



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](#)

李名淑 教授 指導  
碩士學位 請求論文

SIK2 mutagenic 3T3-L1을  
이용하여 나트륨이 adipogenesis에  
미치는 영향에 관한 연구

2019

誠信女子大學校 大學院

食品營養學科

成 沼 泳

SIK2 mutagenic 3T3-L1을  
이용하여 나트륨이 adipogenesis에  
미치는 영향에 관한 연구

李名淑 教授 地道

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

成 沼 泳

# 認 准 書

成 沼 泳 의 碩士學位 論文을 認准함.

2018年 11月

審査委員長\_\_\_\_\_印

審査委員\_\_\_\_\_印

審査委員\_\_\_\_\_印

誠信女子大學校 大學院

## 논문 개요

2015년 국민건강영양조사 자료에 의하면 한국인 1일 평균 나트륨 섭취량이 3,980mg으로 WHO 및 한국인 영양섭취기준의 성인 1일 나트륨 목표 섭취량인 2,000mg과 비교하여 높은 섭취량을 보인다. 사회경제적 성장과 함께 생활양식 및 식습관의 변화로 비만인구가 급증하고 있기 때문에 비만은 유전적, 환경적 요인 등이 복합적으로 관련되어 있다. 특히 과도한 소금의 섭취가 비만, 인슐린 저항성 증가, 제 2형 당뇨병 및 심혈관계질환의 발병의 증가와 관련성이 있으나 소금 섭취에 따른 비만의 기전에 관한 연구는 전무하다.

소금에 의하여 발현되는 Salt-inducible kinase(SIK)의 이성체 중 백색지방조직에서 발현되는 SIK2는 분화초기단계에서 에너지 대사와 관련 유전자 발현조절에 영향을 미친다. 사전연구에서 3T3-L1 지방세포의 분화과정에 소금을 처치 시 SIK2 및 adipogenesis 관련 인자(PPAR $\gamma$  및 CEBP $\alpha$ )가 모두 증가하였다. 따라서 SIK2의 유전자 서열에서 전사후 조절자리(post-transcriptional modification site)를 변형하면 지방세포의 adipogenesis 대사가 변화한다는 가설을 설정하였다. 본 연구의 목적은 소금 처치 시 SIK2에 의한 adipogenesis 기전을 규명하고자 SIK2의 유비퀴틴화(ubiquitylation)와 관련된 위치를 변이시킨 3T3-L1(SIK2 mutagenic)세포를 이용하였다.

3T3-L1세포에서 소금의 세포독성검사(MTT assay)를 진행하여 처치 농도를 50mM로 하였다. Lonza를 이용한 electroporation 방법으로 2종류의 SIK2 ubiquitylation-mutagenic 3T3-L1(K536Q, K702Q)과 SIK2 KO cell(negative control)을 만들었다. 3T3-L1 및 SIK2

KO cell을 대조군으로 소금 처치 시 SIK2 mutagenic cells (K536Q, K702Q)에서 세포분화 정도(Oil red O staining), SIK2 발현 및 주요 adipogenesis biomarkers(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ) 등을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 3T3-L1, K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서 mRNA microarray 분석을 진행하여 도출된 관련 유전자들을 중심으로 real-time PCR을 통해 SIK2 mutagenic 3T3-L1과 adipogenesis 관련 유전자와의 연관성을 확인하였다.

3T3-L1(대조군), K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서의 SIK2 및 adipogenesis 인자의 발현을 확인한 결과 K536Q와 K702Q cell에서 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$  발현이 감소하였다. 반면 SIK2 발현은 K702Q에서는 변화가 없고 K536Q에서 SIK2 KO 수준으로 감소하였다. 3T3-L1에 비하여 K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서 지방세포 분화와 관련된 발현의 fold change가 2배 이상 차이가 나는 유전자를 도출하였다. 도출된 유전자 중 SIK2 KO와 공통적으로 발현된 유전자를 제외한 다음 Leucine-rich repeat-containing protein 8C(Lrrc8c), SMAD Family Member 6(Smad6), Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A(NR4A2), Nudix Hydrolase 7(NUDT7), Bardet-Biedl syndrome 9(Bbs9), C-terminal-binding protein 1(CTBP1), Kruppel-like factor 4(KLF4), Mediator Complex Subunit 1(MED1), Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3(Eif2ak3) 등은 증가한 유전자로 Peroxisomal Biogenesis Factor 11 Alpha(PEX11A), Nipped-B-like protein (Nipbl), Transmembrane Protein 120A(Tmem120a), Early B Cell Factor 2(Ebf2), CCAAT/enhancer-binding protein alpha(CEBP $\alpha$ ), Transmembrane Protein 120B(Tmem120b) 등은 감소한 유전

자로 선별되었다. Metabolic pathway를 추적하여 SIK2 기전과 연관이 있는 유전자로 Smad6, NR4A2, CTBP1, MED1, Bsc12, Eif2ak3를 선별하였다. K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에 소금을 처치시 SIK2, Smad6, NR4A2, CTBP1, MED1, Bsc12, Eif2ak3 유전자 모두 대조군에 비하여 발현이 증가하였다. 특히, K702Q에 소금을 처치시 NR4A2, MED1, Bsc12, Eif2ak3 유전자는 모두 처치하지 않았을 때와 비교하여 발현이 증가하였다. 이와는 반대로 Smad6 및 CTBP1은 소금을 처치하였을 때 유전자 발현이 감소하였다.

본 실험을 통해 SIK2가 변형된 K536Q와 K702Q세포 중에서 SIK2 활성이 있는 경우(K702Q)에만 소금 처치 시 adipogenesis 관련 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

SIK2 mutagenic 3T3-L1에서 mRNA microarray 분석으로 adipogenesis 관련 유전자를 총체적으로 도출하였다. 비록 SIK2 KO cell이 대조군으로 사용되었으나 SIK2의 활성유무를 판정하는데 ubiquitylation 자리를 이용하였기 때문에 Wnt signaling pathway, cAMP signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, ER stress 등과 관련된 유전자가 adipogenesis 관련 유전자로 포함되어 도출되었다. 향후 이러한 유전자를 구별 및 선별하는 metabolic pathway 방법으로 관련성이 높은 유전자를 도출하여 반복 실험이 필요하다. 이는 비만이 인종별, 생애주기별, 성별에 따라 다양한 환경인자로부터 발생하기 때문에 비만 phenotypes의 다양성을 확인하는데 매우 필요하다. 특히 본 연구가 소금 섭취에 의한 비만발생의 기전을 규명하는데 기초자료로 사용되기를 희망한다.

# 목 차

## 논문개요

I. 서론 .....	1
1. 소금 .....	1
2. 비만 .....	2
1) 비만의 정의 .....	2
2) 지방세포의 분화 및 지방대사 .....	2
3. SIK(Salt Inducible Kinase) .....	5
1) SIK family .....	5
2) SIK2 .....	5
3) SIK2 mutant .....	6
4. 연구목적 .....	9
II. 재료 및 방법 .....	10
1. 3T3-L1 세포배양 및 분화 .....	10
2. 세포독성검사(Cell viability assay) .....	10
3. Transfection method(electroporation) .....	11
4. Western Blotting analysis .....	12
5. Realtime-PCR .....	13
6. mRNA microarray .....	16
7. pathway 추적 .....	17
8. 통계 분석 .....	17

Ⅲ. 연구 결과 및 고찰 .....	18
1. 세포독성검사 .....	18
2. SIK mutant western blot .....	22
3. mRNA microarray analysis .....	25
4. Pathway 추적 결과 .....	31
5. Real-time PCR .....	34
Ⅳ. 요약 및 결론 .....	40

참고문헌

ABSTRACT

## List of Table

Table 1. Primers sequences used for quantification of gene expression by real-time PCR. ....	15
Table 2. Significant gene selections of SIK2 mutagenic 3T3-L1 cell in fat cell differentiation category. ....	28
Table 3. Significant gene list of SIK2 K536Q and SIK2 K702Q. ....	30

## List of Figure

Figure 1. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation. .....	4
Figure 2. Post-translational modification sites of SIK2. ....	8
Figure 3. Viability on salt of pre-adipocyte and adipocyte 3T3-L1. ....	20
Figure 4. The expression of SIK2 and adipogenesis biomarkers(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ) in 3T3-L1 and SIK2 mutagenic 3T3-L1 cells. ....	24
Figure 5. Scatter plot of mRNA microarray analysis significant gene lists comparing SIK2 mutagenic cells to 3T3-L1 cell on the standard of 2 folds. ....	27
Figure 6. Related metabolic pathways of genes of mRNA microarray analysis. ....	33
Figure 7. Real-time PCR of genes of mRNA microarray result. ....	37

## ABBREVIATIONS

Aacs	Acetoacetyl-CoA Synthetase
Adig	Armidale Diocesan Investment Group
Adig	adipogenin
Adipoq	adiponectin
Aldh6a1	Aldehyde Dehydrogenase 6 Family Member A1
Ap1s2	AP-1 complex subunit sigma-2
Atf5	Activating Transcription Factor 5
Bbs2	Bardet-Biedl Syndrome 2
Bbs9	Bardet-Biedl syndrome 9
Bnip3	BCL2 Interacting Protein 3
Bscl2	Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy type 2
Ccnd1	Cyclin D1
Cebpa	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
Cebpb	CCAAT/enhancer-binding protein beta
Cebpd	CCAAT/enhancer-binding protein delta
Ctbp1	C-terminal-binding protein 1
Ebf2	Early B Cell Factor 2
Eif2ak3	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
Ero1l	Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1-like protein
Fabp4	fatty acid binding protein 4
Fbxo9	F-Box Protein 9
Ffar2	Free fatty acid receptor 2
Fgf10	Fibroblast growth factor 10
Grk5	G protein-coupled receptor kinase 5
Hmga2	High-mobility group AT-hook 2
Itga6	Integrin alpha-6
Klf4	Kruppel-like factor 4
Lpin1	lipin 1
Lrrc8c	Leucine-rich repeat-containing protein 8C

Med1	Mediator Complex Subunit 1
Mrap	melanocortin-2 receptor accessory protein
Nipbl	Nipped-B-like protein
Nr4a1	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1
Nr4a2	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2
Nudt7	Nudix Hydrolase 7
Osbpl8	Oxysterol-binding protein-related protein 8
Per2	Period Circadian Regulator 2
Pex11a	Peroxisomal Biogenesis Factor 11 Alpha
Plac8	Placenta specific 8
Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
Psmb8	Proteasome subunit beta type-8
Rarres2	Retinoic Acid Receptor Responder 2
Retn	resistin
Rgs2	Regulator of G-protein signaling 2
Runx1t1	RUNX1 Translocation Partner 1
Scd1	Stearoyl-CoA desaturase-1
Selenbp1	Selenium Binding Protein 1
Sh2b2	SH2B Adaptor Protein 2
Slc2a4	Solute Carrier Family 2 Member 4
Smad6	SMAD Family Member 6
Socs1	Suppressor of cytokine signaling 1
Srebf1	Sterol regulatory element-binding protein 1
Steap4	STEAP family member 4
Tb11x	Transducin (beta)-like 1X-linked
Tcf7l2	Transcription factor 7-like 2
Tmem120a	Transmembrane Protein 120A
Tmem120b	Transmembrane Protein 120B
Wfdc21	WAP four-disulfide core domain 21

# I. 서론

## 1. 소금

소금은 생명유지에 필수적인 무기질로 음식을 통해서 체내에 흡수된 소금은 나트륨과 염소 이온으로 분리된다.(1) 소금은 체액의 삼투압 유지, 신경흥분, 근육 수축 등의 중요한 역할을 한다.(2) 한 연구에 따르면 2010년 세계 소금 섭취량은 3.95 (95% CI: 3.89-4.01)g/day이며 한국은 5.00 (95% CI: 4.85-5.16)g/day으로 더 높았다.(3) 소금은 다른 영양소와 다르게 식품 자체에 함유된 것보다 조리 또는 식사를 할 때 첨가하는 소금으로 인해 더 많이 섭취하게 된다.(4) 한국인은 소금의 함량이 많은 국, 찌개, 김치, 생선구이 등에 대한 선호도가 강해 소금 섭취량이 다른 나라에 비해 높다.(5) 적당한 염분 섭취는 체액의 삼투압을 유지하고 신경이나 근육의 활동을 조절하는 등 생명을 유지하는데 중요한 역할을 하지만 과도한 염분의 섭취는 다양한 성인병을 유발한다.(6) 2016 국민건강통계에 따르면 나트륨은 충분섭취량의 253.3%를 섭취하였고, 목표섭취량 대비로도 190.4%를 섭취하는 수준이고, 연령, 거주 지역, 소득수준에 상관없이 모든 군에서 과다하게 섭취한 것으로 나타났다.

