군은 산소소비량이 지체되는 특이적인 구간이 존재했다(Fig. 11, A and B). 또한 Tg^(+/+)군이 Tg^(-/-)에 비하여 산소를 많이 필요로 하고, 소금을 처치한 세포에서 더 많은 산소를 소비하는 것으로 측정되었다.

Con/B-0와 Tg/B-0의 경우, Con/B-0는 28분에서 40분 사이에 산소소비량이 급격히 증가하지만, 최종산소소비량은 40RFU에 미치고 종료되었다(Fig. 11C). Tg/B-0는 15분부터 43분까지 급격하게 산소를 소비하여 43분에 이미 Con/B-0의 최종산소소비량인 40RFU에 도달하였다(Fig. 11C). 50mM NaCl를 처치한 beige fat의 경우, Con/B-50은 약 20분간 산소소비량의 증가가 거의 없다가 23분부터 45분까지 급격하게 증가하고

이후에는 완만한 소비량을 보였다(Fig. 11, D and F). Tg/B-50은 산소소비 시작 이후 15분부터 급격히 증가하여 최종산소소비량 57RFU를 기록하고 종료되었다(Fig. 11, D and F). Con/B-50과 Tg/B-50의 최종산소소비량은 차이가 없었다(Fig. 11D). Beige fat의 Tg^(+/+) 또한 산소소비가 지체되는 특이구간이 존재하였다. Con/B-0의 산소소비량의 증가량과 최종산소소비량이 가장 작았고, Con/B-50와 Tg/B-0, 50은 최종산소소비량은 큰 차이를 보이지 않았으나 실험시작부터 40분까지 진행된 산소소비의 경향의 차이를 보였다(Fig. 11, C and D). Tg^(+/+) 와 Tg^(-/-)의 산소소비측정에 대한 intensity (RFU/hr)의 평균값은 유의적인 차이점이 없다(Fig. 16).

MEK 6을 과발현한 Tg^(+/+)군들이 대체적으로 대조군에 비해 최대산소소비량에 도달하는 시간이 느렸다(Fig. 11A-D). 아울러 Tg^(+/+)군들의 산소소비량은 40분을 기준으로 하여 지체되거나 약간 감소하는 역치점을 가지는 것을 알 수 있었다(Fig. 11A-D). MEK6 과발현이 미토콘드리아의 산소소비를 결정하는 인자와 연관성을 가지고 있음을 알 수 있다.





