



## 고나트륨 섭취가 비만 관련 유전자 발현에 미치는 영향

이민지<sup>1\*</sup> · 박미영<sup>2\*</sup> · 김주희<sup>1</sup> · 성소영<sup>1</sup> · 이명숙<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>성신여자대학교 식품영양학과, <sup>2</sup>비만과학연구소

## Impacts of High Sodium Intake on Obesity-related Gene Expression

Minjee Lee<sup>1\*</sup>, Miyoung Park<sup>2\*</sup>, Juhee Kim<sup>1</sup>, Soyoung Sung<sup>1</sup> and Myoungsook Lee<sup>1,2†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

<sup>2</sup>Research Institute of Obesity Sciences, Sungshin Women's University, Seoul 01133, Republic of Korea

### ABSTRACT

This research was conducted to determine the impact of high sodium intake on various obesity-related genes. Four week old Sprague-Dawley rats were purchased at Daehan Biolink. After one week of fertilization, the rats were used at 5 weeks of age. Rats were divided into three groups that received sodium orally at 0 mM(CON), 100 mM(Salt-100 mM), or 400 mM(Salt-400 mM). After 3 weeks, rats were sacrificed and used in the experiment. Triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) were measured in the blood serum and liver. The activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were analyzed to test the hepatic toxicity. Genes related to lipogenesis and adipogenesis, uncoupling protein1 (UCP1), and tumor necrosis factor-alpha (TNF-α) were expressed in the liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). The levels of albumin and creatinine were measured in the urine. The TG and TC levels in blood serum were highest in the Salt-100 mM group, while liver TG and TC were highest in the Salt-400 mM group. Lipogenesis and adipogenesis related genes in the liver did not increase proportionally to salt concentration. In visceral and subcutaneous fat, peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) and CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPα) were up-regulated proportionally with increasing sodium levels. These results suggest that high sodium intake provoked adipogenesis in SD rats. In BAT, the expression of UCP1 was lower in the Salt-400 mM group than the CON group. Additionally, TNF-α in visceral fat and urine albumin and creatinine were higher in salt treated groups than the CON group. Overall, the results indicate that high sodium intake may be associated with obesity and complications.

**Key words:** sodium, obesity, PPARγ, C/EBPα

### 서 론

비만은 체내에 지방조직이 과다하게 축적된 상태로, 필요한 에너지보다 과잉 섭취하거나 섭취한 에너지보다 소모한 에너지가 적을 경우 발생하며, 유전적 요인, 스트레스 및 내분비계 이상 등 원인이 다양하다(Kim DJ 등 2009). WHO에서는 전 세계 성인의 과체중 및 비만 인구가 지속적으로 증가하여 2016년에는 19억 명에 이르렀으며, 비만이 당뇨병, 심혈관 질환, 암 등 만성질환의 위험성을 높인다고 발표했다(Yon MY 등 2011; World Health Organization 2018). 2017년 OECD 보고서에 따르면, BMI>30인 비만의 유병률이 미국, 멕시코 및 영국(47%, 39% 및 35%)에 비하여 우리나라의 경우 5.5%로 매우 낮은 수준이다. 그러나 20년 전과 비교했을

때 BMI>30의 비만 발생률이 2.2%에서 5.5%로 증가하였고, 2030년에는 9%까지 증가할 것으로 예측되어 대책 마련이 필요할 것으로 생각된다(Organization for Economic Co-operation and Development 2017).

국민건강영양조사(2010~2014년) 연구에 의하면, 고나트륨을 섭취할수록 BMI가 증가하고, 남성이 여성보다 나트륨 섭취와 비만의 상관성이 더 높았다(Kim JH 등 2015; Cheon SY 등 2017). 본 연구실에서 주도한 한국 소아비만 코호트 연구에서도 8~9세 소아가 약 3,500 mg/일 이상 나트륨을 섭취할 경우, 그 이하로 섭취한 경우보다 비만 발생 위험도가 5.27배 증가하였다(Lee MS 등 2015). 나트륨 섭취는 소금에 민감한 유전자에 따라 비만뿐만 아니라, 비만 대사 관련 조직에 영향을 주므로 고혈압, 뇌졸중, 신장 질환, 위암, 골다공증 등 질병 발생의 위험 또한 높다고 알려져 있다(Jung JH & Lee MS 2017; Lee MS 등 2017). 더불어 나트륨의 섭취가 1 g 증가할수록 당 첨가 음료의 소비가 17% 가량 증가하여

\* These two authors contributed to this work equally.