## 2. 비만

### 2-1. 비만의 정의

비만은 에너지 섭취량과 에너지 소비량간의 불균형이 장기화되어 체내 지방의 양이 과다하게 축적되어 있는 상태이다.(7) 대한비만학회에서 2003년에 비만 진단 기준을 BMI(Body Mass Index)에 따라 정상은  $18.5 \sim 22.9 \text{kg/m}^2$ , 과체중은  $23.0 \sim 24.9 \text{kg/m}^2$ , 비만은  $25.0 \text{kg/m}^2$  이상으로 분류하였다.(8) 과체중과 비만의 유행은 선진국과 개발 도상국에서 빠른 속도로 증가하고 있다.(9) 2016 국민건강통계에 따르면 우리나라 남자의 비만 유병률은 1998년 이후 지속적으로 증가하여 2016년 40%를 초과하였고, 여자는 1998년 이후 23~28%를 유지하고 있다. 비만은 심장질환, 제 2형 당뇨병(T2DM) 및 암의 위험성을 증가시키기 때문에(10) 비만은 질병이자 주요한 공공 보건 문제로 여겨진다.(11)

### 2-2. 지방세포의 분화 및 지방대사

지방세포는 다양한 호르몬과 생화학적 신호에 의해 분화가 진행되는데 분화에 따른 세포의 형태학적 변화는 지방세포의 전사인자의 발현 및 활성화에 의한 것이다.(12) Figure 1과 같이 지방세포는 very early, early, intermediate, late의 총 4단계로 분화가 진행된다. 전지방세포가 confluent 되면 세포주기의 G1/S기에서 성장을 멈춘다. 세포가 증식에서 분화의 단계가 될 때, collagen type VI, Pref-1의 감소 등 very early 단계의 바이오마커의 발현에 영향을 준다.(13) 3T3-L1 cell의 경우

MDI (dexamethasone, 3-isobutyl-methyxanthine, insulin)를 처치하면 분화가 시작된다. MDI를 처치한 1시간 뒤부터 nuclear protooncogenes인 c-fas, c-myc, c-jun 및 C/EBP  $\beta$ 와 C/EBP  $\delta$ 가 발현된다. 분화 과정 중 마지막 단계인 terminal differentiation은 5~7일의 시간이 소비된다. 이 시기에 지방세포는 섬유아세포의 상태에서 지방구의 모양으로 변형되고, PPAR  $\gamma$  및 C/EBP  $\alpha$ 의 발현이 증가한다.(13)

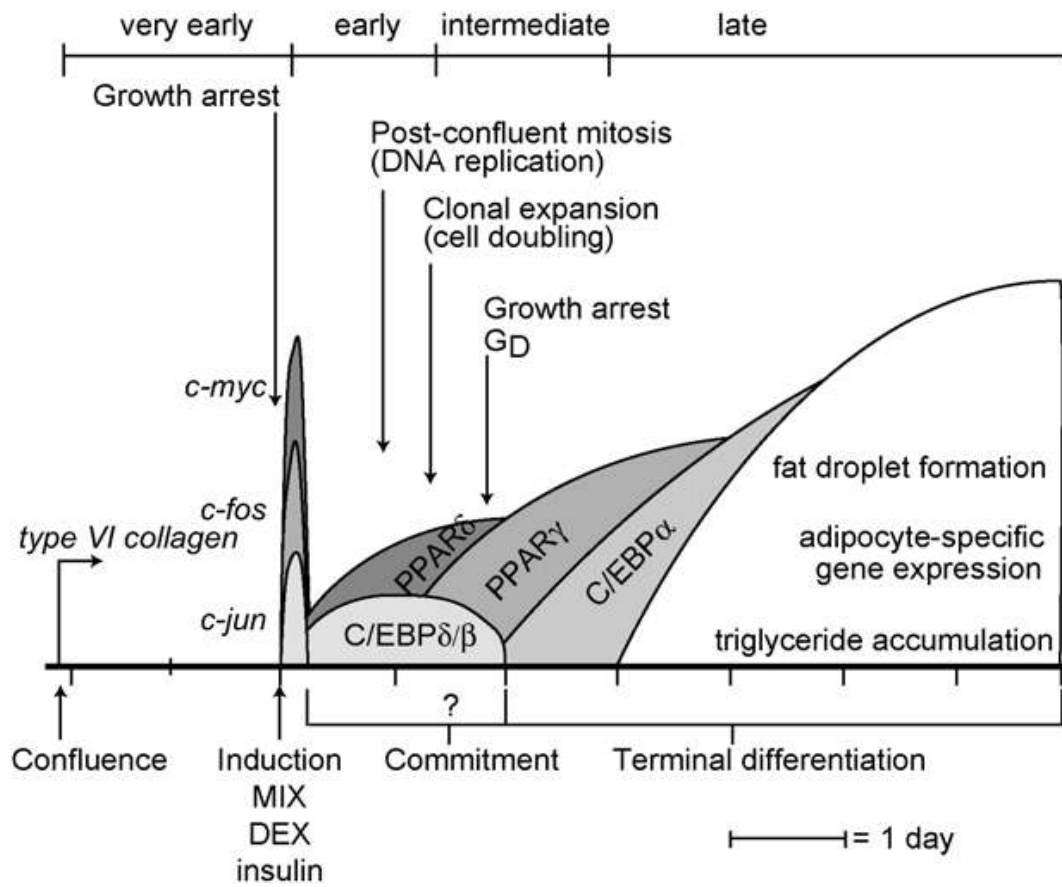


Fig 1. Progression of 3T3-L1 preadipocyte differentiation.

### 3. SIK (Salt Inducible Kinase)

#### 3-1. SIK family

SIK(Salt Inducible Kinase) family는 serine/threonine kinase 이고 AMPK(AMP-activated protein kinase) 중 하나로 전신의 에너지 대사에 중요한 역할을 한다.(14) SIK는 고나트륨 식이를 먹인 쥐의 부신에서 처음으로 복제되었다.(15) SIK는 3가지의 이성체가 있는데 SIK1은 부신 특이적 효소이고, 지방 특이적인 SIK2와 보편적(ubiquitously)으로 발현되는 SIK3가 있다.(16)

#### 3-2. SIK2

SIK2는 쥐의 지방조직에서 처음 발견되었고, 지방조직에서 가장 풍부하다.(16) SIK2는 백색지방조직에서 많이 발현되고 분화 초기 단계의 중요한 역할을 한다.(17) SIK2는 에너지 대사 및 호르몬과 영양소에 대한 반응으로 유전자 발현 조절에 영향을 미친다.(18) 지방세포의 분화 과정 동안 IRS-1이 인산화 되는 것을 토대로 SIK2가 insulin-signaling pathway와 연관이 있다는 것이 밝혀졌다. 3T3-L1 지방세포에서 SIK2가 Ser 798에서 IRS-1을 인산화시켜 백색지방에서 인슐린 저항성을 증가시킨다고 알려졌다.(17) 갈색지방 세포에서는 인슐린의 자극을 통한 SIK2 Ser587에서의 인산화를 증가시켜 SIK2의 활성이 감소되고 이로 인해 CRTC2의 탈인산화가 증가되어 thermogenesis의 바이오마커인 PGC-1 $\alpha$ 와 UCP1이 upregulate 된다.(19) 또한, SIK2는 인슐린에 반응하여 간의 포도당신생과정의 차단의 핵심 효소이다. 선행 연구에 따르면 인슐린이 phosphoinositide 3-kinase signaling의 Ser358 인산화의

유도를 통해 SIK2를 활성화시킨다고 밝혔다.(20)

식사를 하는 동안 SIK2가 CRTC2를 인산화시키고 간에서의 세포질 전위를 촉진한다. SIK2는 Ser 89에서 CRTC2의 탈아세틸화를 촉진하는 histone acetyl-transferase인 p300을 인산화하고 CRTC2-CBP/p300의 상호작용을 방해한다. SIK2에 의한 Ser 89에서 p300의 인산화는 ChREBP 전사 활성을 감소시켜 지방간 형성의 감소를 촉진한다.(21) 또한, SIK2는 Ser 171에서 TORC2를 인산화시키고 14-3-3 단백질과의 상호작용을 통해 세포질에 머물게 하여 CREB 의존성 유전자의 전사를 억제한다.(22)

### 3-3. SIK2 mutant

Ubiquitin은 lysine 잔기에 결합하여 복잡한 post-translational modification으로 작용하는 작은 단백질로 진핵생물 대부분의 조직에서 발견된다. Ubiquitylation은 이러한 ubiquitin을 다른 표적 단백질에 부착시키는 과정이다. Ubiquitin은 자체적으로 lysine을 보유하고 있기 때문에 유전자 서열 중 lysine에 결합하여 degradation을 일으키거나 단백질 활성의 조절자로 역할을 한다. 최근 monoubiquitin이 다양한 세포 단백질의 위치와 활성의 조절자라는 것이 밝혀졌다. 하나 이상의 ubiquitin 분자 사슬이 동일한 표적 단백질에 부착되면 그 단백질은 poly-ubiquitylated 되었다고 한다. 하나의 ubiquitin 단백질이 다른 poly peptide와 결합할 수 있는 방법이 다양하기 때문에 이로 인해 다양한 결과를 도출해 낼 수 있다는 것을 의미한다.(23) 유전자 변형 시, ubiquitin이 결합하는 것을 막을 수 있는 방법은 유전자 서열 중 K를 Q로 변형시키는 것이다. (24)

Figure 2는 SIK2의 post-translational modification site를 나타낸 그림이다. 본 실험에서는 3가지의 SIK2 mutagenic 3T3-L1을 만들어 실험을 진행하였다. Ubiquitylation site인 536과 702의 K를 Q로 변환시켰고, SIK2 inhibitor인 HG-9-91-01을 이용하여 SIK2 silencing의 효과를 볼 수 있는 mutant도 만들었다.