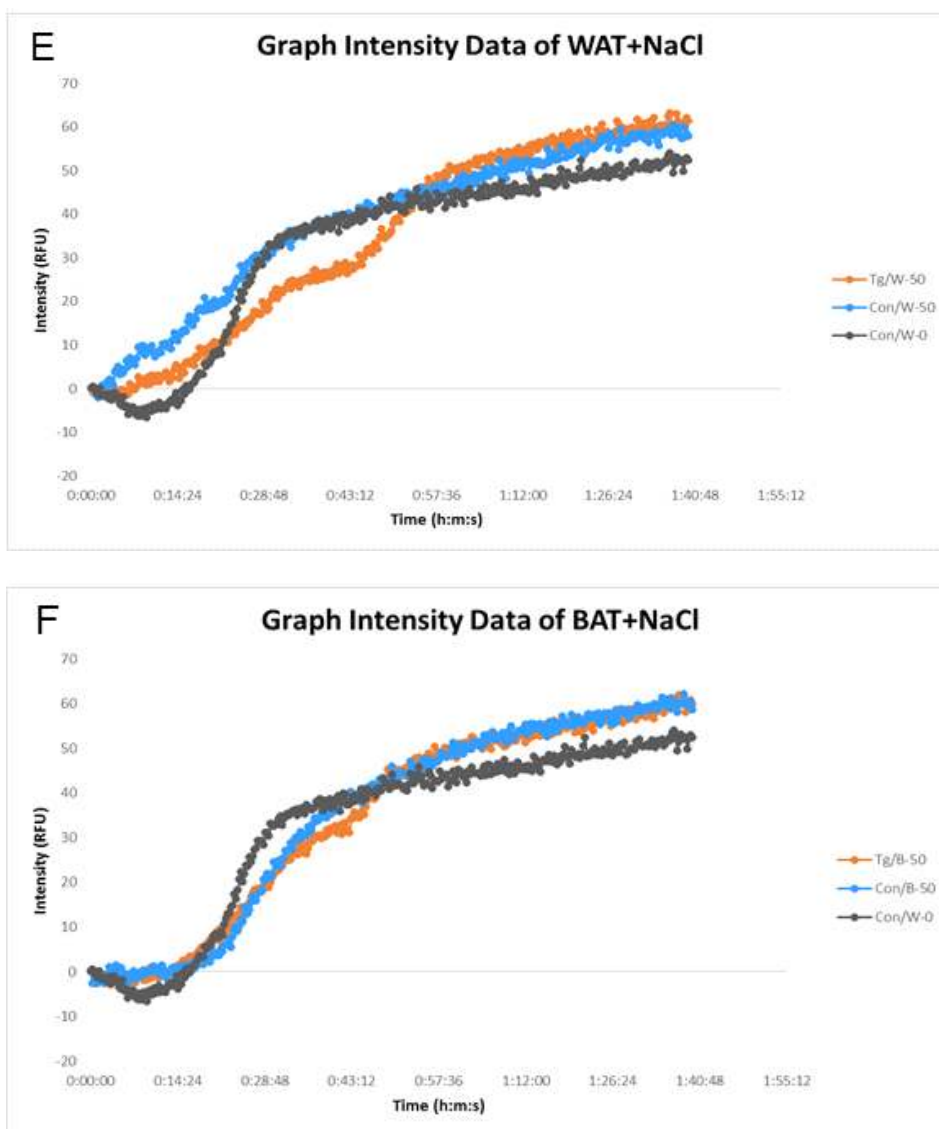


Fig 15. Oxygen consumption measurement of Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

(A) Oxygen consumptions of WAT cells. (B) Oxygen consumptions of beige fat cells. (C) Oxygen consumptions of WAT cells without NaCl. (D) Oxygen consumptions of WAT cells treated 50mM NaCl. (E) Oxygen consumptions of beige fat cells without NaCl. (F) Oxygen consumptions of beige fat cells with 50mM NaCl.

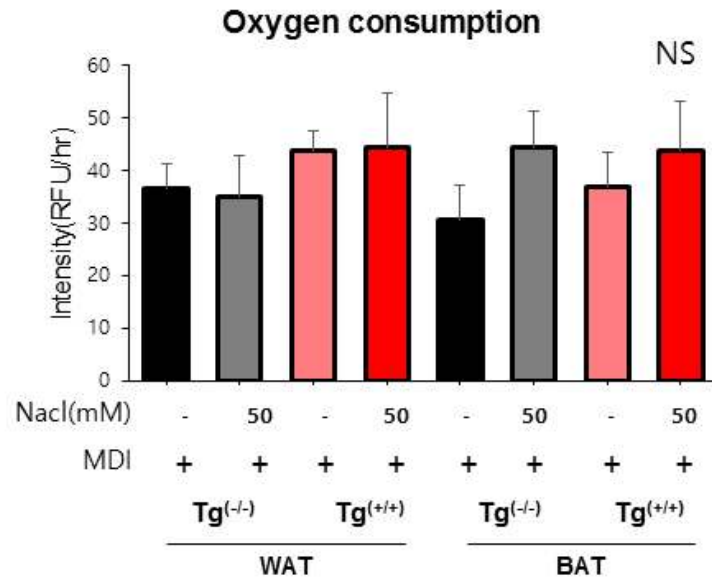


Fig 16. Oxygen consumption Intensity (RFU/hr) of Tg^(-/-) and Tg^(+/+).