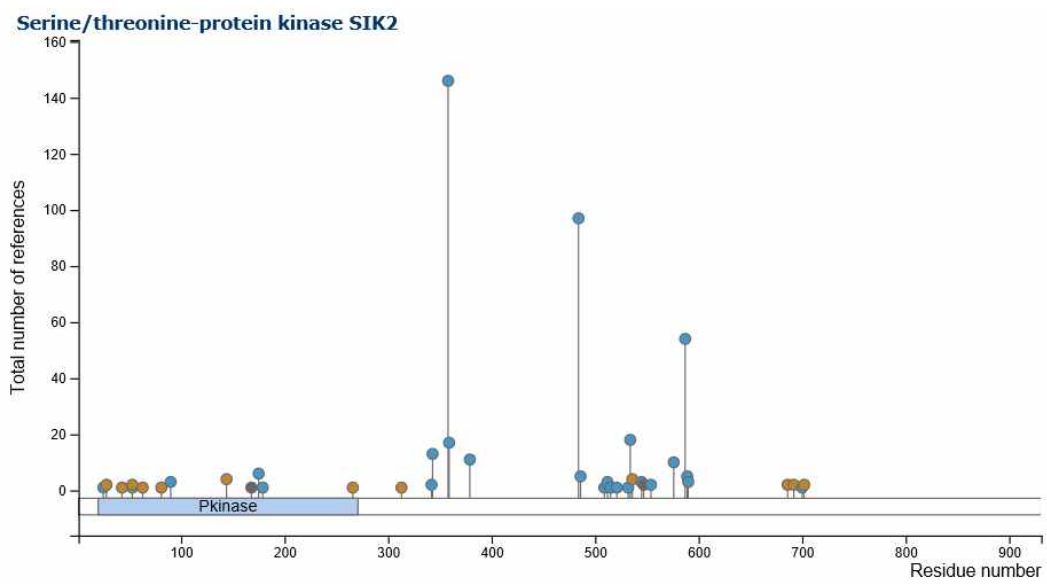


Fig 2. Post-translational modification sites of SIK2.

#### 4. 연구목적

최근 비만과 소금과의 연관성에 대한 연구가 많이 진행되고 있지만 아직 논란의 여지가 많다. 본 연구실에서 2,163명의 8, 9세 아동을 대상으로 진행한 실험을 통해 고농도의 소금을 섭취하였을 때, 비만의 위험도가 증가한다는 것을 발견하였다.(25) 하지만, 소금 섭취에 따른 비만의 기전에 관한 연구는 전무하다. 사전연구에서 고농도의 소금 섭취에 따라 SIK2 및 adipogenesis 관련 인자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다. 이에 따라, SIK2 mutagenic 3T3-L1 세포를 이용하여 adipogenesis 대사와의 연관성을 확인해보고자 하였다. SIK2 유전자 서열 중 다수의 전사후자리 (post-translational modification)를 변형하면 adipogenesis 대사가 변화할 것이라는 가설을 세웠다. 가설을 통한 본 연구의 목적은 소금을 섭취하였을 때 SIK2에 의한 adipogenesis 기전을 규명하고자 SIK2의 유비퀴틴화와 관련된 위치를 변형시킨 3T3-L1 세포가 adipogenesis에 미치는 영향에 대해 알아보는 것이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 3T3-L1 세포배양 및 분화

3T3-L1 전지방세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, Virginia, USA)에서 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)(Welgene, Daegu, Korea)에 10% BCS(Welgene), 1% penicillin-streptomycin(Welgene)에 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양 조건에 맞춰 배양하였다. 4일 동안 전지방세포 상태로 배양한 후, 분화를 유도하기 위해 MDI (1 uM dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-methyxanthine, 10 ug/ml insulin), 10% FBS(Welgene), 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM으로 배양하였다. 분화 유도 2일째 10% FBS와 10 $\mu$ g/ml insulin 배양액으로 이틀간 추가 배양을 실시하였고, 배지는 이틀에 한 번씩 교체하면서 8일 동안 세포를 배양하였다.

### 2. 세포독성검사(Cell viability assay)

Cell viability는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)(Duchefa, Haarlem, Netherlands) reagent를 사용하여 측정하였다. 지방세포를 96-well plate에 plating( $2.5 \times 10^4$  cells/mL)하였다. 24시간 후에 배지를 제거한 후,

소금을 농도별로 처리하여 24시간 동안 처치하였다. 배지를 제거하고 5mg/ml MTT solution 10 $\mu$ l를 각 well(0.1mg/ml) 만큼 되도록 하여 3시간 동안 배양하였다. MTT solution을 제거하고 각 well에 100 $\mu$ l dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma-Aldrich Co.)을 넣어 지방을 녹이고, microplate reader(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 570nm, 630nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종적으로 background 수치를 제거하여 570nm-630nm의 흡광도 값을 통해 결과를 얻었다.

Oil red O stocking solution을 0.5g의 Oil Red O 파우더()에 100ml의 isopropanol을 넣어 빛이 차단된 병에 넣고 충분히 녹을 때까지 stirring하여 상온에 보관하였다. 분화 완료된 6-well plate의 배지를 제거한 후, 1X PBS(Welgene)로 2회 세척하였다. 4% paraformaldehyde를 1ml 넣고 암실 상태로 실온에서 1시간 동안 고정시켰다. Paraformaldehyde를 제거한 후, 1X PBS(Welgene)로 5분씩 2회 세척하였다. Whatman으로 필터한 Oil red O stocking solution과 1X PBS를 6:4로 섞어 Oil red O working solution을 만들었다. Oil red O working solution 1ml을 6 well plate의 각 well에 주입하고 실온에서 1시간 동안 염색하였다. Oil red O working solution을 제거한 후, 1X PBS로 1회 세척하였다. 1X PBS를 1ml 넣은 상태에서 plate를 스캔하고 현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

### **3. Transfection method(Electroporation)**

3T3-L1 cell을 harvest한 후, cell counting하여 필요한 만큼의 cell을 1.5ml tube에 옮겨 담아 상온에서 90xg로 10분간 centrifuge하고 상층액을 제거하였다. Cell pellet에 4D-Nucleofector solution을 넣어

resuspend하고 plasmid DNA 또는 pmasGFP vector, nucleofector solution, supplement를 섞어 mastermix를 만들었다. 완성된 mastermix를 nucleocuvette에 넣고 4D-nucleofectorXunit에서 CM-137 program에서 기계에 설정되어 있는 3T3-L1을 작동시켰다. 기계 화면에 “100%”로 표시되면 nucleocuvette에 있는 세포를 plate에 seeding 하여 transfection을 완료하였다.

#### 4. Western Blotting analysis

3T3-L1 adipocytes는 50mM salt를 처리하여 배양하였다. 분화된 세포를 1X PBS로 씻어내고 trypsin-EDTA를 처리하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 얻어진 세포에 1X lysis buffer를 첨가하여 ice에 보관하면서 10분마다 vortex하는 과정을 약 8회 반복하였다. 그 후, 4°C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 취하고 상층액의 단백질을 정량하였다. 단백질은 Bradford 방법으로 정량하고 4X Laemmli Sample Buffer(Bio Rad, USA)와 2-mercaptoethanol을 섞어 sample을 만들었다.(Sigma-Aldrich, USA).(26)

Western blot sample은 10% SDS-PAGE Gel을 이용하여 100V로 30분, 120V로 60분 동안 전기영동한 후, transfer blot module(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 280mA에 90분 동안 nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. 단백질의 1차 항체는 SIK2(1:1000, Milipore, MA, USA), PPAR $\gamma$  (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), C/EBP $\alpha$  (1:500, Novus biologicals, Littleton, CO, USA)를 사용하였다. 2차 항체로 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는

anti-mouse(1:5,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. Membrane을 ECL solution A, B(Sigma-Aldrich, RPN2232, USA)에 반응시킨 다음, Chemidoc Imaging System(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)으로 촬영하였다.  $\beta$ -actin(1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 기준으로 단백질 발현량을 비교하였다.

## 5. Realtime-PCR

RT-PCR과 같은 방법으로 cell의 RNA를 lysis하였다. 유전자의 mRNA 수준을 분석하기 위해서 quantitative real-time PCR법을 이용하였다. DNTP(Takara Bio, Inc., Shiga, Japan)  $1\mu\text{l}$ , random primer(Invitrogen, San Diego, CA, USA)  $1\mu\text{l}$ , RNA, 증류수를 넣어 총량  $13\mu\text{l}$ 을 만든 후, T100™ Thermal Cycler(Bio-rad Laboratories, USA)를 사용하여  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 반응시켰다. 5X First Strand buffer(Invitrogen, San Diego, CA, USA)  $4\mu\text{l}$ , 0.1M DTT(Invitrogen, San Diego, CA, USA)  $1\mu\text{l}$ , Superscript III Reverse Transcriptase(Invitrogen, San Diego, CA, USA)  $1\mu\text{l}$ , 3차 증류수  $1\mu\text{l}$ 를 sample 개수만큼 만들어  $7\mu\text{l}$ 씩 RNA tube에 넣어 총  $20\mu\text{l}$ 를 만들었다. cDNA 합성을 위해  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 반응시킨 후,  $50^{\circ}\text{C}$ 에서 60분,  $70^{\circ}\text{C}$ 에서 15분,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서  $\infty$ 분 반응하도록 설정하였다. cDNA 합성 후 nano drop을 사용하여 양을 확인하였다. THUNDERBIRD™ SYBR qPCR Mix(TOYOBO, Osaka, Japan)  $10\mu\text{l}$ , forward primer와 reverse primer를 각각  $0.5\mu\text{l}$ , 증류수  $4\mu\text{l}$ 를 혼합하여 반응액  $15\mu\text{l}$ 을 만들었다. Primer의 sequence는 Table 1과 같다. 합성한

cDNA를 Hard-Shell PCR Plates 96-Well WHT/CLR(Bio-rad Laboratories, USA)에  $5\mu\text{l}$  넣고 만들어진 반응액  $15\mu\text{l}$ 을 넣어 총량  $20\mu\text{l}$ 을 맞추었다. CFX connect™ Real-Time system(Bio-rad Laboratories, USA)을 이용하여  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 반응시킨 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10초,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 20초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 20초를 1회로 조건을 맞추어 39cycle을 반응시켰다. 이후  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10초 동안 반응시킨 후 curve melting을 한 후 결과를 확인하였다.