Oxygen consumptions of Tg^(-/-) and Tg^(+/+) were measured on day 8 when cells were completely differentiated and alive. Cells were treated by 50mM NaCl. Oxygen consumptions were measured every 17 sec for 100minutes then analysed by Agilent MitoXpress pH-Xtra data visualization tool system. All data are presented as the mean \pm S.D. from triplicates of three experiments. Significant differences of individual treatments versus controls are indicated as obtained by ANOVA test. *; $P < 0.05$, **; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$.

IV. 고찰

본 연구은 1)MEK6 유전자가 에너지대사 기전에 영향을 주어 비만해지는 지 그리고 2)고NaCl섭취가 비만을 증가시키는지를 확인하고자하는 실험을 진행하였다. MEK6는 비만관련 유전인과 사이토카인염증인자, 산소소비량을 증가시켰다. 또한 비만 관련 유전자 및 염증인자 발현은 NaCl처치 시 유의하게 증가하였으며, 특히 MEK6가 과발현된 WAT에서 더 증가하였다. Beige fat은 WAT보다 지방대사와 관련된 단백질발현 및 염증인자 발현이 낮았으나, MEK6 과발현시에는 WAT와 같은 경향이였다. 이와 같이 갈색지방화과정에서 MEK6 과발현은 비만관련 유전자와 염증발현에 영향을 주었으나, NaCl 처치는 beige fat의 지방대사에 영향을 주지 않았다.

MEK6가 WAT의 지방합성 및 분화를 증가시키고, 지방 대사를 활성화하여 세포가 쉽게 비만하게 만든다[15]. NaCl 처치가 지방대사에 관여하는 MEK6 유전자와 MAPK/ERK pathway를 활성화하여 adipogenesis와 lipogenesis를 증가시킨다[29, 34]. 현재까지 NaCl이 WAT의 갈색지방화에 영향을 미친다는 연구는 부족하지만, UCP-1 이외의 갈색화반응의 바이오마커가 더 연구되어야 한다[31]. 갈색화반응을 유도하는 cAMP와 같은 다양한 시약이 이용되고 있으나, 본 실험에서는 보편적으로 이용되는 갈색화반응 유도배지(Rosi, T₃, IBMX, insulin 포함)을 사용하였다. Insulin은 WAT에서와 같이 세포의 분화를 돕고, T₃와 IBMX는 UCP-1발현에 필수적이다[35,38]. T₃는 thermogenesis, mitochondrial funtion, transcription factors 등 다양한 기전에 조절자 역할을 한다고 알려져 있다[38]. 3T3-L1세포의 갈색지방화과정에서는 UCP-1 adrenergic 증가와 mRNA전사 안정화를 위하여 필요하다[38]. Rosi는 UCP-1발현을 추가적으로 증가시키는 역할을 한다[35]. Mouse model을 이용한 실험에서 BAT

는 에너지 소비와 글루코스 항상성 (glucose homeostasis)를 향상시킨다고 확인되었다[37]. WAT가 beige fat으로 갈색지방화 과정에도 에너지가 필요하다[37]. 하지만 WAT으로부터 유도된 beige fat은 지방분화와 인슐린 대사 등과 같은 비만대사에 상관관계로 인해 BAT에 비하여 에너지대사 효율증가가 낮다[36]. MEK6 과발현이 WAT의 갈색지방화 과정에 제한을 주어 UCP-1의 발현을 더 감소시키는 것으로 보인다. 하지만 갈색지방화 과정이 에너지 균형에 미치는 구체적인 영향에 대한 정확한 mechanism이나 pathway는 확인되지 않았다[39]. MEK6를 과발현 하였을 때, WAT와 beige fat 모두에서 시간이 지날수록 산소소비가 급격히 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 지방세포의 합성, 분화 및 대사에 많은 에너지를 필요로 하기 때문이다. MEK6 과발현 세포에 특이적으로 존재하는 산소소비 지체역치구간은 MEK6 유전자가 미토콘드리아의 산소소비를 결정하는 인자와 연관성이 있다는 것을 보여준다. Beige fat은 산소소비가 WAT에 대비하여 변화가 완만한 것은 갈색지방화과정을 통해 증가된 미토콘드리아에 의한 신진대사가 높기 때문이다[32,40]. UCP-1은 beige fat과 BAT의 thermogenesis기전을 활성화하여 열을 발산하고 adipocyte 상태로 분화를 유도한다[33]. 그리고 미토콘드리아가 지속적으로 에너지생성을 하도록 하여 비만대사가 억제되는 것으로 보인다[32,33].