**Table 1. Primers sequences used for quantification of gene expression by real-time PCR.**

Gene	Primers (F: Forward, R: Reverse)
SIK2	F : GGGTGGGGTTCTACGACATC
	R : GGTTCTGCCTCCACCGTTAT
Smad6	F : GGACAAAACAAGAAAGACGCACT
	R : AAGAGAAGGAGGAAGGAGAAGGAA
NR4A2	F : CCACCCAAGCTGGCTACCAA
	R : CGTCGCGTTCGGTGTATTTG
CTBP1	F : GGTCTGAACGAGGCTGTG
	R : AACCGTCACCAAACTGTTGT
MED1	F : GTGTGGTAATGGATGTGCAGGAC
	R : CTCCCGATAAGCCTCCTTTCTGA
Bcl2	F : GCTCTGGGTGTCTGTCTTCC
	R : ATGGCGCAGTGGAATCTCGA
Eif2ak3	F : TCCGTTGCTGATTGGAAGGTC
	R : CAATGTGTCCGGTCGCTTCTTC
GAPDH	F : CGTGCCGCCTGGAGAAACC
	R : TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

## 6. mRNA microarray

Trizol을 사용하여 추출한 RNA의 질은 RNA Nano Chip(Agilent Technologies, Amstelveen, The Netherlands)을 이용하여 Agilent 2100 bioanalyzer로 평가하였고, RNA 정량은 ND-2000 Spectrophotometer(Thermo Inc., DE, USA)를 이용하였다. RNA의 library를 만들기 위해 QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit(Lexogen, Inc., Austria)를 사용하여 제조사의 설명에 맞춰 진행하였다. 500ng의 RNA를 준비하여 5' 말단에 Illumina-compatible 서열을 포함하는 oligo-dT primer를 RNA에 결합시켜 역전사 하였다. RNA template의 분해 후, 2가닥 합성은 5' 말단에 Illumina-compatible linker 서열을 가진 random primer에 의해 개시되었다. 이중 가닥 library는 모든 반응 성분을 제거하기 위해서 자성 beads를 사용하여 정제하였다. Library는 클러스터 생성을 위해 필요한 완전한 adapter 서열을 추가하기 위해서 증폭되었다. 완성된 library는 PCR 구성요소로부터 정제되었고 NextSeq 500(Illumina, Inc, USA)을 이용하여 단일 처리 75개의 sequencing으로 높은 처리량을 수행하였다. QuantSeq 3' mRNA-Seq 분석은 Bowtie2(Langmead and Salzber, 2012)를 사용하였다. Bowtie2 지수는 게놈 조립체 서열 또는 게놈 및 전사체를 정렬하기 위한 대표적인 전사 서열로부터 생성되었다. 정렬 파일은 기록을 정리하고, 발현량을 추정하고, 유전자의 차별적인 발현을 검출하는 데 사용되었다. 차별적으로 발현된 유전자는 Bedtools(Quinlan AR, 2010)의 적용 범위를 사용하여 고유 및 다중 정렬의 계수를 결정하였다. RT(Read Count) 데이터는 Bioconductor(Gentleman et al., 2004)를 사용하여 R(R development Core Team, 2016) 내의

EdgeR을 사용하는 quantile 정규화 방법을 기반으로 처리되었다. 유전자 분류는 DAVID(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)와 Medline 데이터베이스(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)가 수행한 검색을 기반으로 하였다.

## 7. Pathway 추적

Microarray 결과를 Gene Ontology(GO)를 이용하여 카테고리를 설정하였다. 발현된 유전자들의 pathway를 분석하여 mutant들의 차이를 확인하기 위해서 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG Mapper)를 사용하여 pathway를 분석하였다.

## 8. 통계 분석

본 연구의 모든 실험은 3반복으로 수행하였으며, 평균±표준편차(mean±SD)로 결과값을 나타내었다. 실험 결과는 Statistical Package for the Social Science(SPSS) software version 22(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였다. 농도별 유의성 검증은 t-test와 ANOVA test를 이용하였고, *p*-value값이 0.05 미만일 때, 통계적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 판정하였다.

### Ⅲ. 연구 결과 및 고찰

#### 1. 세포독성검사

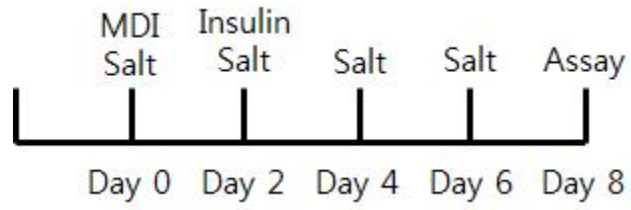
3T3-L1 cell에 소금을 처치하기 위해 적절한 소금의 농도를 찾기 위해 세포독성검사(MTT assay)를 진행하여 그 결과를 figure 3(b)에 나타내었다. 3T3-L1 cell의 pre-adipocyte 상태에서 5M NaCl을 0, 5, 10, 20, 40, 80, 100, 150, 200, 400mM로 희석하여 처치하였다. 24시간 동안 소금을 처치한 결과 0mM에서 80mM의 농도까지는 viability가 증가하다 100mM에서 감소하였고 150mM 부터는 급격한 cell death가 발생한 것을 알 수 있다. 위의 결과를 바탕으로 0, 25, 50, 100mM의 4가지 농도로 처치하여 다시 세포독성검사를 진행하였다. 0mM에서 50mM까지 viability가 증가하다 100mM에서부터 감소하였다.

3T3-L1 cell의 adipocyte 상태에서 소금을 처치하였을 때 지방이 형성되는 정도를 확인하기 위해 Oil red O staining을 하였다. Figure 3(a)와 같이 소금을 처치하며 세포를 분화시킨 후, 분화된 8일차에 Oil red O staining을 진행한 결과를 figure 3(c)에 나타내었다. 지방이 0, 25, 50mM이 될수록 많아졌고 100mM을 처치하였을 때는 급격하게 지방구가 감소하였다. MTT assay와 Oil red O staining의 결과를 바탕으로 소금의 농도를 50mM로 하여 실험을 진행하였다.

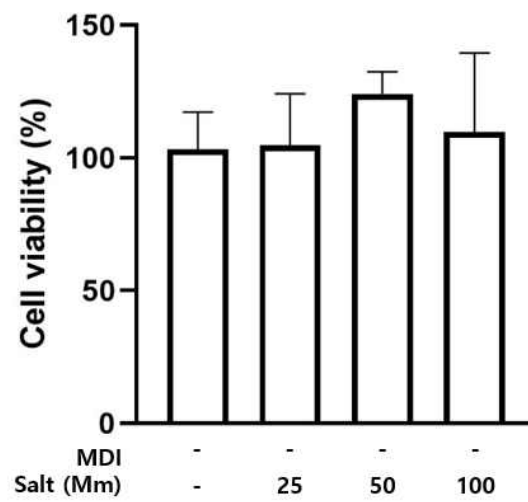
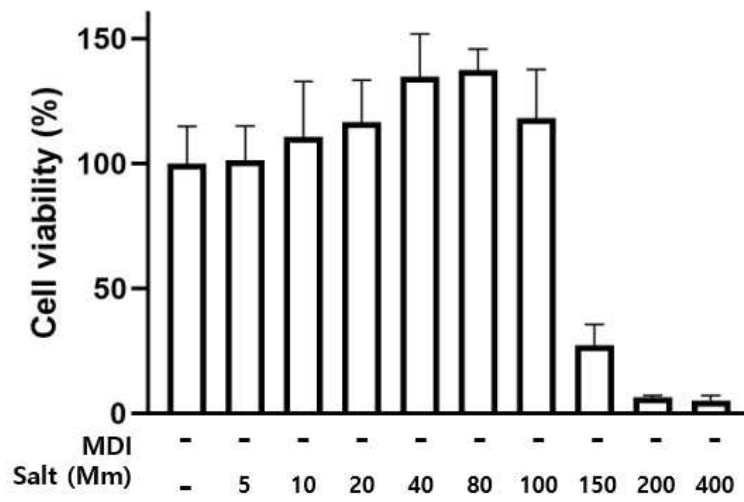
100mM의 소금에서는 세포의 생존률이 감소하고 지방량이 급격하게 줄어드는 것으로 보아 cell이 소금에 독성이 생겨 cell death가 발생한 것으로 보인다. 100mM 소금의 처치 농도는 실제로 DMEM media에 포함된 75mM의 소금을 추가하여 175mM의 소금 농도가 된다. 생체 항상성을 보

이는 소금 농도가 134~145mM이므로 175mM은 고농도로써 물과 소금 사이에 생리적으로 불균형한 상태를 유발할 것으로 보인다.(27) 따라서 생리적인 불균형이 발생하지 않고 지방 형성이 증가하는 50mM의 소금으로 실험을 진행하였다.

(a)



(b)



(c)

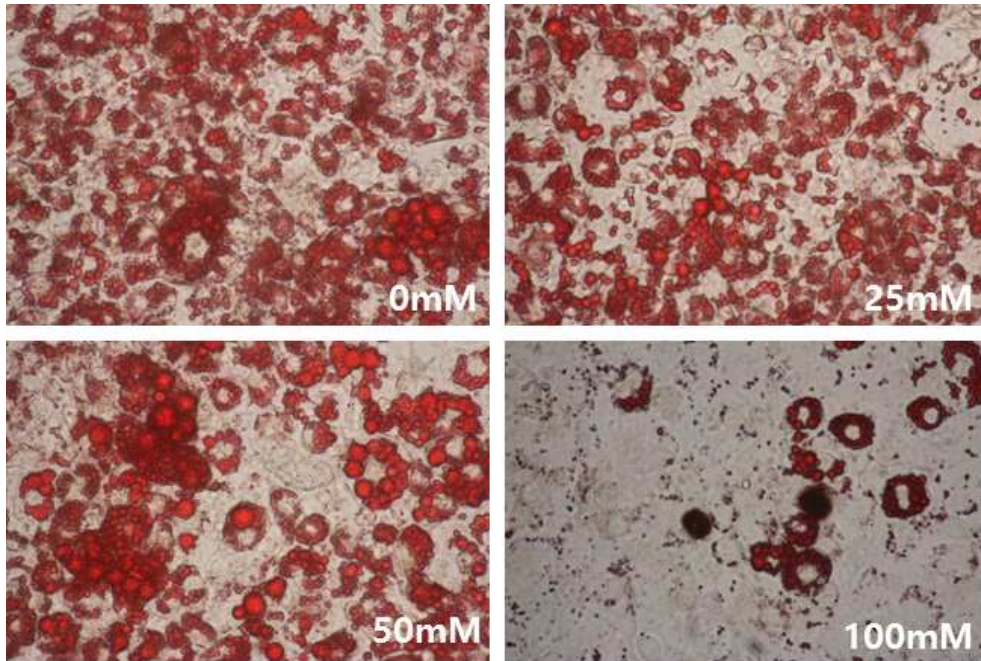


Fig 3. Viability on salt of pre-adipocyte and adipocyte 3T3-L1.

Schedule of 3T3-L1 adipocyte differentiation(a). Cell viability of salt in pre-adipocyte 3T3-L1 cell by MTT assay(b) ORO staining of adipocyte 3T3-L1 cell(c). MTT assay data are shown as mean  $\pm$  SD (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.0001$ ).

## 2. SIK2 mutant western blot

3T3-L1 세포(대조군)와 3가지의 SIK2 mutagenic 3T3-L1 세포들(K536Q, K702Q, KO)의 SIK2 및 adipogenesis 관련 인자인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 발현 정도를 western blotting analysis를 통해 실험하였다. SIK2의 발현도는 K702Q의 경우, 발현량 차이를 확인하기 위해서 western blot analysis를 진행하였다. Figure 4에서 확인할 수 있듯이 SIK2의 발현도는 K702Q의 경우 대조군과 비교하였을 때 변화가 없고, K536Q는 KO와 비슷한 수준으로 K702Q에 비해 활성이 감소한 것을 확인하였다. Adipogenesis 인자인 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 대조군에 비해 SIK2 mutagenic 3T3-L1 모두에서 발현도가 감소하였다. K536Q와 K702Q를 비교하였을 때 K536Q는 SIK2의 발현도가 작지만 adipogenesis가 발생한 것을 알 수 있고, 이와는 반대로 K702Q는 SIK2의 발현도가 크지만 adipogenesis 관련 인자의 발현도가 낮은 것을 확인할 수 있다.