본 연구의 제한점으로는 첫째, in vitro 실험에 국한되므로 동물 등 in vivo 실험을 통하여 지방조직과 기타 조직간 NaCl과 MEK6의 영향 및 기전을 규명할 필요가 있다. 둘째, 지방 조직의 beiging과정 혹은 BAT에서 NaCl처치에 따른 지방대사 및 에너지대사의 변화에 MEK6 pathway가 어떻게 관련되는지의 규명이 필요하다.

본 연구는 국내외 최초로 NaCl처치에 따라 adipogenesis가 증가하는 연
계기전으로 MEK6 pathway를 제시하였다. 향후 위에 언급한 제한점을 보
완하는 연구를 통하여 MEK6의 pathway기전을 모두 규명한다면 NaCl섭취
증가에 의한 비만을 예방하고 한국인 소금섭취 기준설정에 기초자료가 될
것이다.

참고문헌

- [1] World Health Organization (WHO), Health topics, Obesity, Global health observatory data, cited 2016.
- [2] Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384(9945):766–81.
- [3] S.A.Ritchie, J.M.C. Connel. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease; *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Disease* 2007;17:pp.7–8.
- [4] K.G. Alberti, P.Zimmet, J.Shaw. The metabolic syndrom - a new worldwide definition; *Lancet* 2005, 366(9491): pp.1059–1062.
- [5] R. Lydon, L. McAnena, M.B.E Livingstone and M.A. Kerr. The association between salt intake and obesity in UK adults aged 19–64 years; *Proceedings of the Nutrition Society* 2016; 75(OCE3); E206.
- [6] Young–Pil Cheon, Myoungsook Lee. Salt–sensitive genes and their relation to obesity; *J Nutr Health* 2017; 50(3); pp.217–224
- [7] Takehide Ogihara, Tomoichiro Asano, Katsuyuki Ando, Yuko Chiba, Nobuo Sekine, Hideyuki Sakoda, Motonobu Anai, Yukiko Onishi, Midori Fujishiro, Hiraku Ono, Nobuhiro Shojima, Kouichi Inukai, Yasushi Fukushima, Masatoshi Kikuchi and Toshiro Fujita. Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high–salt diet–fed rats; *T.OGIHARA AND ASSOCIATES* 2001;50;pp.1–11.
- [8] Pearson, G. et al. Mitogen–activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 2001. 22(2): p. 153–83.
- [9] Pagano E, Coso O, Calvo JC. Downmodulation of erbB2 activity is necessary but not enough in the differentiation of 3T3–L1 preadipocytes. *J Cell Biochem* 2008;104:274–85.
- [10] Prusty D, Park BH, Davis KE, Farmer SR. Activation of MEK/ERK signaling promotes adipogenesis by enhancing peroxisome

proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and C/EBPalpha gene expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Biol Chem* 2002;277:6226-46232.

[11]Denise R. Ferrier, Lippincott's Illustrated Reviews; Biochemistry sixth edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2014, Chapter15-18, pp.327-443.

[12]William P. Cawthorn, Jaswinder K. Sethi, TNF- α and adipocyte biology, *FEBS Letters* 2008; 582; pp. 117-131.

[13] Helmuth Gehart, Susann Kumpfl, Arne Ittner & Romeo Ricci. MAPK signalling in cellular metabolism: stress or wellness?; *EMBO* 2010;11(10);pp.834-840.