SIK2 knock out(KO) in vivo에서 adipogenesis 인자인 PPAR $\gamma$ 의 발현은 감소하였으나 lipogenesis 인자인 FAS ACC1, SREBP1와 염증인자인 TNF $\alpha$ , IL-1beta 등은 증가하는 경향을 보였다. 즉, 지방조직에 SIK2가 없을 때 adiponectin의 분비가 줄고 당이 적게 흡수되어 지방조직에 염증반응을 일으키는 macrophage가 많아지기 때문이다.(28) 본 연구에서도 K536Q 세포에서 SIK2의 발현이 SIK2 KO 수준으로 낮았고 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$ 가 증가하는 경향을 보였고 정상군과 같은 SIK2의 수준을 보인 K702Q 세포는 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$ 가 감소하는 경향을 보였다. Park JY *et al*의 연구와 같이 in vivo 상에서 지방조직과 간 조직 간의 상호작용이 없는 세포연구에서 SIK2와 adipogenesis 간 상호작용

에 ubiquitylation이 미치는 기전 연구가 필요하다. 선행연구에서 SIK의 다른 isoform인 SIK1의 변이된 유전자 서열의 자리에 따라 ubiquitylation의 정도에 차이가 있다고 밝혀졌다.(29) 또한 단백질의 ubiquitylation site가 다양한 signaling pathway에 포함이 되어 있기 때문에(30) 인자들의 발현도에 차이가 발생하였다고 할 수 있다.

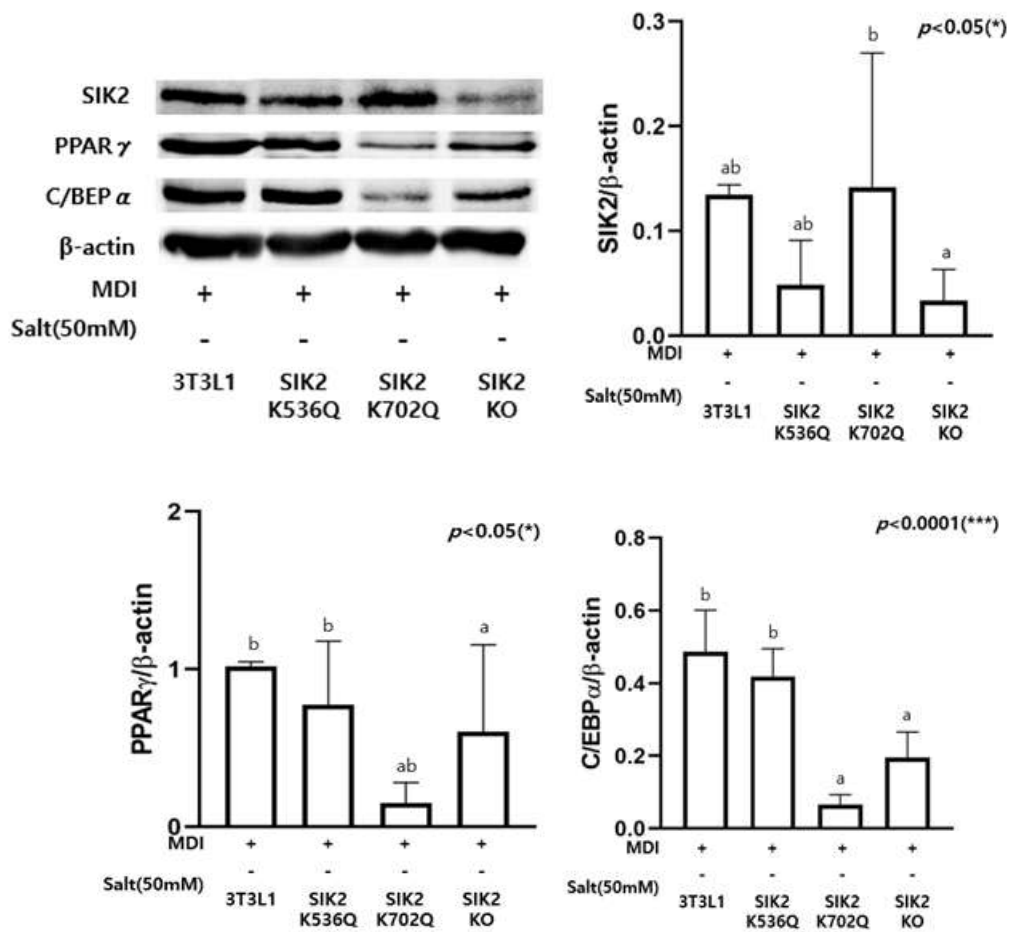


Fig 4. The expression of SIK2 and adipogenesis biomarkers(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ) in 3T3-L1 and SIK2 mutagenic 3T3-L1 cells. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (\*;  $p < 0.05$ , \*\*\*;  $p < 0.0001$ ).

### 3. mRNA microarray analysis

3T3-L1, K536Q, K702Q, KO 4종류의 세포를 mRNA microarray analysis를 진행하였다. 전체 도출된 유전자 중에서 Gene Ontology를 통해 fat cell differentiation과 관련된 유전자를 선별하였다. 우선적으로, 대조군과 비교하였을 때 SIK2 mutagenic 3T3-L1 세포들의 fold change가 2배, 3배, 4배일 때의 유전자 목록을 정리하였다. 목록을 통해 fold change가 3배 및 4배 차이가 나는 경우 유의적으로 나타나는 유전자의 수가 적어 최종적으로 fold change가 2배 차이나는 유전자 목록으로 실험을 진행하기로 결정하였다. 발현된 유전자들을 scatter plot으로 나타낸 것이 figure 5이다. 붉은색은 up-regulation을 나타내고 초록색은 down-regulation을 의미하고 검정색은 발현이 없음을 뜻한다. Table 2는 scatter plot의 결과를 표로 나타낸 것이다. 붉은색은 up-regulation을 나타내고 푸른색은 down-regulation을 의미하고 색이 더 진해질수록 더 높거나 낮은 발현도임을 의미한다. 대조군과 비교하여 K536Q는 43개, K702Q는 18개, SIK2 KO는 41개가 유의적인 유전자로 나타났다. K536Q 및 K702Q에 나타난 유전자 목록 중 SIK2 KO와 공통적으로 발현된 유전자들은 SIK2와 연관된 유전자가 아니기 때문에 이를 제외하고 K536Q, K702Q에만 발현된 유전자들을 선별하여 실험을 진행하였다(table 3). Table 3에 나타난 것과 같이 K536Q cell에서는 Leucine-rich repeat-containing protein 8C(Lrrc8c), SMAD Family Member 6(Smad6), Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A(NR4A2), Nudix Hydrolase 7(NUDT7), Bardet-Biedl syndrome 9(Bbs9), C-terminal-binding protein 1(CTBP1), Kruppel-like factor 4(KLF4), Mediator Complex Subunit

1(MED1)이 up-regulate되었고 Peroxisomal Biogenesis Factor 11 Alpha(PEX11A), Nipped-B-like protein (Nipbl), Transmembrane Protein 120A(Tmem120a), Early B Cell Factor 2(Ebf2), CCAAT/enhancer-binding protein alpha(CEBP  $\alpha$ ), Transmembrane Protein 120B(Tmem120b)가 down-regulate되었다. K702Q cell에서는 SMAD Family Member 6(Smad6), Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3(Eif2ak3)가 up-regulate 되었고, down-regulate된 유전자는 없었다.

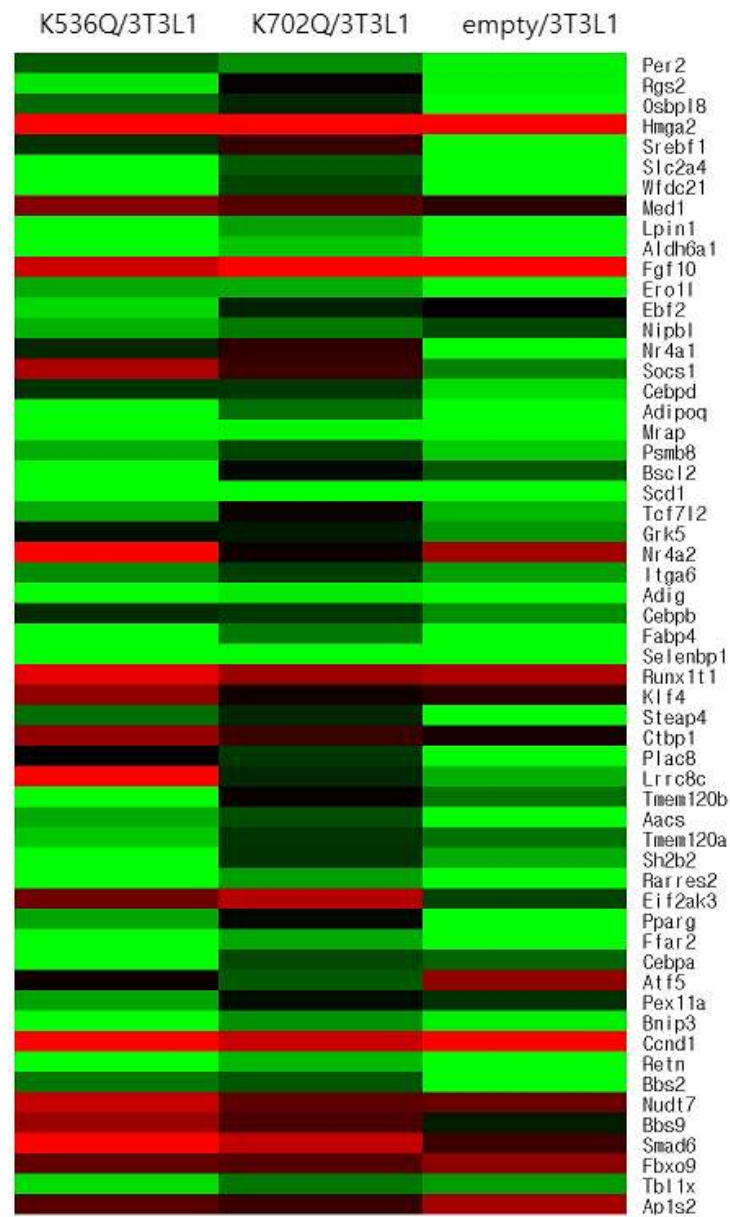


Fig 5. Scatter plot of mRNA microarray analysis significant gene lists comparing SIK2 mutagenic cells to 3T3-L1 cell on the standard of 2 folds. (green; up-regulation, red; down-regulation, black; no expression)

**Table 2. Significant gene selections of SIK2 mutagenic 3T3-L1 cell in fat cell differentiation category.**

K536Q		K702Q		SIK2 KO	
Gene symbol	Fold change	Gene symbol	Fold change	Gene symbol	Fold change
Hmga2	18.090	Fgf10	4.759	Hmga2	23.327
Ccnd1	6.939	Hmga2	4.233	Ccnd1	5.501
Lrrc8c	5.427	Ccnd1	2.945	Fgf10	4.430
Smad6	5.184	Smad6	2.797	Runx1t1	2.526
Nr4a2	4.944	Eif2ak3	2.623	Ap1s2	2.435
Runx1t1	3.433	Runx1t1	2.301	Atf5	2.191
Fgf10	3.023	Per2	0.466	Fbxo9	2.147
Nudt7	2.906	Bnip3	0.458	Socs1	0.499
Socs1	2.485	Rarres2	0.430	Cebpb	0.469
Bbs9	2.304	Lpin1	0.427	Grk5	0.448
Ctbp1	2.236	Ffar2	0.410	Tb11x	0.438
Klf4	2.153	Ero11	0.401	Itga6	0.426
Med1	2.029	Retn	0.377	Sh2b2	0.400
Itga6	0.476	Aldh6a1	0.351	Tcf712	0.377
Pparg	0.419	Adig	0.289	Psmb8	0.335
Pex11a	0.418	Mrap	0.267	Cebpd	0.308
Ero11	0.405	Selenbp1	0.213	Bnip3	0.280
Tcf712	0.404	Scd1	0.109	Per2	0.274
Aacs	0.403			Rgs2	0.274
Psmb8	0.398			Wfdc21	0.250
Nipbl	0.387			Srebf1	0.242
Tmem120a	0.348			Ero11	0.237
Ebf2	0.314			Steap4	0.184
Tb11x	0.311			Adipoq	0.168
Rgs2	0.295			Plac8	0.166
Bscl2	0.251			Osbp18	0.163
Cebpa	0.203			Aacs	0.158
Sh2b2	0.186			Bbs2	0.151
Bnip3	0.153			Lpin1	0.119

Lpin1	0.132			Rarres2	0.111
Fabp4	0.131			Mrap	0.106
Tmem120b	0.084			Ffar2	0.098
Wfdc21	0.083			Retn	0.082
Rarres2	0.077			Adig	0.073
Adipoq	0.061			Slc2a4	0.067
Aldh6a1	0.060			Nr4a1	0.055
Slc2a4	0.051			Fabp4	0.047
Adig	0.030			Selenbp1	0.042
Retn	0.028			Pparg	0.040
Mrap	0.023			Aldh6a1	0.039
Selenbp1	0.020			Scd1	0.014
Ffar2	0.013				
Scd1	0.011				

1) Red means up-regulation and blue means down-regulation.  
Darker color means higher expression level.

**Table 3. Significant gene list of SIK2 K536Q and SIK2 K702Q.**

Mutant	Gene	fold change
SIK2 K536Q	Lrrc8c	5.427
	Smad6	5.184
	NR4A2	4.944
	NUDT7	2.906
	Bbs9	2.304
	CTBP1	2.236
	KLF4	2.153
	MED1	2.029
	PEX11A	0.418
	Nipbl	0.387
	Tmem120a	0.348
	Ebf2	0.314
	Bscl2	0.251
	CEBP $\alpha$	0.203
	Tmem120b	0.084
SIK2 K702Q	Smad6	2.797
	Eif2ak3	2.623

1) Red means up-regulation and blue means down-regulation. Darker color means higher expression level.

#### 4. Pathway 추적 결과

KEGG Mapper를 바탕으로 유전자들 간 관련이 있는 pathway들을 추적한 결과를 figure 6에 나타냈다. mRNA microarray analysis 결과를 바탕으로 도출된 유전자들이 adipogenesis와 연관된 metabolic pathway를 정리하여 cAMP signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, ER stress로 나누어 실험을 진행하였다.

cAMP signaling pathway는 protein kinase A를 시작으로 SIK2, CREB regulated transcription coactivator 2(CRTC2), cAMP Response Element Binding protein(CREB)을 통해 adipogenesis 인자인 C/EBP  $\alpha$ 로 통한다. CREB는 adipogenesis를 증진시킨다고 밝혀져있다.(31) 또한, KEGG mapper 분석을 통해 MED1과 NR4A2가 cAMP signaling pathway와 연관되는 유전자임을 알았고, 이는 adipogenesis와 연관된다.

TGF- $\beta$  signaling pathway는 Smad 2/3를 통해(32) adipogenesis 초기 인자인 C/EBP  $\beta/\delta$ 를 통한다. 다음의 기전에 Smad 6와 CTBP1은 TGF- $\beta$  signaling pathway가 adipogenesis와 연관되어 지는 것을 막는 유전자이다.

비만은 지방조직에서 ER stress를 유발한다.(33) ER stress는 PKR-like ER kinase(PERK), Eif2ak3, activating transcription factor 4(ATF4)를 지나 adipogenesis 관련 인자가 증가한다는 것을 분석하였다. Bsc12는 ER stress와 연관이 있다는 것을 사전 연구를 통해 알 수 있었다.(34)

선행연구에서 metabolic pathway의 변화를 확인하기 위해 mRNA microarray analysis를 진행하였다.(35) SIK2는 호르몬과 영양소에 반

응하여 여러 가지 신호 전달 경로와 관련 유전자 발현을 조절하는 것으로 알려져있다.(16) KEGG mapper를 통해 metabolic pathway를 분석한 연구에서 cAMP signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, ER stress 등의 metabolic pathway가 비만과 adipogenesis에 중추적인 역할을 담당하고 정상 및 병리학적 지방 형성을 조절한다고 밝혔다.(36)



## 5. Real-time PCR

mRNA microarray 결과 도출된 유전자들의 gene ontology 중 fat cell differentiation과 관련된 유전자들을 선별하여 real-time PCR을 진행하였다. 4종류의 cell에 소금을 처치하였을 때 adipogenesis 관련 유전자의 발현도의 차이를 알아보았다.

NR4A2는 분화를 위한 전사조절자이고 도파민 기능 장애, 파킨슨병, 분열증, 조울증과 연관이 있는 유전자이다. 대조군인 3T3-L1에서는 소금을 처치하였을 때 NR4A2의 발현도가 증가하였다. K536Q는 대조군에 비해 발현도가 약 2배 정도 차이가 났고 소금을 처치하였을 때 처치하지 않았을 때와 비교하여 감소하였다. K702Q의 경우 소금을 처치하였을 때 발현도가 약 2배 유의적으로 증가하였다. SIK2 KO에서도 소금을 처치하였을 때 발현도가 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다.(fig 7a)

MED1은 지방산, 트리아실글리세롤, 케톤체 대사와 관련이 있고 크로마틴의 조절 및 아세틸화와 연관이 있다. 3T3-L1은 소금을 처치한 것과 하지 않았을 경우의 발현도가 일정하였다. K536Q는 대조군에 비해 약 2배 가량 MED1의 발현이 증가하였지만 소금에 의해 조금 감소하였다. K702Q는 소금을 처치하였을 때 발현이 약 2배의 유의적인 증가를 확인하였다. SIK2 KO군에서도 소금을 처치하였을 때 발현이 유의적으로 증가하였다.(fig 7b)

Smad6는 신호변환기, 전사조절기의 역할을 하는 유전자이다. 3T3-L1은 소금을 처치하였을 때 발현도가 조금 증가하였다. K536Q는 대조군에 비해 발현도가 증가하고 소금을 처치하였을 때 감소하였다. K702Q에서는 소금을 처치하였을 때 발현도가 감소하였다. 이는 Smad6가 BMP 및 TGF- $\beta$  signaling pathway를 막는 유전자이기 때문에 K702Q 세포에

서는 adipogenesis가 발생하였다는 것을 알 수 있다. SIK2 KO에서도 소금을 처치하였을 때 NR4A2의 발현도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.(fig 7c)

CTBP1은 전사 억제자로 세포의 증식과 연관이 있는 유전자로 cell development 중 유전자 발현과 관련성이 있다. 3T3-L1은 소금의 처치 유무와 상관없이 발현도가 일정하였다. K536Q는 소금을 처치하였을 때 CTBP1의 발현이 감소하였다. K702Q에서는 소금을 처치하였을 때 발현도가 감소하였다. Smad6와 마찬가지로 BMP 및 TGF- $\beta$  signaling pathway를 막는 유전자이기 때문에 K702Q 세포에서는 adipogenesis가 발생하였다는 것을 알 수 있다. SIK2 KO는 소금을 처치하였을 때 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.(fig 7d)

Bsc12는 지방세포 분화에 필수적인 지질대사 조절인자이며 에너지 항상성의 조절로 ER stress와 연관이 있는 유전자이다. 3T3-L1은 소금을 처치하였을 때 Bsc12의 발현이 감소하였다. K536Q는 대조군에 비해 발현도가 증가하였지만 소금을 처치하였을 경우에는 발현도가 감소하였다. K702Q와 SIK2 KO는 소금을 처치하였을 때 유의적으로 증가하는 경향을 보였다.(fig 7e)

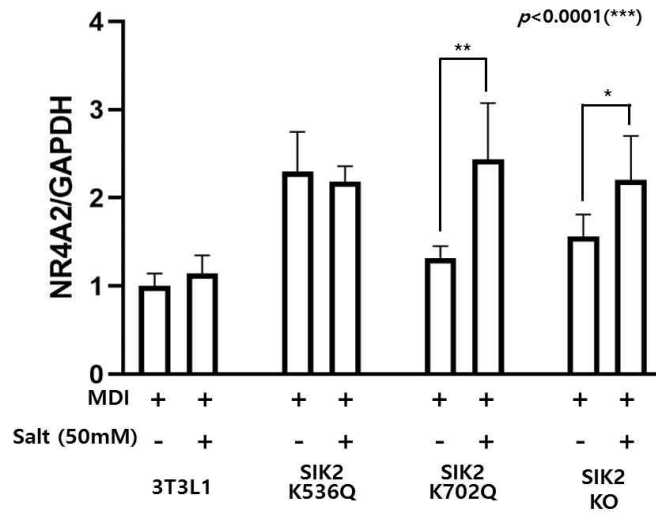
Eif2ak3는 ER stress와 연관이 있는 유전자로 미토콘드리아의 형태와 기능을 제어하는 역할을 한다. 3T3-L1은 소금을 처치 시 증가하였다. K536Q는 대조군에 비해 발현도가 3배 가량 증가하였으나 소금의 처치 유무와는 관련성이 없었다. K702Q는 소금을 처치하였을 때 Eif2ak3의 발현도가 유의적으로 2배 증가한 것을 확인하였다. SIK2 KO에서 또한 소금을 처치하였을 때 발현도가 유의적으로 증가하였다.(fig 7f)

Adipogenesis에 negative regulation을 나타내는 유전자인 Samd6와 CTBP1을 제외한 모든 유전자가 K702Q에서 발현이 크게 증가하였다.