[14]Midori fusishrio, Yukiko Gotoh, Hideki Katagiri, Hideyuki Sakoda, Takehide Ogihara, Motonobu Anai, Yukiko Onishi, Hiraku Ono, Miho Abe, Nobuhiro Shojima, Yasushi Fukushima, Masatoshi Kikuchi, Yoshitomo Oka, and Tomoichiro Asano. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes; *Molecular endocrinology* 2003;17(3);pp.487-497.

[15]Myoungsook Lee, Sungbin Richard Sorn, Yunkyong Lee, and Inhae Kang, Salt induces adipogenesis/lipogenesis and inflammatory adipocytokines secretion in adipocytes; *International J of Molecular Sciences* 2019; 20, 160;pp.1-13.

[16]Min-Jung Seo, Yeon-Joo Lee, Ji-Hyun Hwang, Kui-Jin Kim, Boo-Yong Lee. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling, *Journal of Nutritional Biochemistry* 2015; 26; pp.1308-1316.

[17]Fost F. Aouadi M Caron L. Binetruy B. The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity. *Biochimie* 2005;87; pp.51-56.

[18]Majken S. Siersbæk, Anne Loft, Mads M. Aagaard, Ronni Nielsen, Søren F. Schmidt, Natasa Petrovic, Jan Nedergaard, and Susanne Mandrupa. Genome-Wide Profiling of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor in Primary Epididymal, Inguinal, and Brown Adipocytes Reveals Depot-Selective Binding Correlated with Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2012;32(17)

;pp.3452–3463.

[19] Jeffrey A. Engelman, Anders H. Berg, Renee Y. Lewis, Anning Lin, Michael P. Lisanti, and Philipp E. Schere. Constitutively Active Mitogen-activated Protein Kinase Kinase6(MKK6) or Salicylate Induces Spontaneous 3T3-L1 Adipogenesis. *The Journal of Biological Chemistry* 1999;274(50); pp.35630–35638.

[20] Nuria Matesanz, Edgar Bernardo, Rebeca Acuña-Pérez, Elisa Manieri, Sonia Perez-Sieira, Lourdes Hernández-Cosido, Valle Montalvo-Romeral, Alfonso Mora, Elena Rodriguez, Luis Leiva-Vega, Ana Victoria Lechuga-Vieco, Jesus Ruiz-Cabello, Jorge L. Torres, Maria Crespo-Ruiz, Francisco Centeno, Clara V.Alvarez, Miguel Marcos, Jose Antonio Enriquez, Ruben Nogueiras & Guadalupe Sabio. MKK6 controls T3-mediated browning of white adipose tissue. *Nature communications* 2017;8;pp.1–14.

[21] Jennifer M Kaplan, Paul W Hake, Alvin Denenberg, Marchele Nowell, Giovanna Piraino, and Basilia Zingarelli, Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK)-1/2 Is Associated with the Downregulation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)- γ during Polymicrobial Sepsis; *Molecular medicine* 2012; 16(11–12);pp.491–497.

[22] Zick Y. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. *Trends Cell Biol.* 2001;11:437-41

[23] BARBARA CANNON AND JAN NEDERGAARD. Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. *The American Physiological Society* 2004; 84; pp.1–83

[24] Wu, J., Boström, P., Sparks, L. M., Ye, L., Choi, J. H., Giang, A. H., Khandekar, M., Virtanen, K. A., Nuutila, P., Schaart, G., Huang, K., Tu, H., van Marken Lichtenbelt, W. D., Hoeks, J., Enerbäck, S., Schrauwen, P. and Spiegelman, B. M. 2012. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150:pp. 366-376.

[25] Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G. and Cinti, S. 2000. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am.*

J. Physiol. Cell Physiol. 279: pp. 670–681.

[26] Lee, J. Y. et al. Triiodothyronine induces UCP-1 expression and mitochondrial biogenesis in human adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol* 2012; 302; pp.463–472.

[27] Guerra, C., Koza, R. A., Yamashita, H., Walsh, K. & Kozak, L. P. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. *J. Clin. Invest* 1998; 102; pp. 412–420.

[28] Zhang, Y. et al. Irisin stimulates browning of white adipocytes through mitogen-activated protein kinase p38 MAP kinase and ERK MAP kinase signaling. *Diabetes* 2014; 63; pp. 514–525.

[29] Myoungsook Lee, Mikyoung kim, Seon-Mee kim, Hyesoon park, chaggyu park, Hye kyung park. Gender-Based differences on the association between salt-sensitive genes and obesity in Korean children aged between 8 and 9 years; *PLOS ONE* 2014;10(3);pp.1–13.

[30] Jung, Joohyun, Myoungsook Lee, Effects of interaction between SLC12A3 polymorphism, salt-sensitive gene, and NaCl intake on risk of child obesity. *Journal of Nutrition and Health* 2017;50(1);pp.32–40.

[31] Minjee Lee, Miyoung Park, Juhee Kim, Soyung Sung, and Myoungsook Lee, Impacts of High NaCl Intake on Obesity-related Gene Expression. *JEast Asian Soc Diet Life* 2018;28(5); pp.364–374.

[32] ZLozbtz-Ibarra, J Modrego, M Valero-Mun˜oz, P Rodr ı znfruez-Sierra, J J Zamorano-Leozbq, A Gonzaznfvez-Cantalapiedra1, N de las Heras, S Ballesteros, V Lahera and A J Lozbtz-Farre, Metabolism differences between white and brown fat from fasting rabbits at physiological temperature, *JMol Endocrinol* 2015, 54(2); pp.105–113.

[33] Micheal W king, Adipose tissue: Not Just FAT; Introduction to Adipose Tissue: WAT and BAT, Regulation of Adipogenesis and Lipid Metabolism in Adipocytes; *The Medical biochemistry* 2017.

[34] Paqui G. Travıs, Pedro de Atauri, Silvia Marın, Marıa

Pimentel-Santillana, Juan-Carlos Rodríguez-Prados, Igor Martín de Mas, Vitaly A. Selivanov, Paloma Martín-Sanz, Lisardo Boscá and Marta Cascante, Relevance of the MEK/ERK Signaling Pathway in the Metabolism of Activated Macrophages: A Metabolomic Approach, *The Journal of Immunology* 2012; 188; pp1402-1210.

[35] Hiroki Asano, Yohei Kanamori, Satoshi Higurashi, Takayuki Nara, Ken Kato, Tohru Matsui, and Masayuki Funaba, Induced of beige-Like adipocytes in 3T3-L1 cells, *Biochemistry* 2013; 76(1); pp, 57-64.

[36] Shingo Kajimura, Bruce M. Spiegelman, and Patrick Seale, Brown and Beige Fat : Physiological Roles beyond Heat Generation, *Cell Metabolism* 2015; pp.546-559.

[37] Labros Sidossis, Shingo Kajimura, Brown and beige fat in humans : thermogenic adipocytes that control energy and glucose homeostasis, *The Journal of Clinical Investigation* 2015; 125(2); pp.478.-486.

[38] Maria-Jesus Obregon, Adipose tissues and thyroid hormones, *Frontiers in Physiology* 2014; 5(479); pp.1-12.

[39] Marta Giralt, Francesc Villarroya, White, Brown Beige/Brite : Different adipose cells for different Functions?, *Endocrinology* 2013; 154(9); pp.2992-3000.

[40] Jameel Lone, Jae Heon Choi, Sang Woo Kim, JongWo Yun, Curcumin induces brown fat-like phenotype in 3T3-L1 and primary white adipocytes, *Journal of Nutritional Biochemistry* 2016; 27; pp.193.202.

ABSTRACT

Effects of NaCl Treatment on the Adipogenesis during Beiging Process in the MEK6 Transfected 3T3-L1 Cells.