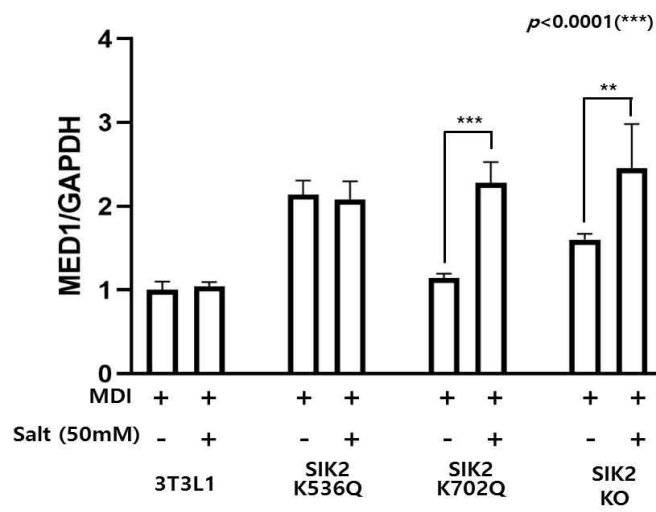
SIK2 KO 세포에서도 소금을 처치하였을 때 두 유전자의 발현이 증가한 것으로 보아 SIK2 이외에 다른 metabolic pathway와 연관성이 있는 것으로 보인다. K536Q에서는 소금을 처치 유무에 따른 유전자의 발현이 유의적인 차이를 보이지 않는다. Ubiquitylation site와 연관된 두 유전자가 다른 경향을 보인다는 것을 선행연구를 통해 확인하였다.(29)

Real-time PCR을 통해 SIK2가 변형된 K536Q, K702Q 세포 중 SIK2의 활성이 높은 경우인 K702Q에 소금을 처치하였을 때 adipogenesis 관련 유전자의 발현이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이와는 반대로 SIK2의 활성이 상대적으로 낮은 경우인 K536Q에 소금을 처치하였을 때 adipogenesis 관련 유전자의 발현이 증가하지 않는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 SIK2의 활성유무를 판정하는데 ubiquitylation과 관련된 유전자 자리를 이용하였기 때문에 Wnt signaling pathway, cAMP signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, ER stress 등과 관련된 유전자가 adipogenesis 관련 유전자로 포함되어 도출된 것으로 보인다.(35) 향후 metabolic pathway 분석을 통해 관련성이 높은 유전자를 도출하여 반복 실험을 진행해야한다.

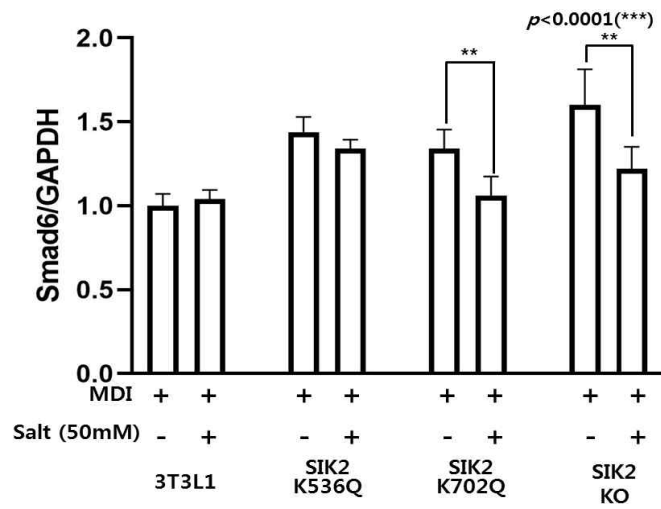
(a)



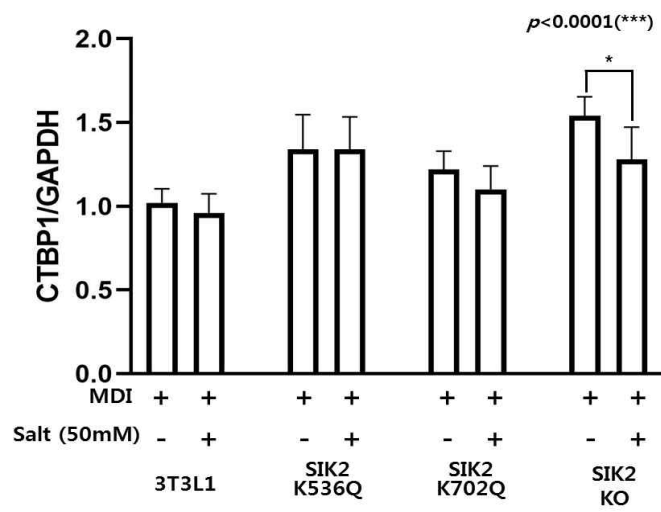
(b)



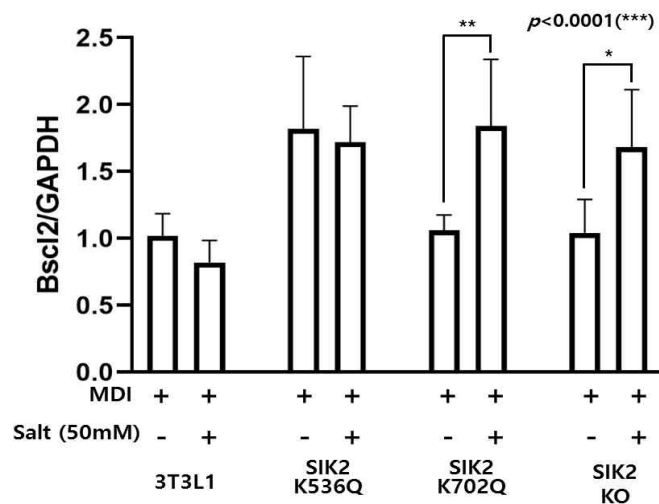
(c)



(d)



(e)



(f)

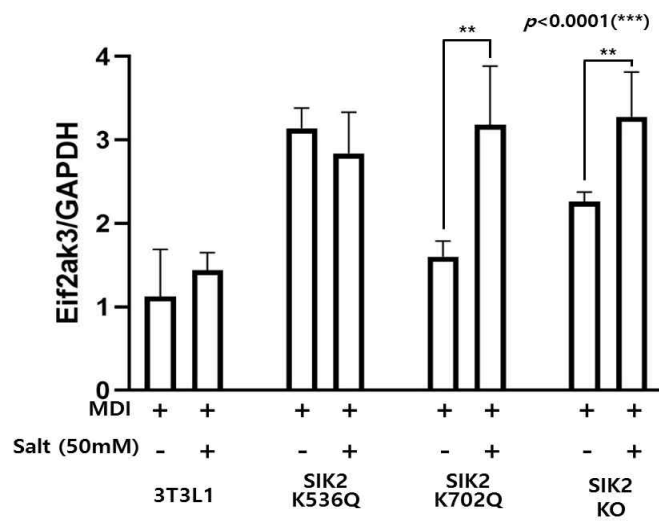


Fig 7. Real-time PCR of genes of mRNA microarray result. Values are expressed as mean  $\pm$  SD (\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.0001$ ).

## IV. 요약 및 결론

소금에 의하여 발현되는 salt-inducible kinase(SIK)의 이성체 중 백색지방조직에서 발현되는 SIK2는 분화초기단계에서 에너지 대사와 관련 유전자 발현조절에 영향을 미친다. 따라서 SIK2의 유전자 서열에서 전사 후 조절자리(post-translational modification)를 변형하면 지방세포의 adipogenesis 대사가 변화한다는 가설을 바탕으로 실험을 진행하였다. 본 연구의 목적은 소금을 처치하였을 때 SIK2에 의한 adipogenesis 기전을 규명하고자 SIK2의 유비퀴틴화(ubiquitylation)와 관련된 위치를 변형시킨 SIK2 mutagenic 3T3-L1세포가 adipogenesis에 미치는 영향에 대해 알아보는 것이다.

3T3-L1 preadipocyte 상태에서 세포독성검사(MTT assay)를 진행하여 소금의 처치농도를 50mM로 정하였다. 0, 25, 50, 100mM의 농도로 분화된 3T3-L1 세포에 oil Red O staining을 진행한 결과 50mM에서 가장 지방이 많이 생긴 것을 확인하였다. Lonza 기계를 이용한 electroporation 방법으로 2 종류의 SIK2 ubiquitylation-mutagenic 3T3-L1(K536Q, K702Q)과 SIK2 KO cell(negative control)을 만들었다. 3T3-L1, K536Q, K702Q, SIK2 KO 세포의 SIK2 발현 및 adipogenesis 관련 인자인 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 발현을 western blotting analysis를 통해 확인하였다. 위의 결과를 바탕으로 3T3-L1, K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서 mRNA microarray 분석을 진행하여 도출된 관련 유전자들을 중심으로 real-time PCR을 통해 SIK2 mutagenic 3T3-L1과 adipogenesis 관련 유전자와의 연관성을 확인하였다.

3T3-L1(대조군), K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서의 SIK2

및 adipogenesis 인자의 발현을 확인한 결과 K536Q와 K702Q cell에서 PPAR $\gamma$  및 C/EBP $\alpha$  발현이 감소하였다. 반면 SIK2 발현은 K702Q 에서는 변화가 없고 K536Q에서 SIK2 KO 수준으로 감소하였다. 3T3-L1에 비하여 K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에서 지방세포 분화와 관련된 발현의 fold change가 2배 이상 차이가 나는 유전자를 도출하였다. 도출된 유전자 중 SIK2 KO와 공통적으로 발현된 유전자를 제외한 다음 Leucine-rich repeat-containing protein 8C(Lrrc8c), SMAD Family Member 6(Smad6), Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A(NR4A2), Nudix Hydrolase 7(NUDT7), Bardet-Biedl syndrome 9(Bbs9), C-terminal-binding protein 1(CTBP1), Kruppel-like factor 4(KLF4), Mediator Complex Subunit 1(MED1), Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3(Eif2ak3) 등은 증가한 유전자로 Peroxisomal Biogenesis Factor 11 Alpha(PEX11A), Nipped-B-like protein (Nipbl), Transmembrane Protein 120A(Tmem120a), Early B Cell Factor 2(Ebf2), CCAAT/enhancer-binding protein alpha(CEBP $\alpha$ ), Transmembrane Protein 120B(Tmem120b) 등은 감소한 유전자로 선별되었다. Metabolic pathway를 추적하여 SIK2 기전과 연관이 있는 유전자로 Smad6, NR4A2, CTBP1, MED1, Bsc12, Eif2ak3를 선별하였다. K536Q, K702Q, SIK2 KO cell에 소금을 처치 시 Smad6, NR4A2, CTBP1, MED1, Bsc12, Eif2ak3 유전자 모두 대조군에 비하여 발현이 증가하였다. 특히, K702Q에 소금을 처치 시 SIK2, NR4A2, MED1, Bsc12, Eif2ak3 유전자는 모두 처치하지 않았을 때와 비교하여 발현이 증가하였다. 이와는 반대로 Smad6 및 CTBP1은 소금을 처치하였을 때 유전자 발현이 감소하였다.

본 실험을 통해 SIK2가 변형된 K536Q와 K702Q세포 중에서 SIK2 활성이 있는 경우(K702Q)에만 소금 처치 시 adipogenesis 관련 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

SIK2 mutagenic 3T3-L1에서 mRNA microarray 분석으로 adipogenesis 관련 유전자를 총체적으로 도출하였다. 비록 SIK2 KO cell이 대조군으로 사용되었으나 SIK2의 활성유무를 판정하는데 ubiquitylation 자리를 이용하였기 때문에 Wnt signaling pathway, cAMP signaling pathway, TGF- $\beta$  signaling pathway, ER stress 등과 관련된 유전자가 adipogenesis 관련 유전자로 포함되어 도출되었다. 향후 이러한 유전자를 구별 및 선별하는 metabolic pathway 방법으로 관련성이 높은 유전자를 도출하여 반복 실험이 필요하다. 이는 비만이 인종별, 생애주기별, 성별에 따라 다양한 환경인자로부터 발생하기 때문에 비만 phenotypes의 다양성을 확인하는데 매우 필요하다. 특히 본 연구가 소금 섭취에 의한 비만발생의 기전을 규명하는데 기초자료로 사용되기를 희망한다.