Songjoo Kang

Department of Food & Nutrition

Graduated School of

Sungshin University

Obesity is increasing worldwide including Korea. Obesity is becoming a source of diverse adult complications such as metabolic syndrome due to obesogenic environment(OE) which includes genes, lifestyle, and eating habits. In particular, NaCl intake is considered to be one of the causes of obesity in dietary research, but there are no studies on related mechanisms (signal pathway and metabolism). The purpose of this study was 1)to investigate the effects of NaCl on adipogenesis in white FAT (WAT) and beige FAT (BAT), and 2) to determine of the effect of over-expressed MEK6 gene in WAT and BAT on the related mechanism.

To achieve the above purpose, the total of 8 groups were set as WAT-control group(CON/W-0), WAT+Salt group (CON/W-50), BAT-control group(CON/B-0), BAT+Salt group(COB/B-50), WAT/MEK6^{+/+}(Tg/W-0), WAT/MEK6^{+/+}+Salt (Tg/W=50),

BAT/MEK6^{+/+} (Tg/B-0), BAT/MEK6^{+/+}+Salt (Tg/B-50).

Over-expressed MEK6 group was classified into control group (Tg^{-/-}) and (Tg^{+/+}).

The NaCl concentration (MTT assay) was determined as the minimum concentration 50 mM without cytotoxicity. Transformation for over-expression of MEK6 was determined by the chemical method (Lipofectamine 3000). As a result of confirming the transformation (PCR method), the mRNA expression of MEK6 of Tg^(+/+) was 1.6 times higher than control, and protein expression of MEK6 of Tg^(+/+) was 3.5 times higher than control. WAT was beigned by brown fat induction medium, included T3, insulin, rosiglitazone, and beiging of WAT was confirmed by protein expression of UCP-1 with western blotting. The protein expression of UCP-1 was 2.5 times higher on Tg^(+/+) than control. Cell differentiation and TG synthesis (oil red staining, DAPI / Nile red staining), inflammatory cytokine identification (ELISA assay) and energy metabolism measurement (oxygen consumption analysis method) were performed.

Regardless of over-expressed MEK6 in WAT and BAT of Tg^(-/-) and Tg^(+/+), the size and number of lipid droplet increased with NaCl treatment. In particular, Tg^(+/+) which is over-expressed MEK6 of WAT increased in size and number of lipid droplet compared to Tg^(-/-). Protein expression of gene factors associated with adipogenesis, such as PPAR- γ and C/EBP- α , Con/W-50, was 1.5 times higher than Con/W-0. On the other hand, protein

expression of PPAR- γ and C/EBP- α were not associated with NaCl treatment in beige fat. In Tg^(+/+), the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-10 increased 6.5-fold, 6-fold, and 40-fold, respectively, compared to Tg^(-/-). Adiponectin. Leptin did not seem to be associated with MEK6 over expression, but the adiponectin / leptin ratio (ALR) decreased to 1/5. As a result of the measurement of oxygen consumption to confirm energy consumption and metabolism, oxygen consumption was increased in both WAT and BAT with the NaCl treatment regardless of over-expressed MEK6. While the time to reach maximum oxygen consumption of Tg^(+/+) was slower than Tg^(-/-) because there was a retard threshold range not found in the control group. MEK6 over expression was associated with factors that determine oxygen consumption in mitochondria.

In conclusion, adipogenesis (inflammation, energy consumption, etc.) of WAT and BAT was activated by MEK6 over expressed and NaCl treatment. WAT was significantly higher in obesity metabolism than BAT. The obesity metabolism of WAT of Tg^(+/+) was significantly higher than the control group and BAT. Therefore, this study suggests the MEK6 pathway as the linkage mechanism that increases adipogenesis according to NaCl treatment for the first time in Korea and abroad. If the pathway mechanism of MEK6 is identified through *in vivo* experiments and clinical trials, it will be play important role in preventing the obesity caused by increased NaCl intake and setting the standard for NaCl intake in Koreans.