## 참고문헌

- [1] Heo SH, Yoo SM, Heo SH, Yoon HY (2018) Meta-analysis of effects of functional salt intake on serum total cholesterol, triglyceride, insulin, and chloride levels of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47(2): 222-228.
- [2] Kim DH, Rhim JW, Lee SB (2003) Characteristics of seaweed salts prepared with various seaweeds. *Korean J Food Sci Technol* 35(1): 62-66.
- [3] Powles J, Fahimi S, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Ezzati M, Engell RE, Lim SS, Danaei G, Mozaffarian D; Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group(NutriCoDE) (2013) Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ Open* 2013;3: e003733.
- [4] Son SM, Heo GY, Lee HS (2005) Development and evaluation of validity of dish frequency questionnaire(DFQ) and shor DFQ using Na index for estimation of habitual sodium intake. *Korean J Community Nutrition* 10(5): 677-692.

[5] Son SM, Heo KY (2002) Salt Intake and Nutritional Problems in Korean. Korean J Community Nutrition 7(3): 381-390.

[6] Kim SJ, Cho MH, Lee KH (2009) Comparative study between the salinities of soups preferred by customers and provided at institutional foodservice establishments. J East Asian Soc Dietary Life 19(3): 444-450.

[7] Schoeller DA (2008) Insights into energy balance from doubly labeled water. International Journal of Obesity 32: S72-S75.

[8] Son YJ, Song EK (2012) Impact of health literacy on disease-related knowledge and adherence to self-care in patients with hypertension. Journal of Korean Academy of Nursing 35: 1258-1267.

[9] Haslam DW, James PT (2005) Obesity. Lancet 366: 1197-1209.

[10] Kelly T, Yang W, Chen CS, Reynolds K, He J (2008) Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. International Journal of Obesity 32: 1431-1437.

[11] Albracht-Schulte K, Kalupahana NS, Ramalingam L, Wang Shu, Rahman SM, Robert-McComb J, Moustaid-Moussa N (2018) Omega-3 fatty acids in obesity and metabolic syndrome: a mechanistic update. *Journal of Nutritional Biochemistry* 58: 1-16.

[12] Newell FS, Su H, Tornqvist H, Whitehead JP, Prins JB, Hutley LJ (2006) Characterization of the transcriptional and functional effects of fibroblast growth factor-1 on human preadipocyte differentiation. *The FASEB Journal* 20(14): 2615-2617.

[13] Mathew M, Alison S, William DJ (2007) Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. *Journal of the American Academic Dermatology* 56(3): 472-492.

[14] Carling D (2004) The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. *TRENDS in Biochemical Sciences* 29(1): 18-24.

[15] Wang ZN, Takemori H, Halder SK, Nonaka Y, Okamoto M (1999) Cloning of a novel kinase(SIK) of the SNF1/AMPK family from high salt diet-treated rat adrenal. *FEBS letter* 453: 135-139.

[16] Katoh Y, Takemori H, Horike N, Doi J, Muraoka M, Min L, Okamoto M (2004) Salt-inducible kinase(SIK) isoforms: their involvement in steroidogenesis and adipogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 217: 109-112.

[17] Horike N, Takemori H, Katoh Y, Doi J, Min L, Asano T, Sun XJ, Yamamoto H, Kasayama S, Muraoka M, Nonaka Y, Okamoto M (2003) Adipose-specific Expression, Phosphorylation of Ser<sup>794</sup> in Insulin Receptor Substrate-1, and Activation in Diabetic Animals of Salt-inducible Kinase-2. *Journal of Biological Chemistry* 278(20): 18440-18447.

[18] Yang FC, Lin YH, Chen WH, Huang JY, Chang HY, Su SH, Wang HT, Chiang CY, Hsu PH, Tsai MD, Tan BCM, Lee SC (2013) Interaction between Salt-inducible Kinase (SIK2) and p97/VCP Regulates ER-associated Protein Degradation in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 288: 33861-33872.

[19] Muraoka M, Fukushima A, Viengchareun S, Lombes M, Kishi F, Miyauchi A, Kanematsu M, Doi J, Kajimura J, Nakai R, Uebi T, Okamoto M, Takemori H (2009) Involvement of SIK2/TORC2 signaling cascade in the regulation of insulin-induced PGC-1 $\alpha$  and UCP-1 gene expression in

brown adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E1430-E1439.

[20] Dentin R, Liu Y, Koo SH, Hedrick S, Vargas T, Heredia J, Yates III JR, Montminy M (2007) Insulin modulates gluconeogenesis by inhibition of the coactivator TORC2. *Nature* 449(20): 366-369.

[21] Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 141-150.

[22] Screaton RA, Conkright MD, Katoh Y, Best JL, Canettieri G, Jeffries S, Guzman E, Niessen S, Yates III JR, Takemori H, Okamoto M, Montminy M (2004) The CREB Coactivator TORC2 Functions as a Calcium- and cAMP-Sensitive Coincidence Detector. *Cell* 119: 61-74.

[23] Linda Hicke (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Molecular cell biology* 2: 195-201.

[24] Filtz TM, Vogel WK, Leid M (2014) Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Cell Press* 35(2): 76-85.

[25] Lee MS, Kim MK, Kim SM, Park HS, Park CG, Park HK (2015) Gender-based differences on the association between salt-sensitive genes and obesity in Korean children aged between 8 and 9 years. PLoS ONE 10(3): e0120111.

[26] Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72(1-2): 248-254.

[27] Lee MS, Sorn SBR, Lee YK, Kang IH (2019) Salt induces adipogenesis/lipogenesis and inflammatory adipocytokines secretion in adipocytes. Int. J. Mol. Sci ()

[28] Park JY, Yoon YS, Han HS, Kim YH, Ogawa Y, Park KG, Lee CH, Kim ST, Koo SH (2014) SIK2 is critical in the regulation of lipid homeostasis and adipogenesis in vivo. Diabetes 63(3): 3659-3673.

[29] Stewart R, Akhmedov D, Robb C, Leiter C, Berdeaux R (2012) Regulation of SIK1 abundance and stability is critical for myogenesis. PNAS 110(1): 117-122.

[30] Wagner SA, Beli P, Weinert BT, Nielsen ML, Cox J, Mann M, Choudhary C (2011) A proteome-wide, quantitative

survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Mol. Cell. Proteomics* 10(10): 1-41.

[31] Qi L, Saberi M, Zmuda E, Wang Y, Altarejos J, Zhang X, Dentin R, Hedrick S, Bandyopadhyay G, Hai T, Olefsky J, Montminy M (2009) Adipocyte CREB promotes insulin resistance in obesity. *Cell metabolism* 9(3): 277-286.

[32] Rebbapragada A, Benchabane H, Wrana J.L., Celeste A.J., Attisano L. (2003) Myostatin signals through a transforming growth factor  $\beta$ -like signaling pathway to block adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 7230-7242.

[33] Cnop M, Foufelle F, Velloso LA (2012) Endoplasmic reticulum, stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine* 18(1): 59-68.

[34] Ito D, Suzuki N (2007) Molecular pathogenesis of seipin/BSCL2-related motor neuron diseases. *Annals of neurology* 61(3): 237-250.

[35] Yang XM, Cao XY, He P, Li J, Feng MX, Zhang YL, Zhang XL, Wang YH, Yang Q, Zhu L, Nie HZ, Jiang SH, Tian GA, Zhang XX, Liu Q, Ji J, Zhu X, Xia Q, Zhang ZG (2018) Overexpression of Rac GTPase Activating Protein 1

contributes to proliferation of cancer cells by reducing hippo signaling to promote cytokinesis. *Gastroenterology* 155: 1233-1249.

[36] Jiang H, Wu W, Zhang M, Li J, Peng Y, Miao T-t, Zhu H, Xu G (2014) Aberrant upregulation of miR-21 in placental tissues of macrosomia. *Journal of Perinatology* 34: 658-663.

## ABSTRACT

### **A study on the effect of sodium on adipogenesis using SIK2 mutagenic 3T3-L1**

Sung So Young

Department of Food & Nutrition

Graduate School of

Sungshin University

Obesity, an imbalance between energy intake and expenditure, is a risk factor of various metabolic diseases. Being obese starts with the increase of number of body fat and leads to the adipocyte hypertrophy. Malfunction of adipose tissue results in increased insulin resistance and metabolic functions. Numerous studies have shown that high-salt intake is associated with obesity, insulin resistance, type 2 diabetes, and cardiovascular disease. However, further studies to figure out metabolic pathway related to salt is needed. Salt-inducible kinases(SIKs), serine/threonine kinase, are one of the AMP-activated protein kinase(AMPK) family. Recently, its diverse functions were known to regulate salt homeostasis and metabolism among many tissues. SIK2 is abundantly expressed in adipocytes and its role is crucial. Here, it is to find what

SIK2 mutagenic 3T3-L1 cell affects on adipogenesis when salt is treated. 3T3-L1 cells were cultured throughout this study. MTT assay was done to figure out cell viability on salt in pre-adipocyte. Furthermore, oil Red O staining was administrated in adipocyte. Salt concentration was determined to be 50mM through two experiments. Ubiquitin is a small protein found in almost all tissues of eukaryotes, acting as a post-translational modification. Ubiquitylation is the process of attaching ubiquitin to other target proteins. As ubiquitin has its own lysine, it binds well to lysine residues in the gene sequence and causes degradation or acts as a regulator of protein activity. In order to exclude the effect of ubiquitin, K should be changed to Q in gene sequence. In this study, K positions of 536 and 702 of the SIK2 gene sequence were transformed to Q. SIK2 mutagenic 3T3-L1 cells were transfected by electroporation method using Lonza. Four cells were set up; 3T3-L1(control), SIK2 K536Q, SIK2 K702Q, SIK2 KO(negative control). Western blotting analysis was used to figure out the expression level of SIK2 and adipogenesis related factors, PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$ . The expression level of SIK2 in K702Q was not changed when compared to the control. K536Q was similar to KO and the activity was decreased compared to K702Q. Adipogenesis factors were decreased in expression compared to the control. In comparison with SIK2 mutagenic 3T3-L1, K536Q exhibits low expression of SIK2 but

high in adipogenesis factors, however, K702Q expressed opposite results. mRNA microarray analysis were done on four cells. By using gene ontology of cell differentiation, each genes were categorized. The categorized genes were then selected on the standard of fold change comparing to control. Genes were analyzed by using KEGG mapper to figure out each metabolic pathways. Real-time PCR were used to compare expression level on each cells when salt is treated or not treated. Particularly in K702Q cell, cAMP signaling pathway related genes, NR4A2, MED1, increased when salt is treated. Moreover, expression of ER stress related genes, Bsc12 and Eif2ak3, increased when high in salt. However, negative regulator of TGF- $\beta$  signaling pathway, Smad6 and CTBP1, decreased when salt is treated. This study showed that K702Q, SIK2 activated cell, is related to adipogenesis when salt is treated. However, K536Q, SIK2 less activated cell, does not have correlation with adipogenesis when salt is treated. As the standard of SIK2 mutagenic cells was ubiquitylation, there were various genes related to different metabolic pathways. As obesity occurs from various environmental factors, race, and sex, it is necessary to confirm diverse obesity phenotype. In particular, it is expected that this study will be used as a basis for the study of the mechanism of obesity induced by salt intake.