† Corresponding author : Myoungsook Lee, Tel: +82-2-920-7211, Fax: +82-2-920-2076, E-mail: mlee@sungshin.ac.kr

과체중 및 비만의 위험도가 높았다(Grimes CA 등 2013). 우리나라에서도 짠 음식의 섭취에 의한 갈증 현상이 당이 함유된 청량음료 섭취를 증가시켰고, 이는 소아비만의 중요한 원인을 확인하였다(He FJ 등 2008). 고나트륨 식이(3.12%)를 9주간 섭취한 동물실험에서도(Wistar 수컷 쥐) 대조군(0.5%)에 비하여 피하, 부고환 지방의 양이 유의적으로 증가하였고, 식욕을 조절하는 렙틴 호르몬의 발현이 증가하였다(Fonseca-Alaniz MH 등 2007). 지방조직에서는 인슐린이 활성화되어 포도당 흡수가 촉진되어 지방합성 및 지질대사 이상이 나타났다(Fonseca-Alaniz MH 등 2008). 고나트륨 섭취는 실험동물의 뇌에서 도파민을 분비시켜 식욕을 자극하고, 과식을 유도함에 따라 비만을 초래하였다(Cocores JA & Gold MS 2009). 이와 같이 고나트륨 섭취 시 체중 및 체지방 증가 등을 확인한 인체 및 동물실험 연구는 많지만, 비만 유발과 관련된 기전(지방조직의 분화 및 활성화와 관련된 유전자 연구 등)을 규명하기 위한 동물실험은 전무하다.

조직의 지방축적에는 에너지를 소비하는 갈색지방조직(brown adipose tissue; BAT)보다는 에너지를 저장하는 백색지방조직(white adipose tissue; WAT)이 관여하는 것으로 알려져 있다(Park MJ 2005). 또한 WAT는 지방세포의 증식 및 분화를 통해 성숙한 지방세포를 생성하는 과정(adipogenesis)과 중성지방을 합성하기 위해 지방산을 생합성하는 과정(lipogenesis)에 의해 조절된다(Vázquez-Vela MEF 등 2008). 그 중 adipogenesis에 관련된 대표적인 유전자는 peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR $\gamma$ )와 CCAAT/enhancer-binding protein alpha(C/EBP $\alpha$ )가 있다. PPAR $\gamma$ 는 인슐린에 민감한 전사인자로서 지방세포 분화 초기에 미성숙한 지방세포를 성숙한 지방세포로 만드는 역할을 하고, C/EBP $\alpha$ 는 PPAR $\gamma$ 와 함께 발현되는 유전자로, 두 유전자는 WAT 증식에 상호 작용한다. 그러나 지방조직에 지방이 과다하게 축적되면 염증성 사이토카인이 분비되는데, 이 중 tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )는 인슐린 수용체 감수성을 억제함으로써 인슐린 저항성을 유발한다(Cha BS & Park SE 2006). 인슐린 저항성을 보이는 비만의 경우, 제2형 당뇨병의 발병 위험이 높은 것은 TNF- $\alpha$  증가와 관련이 있다(Esser N 등 2014). BAT는 ATP를 합성하는 대신 미토콘드리아 내막에 있는 uncoupling protein 1(UCP1)을 통해 지방산을 산화하고, 열을 발생(thermogenesis)하여 비만 발생 위험도를 감소시킨다(Park MJ 2005). 따라서 비만을 예방하기 위해서는 lipogenesis와 adipogenesis 관련 유전자 및 열 발생 인자 등의 발현에 영향을 미치는 지방축적 관련 환경인자를 우선 고려하여야 한다.

본 연구는 고나트륨 섭취에 따른 비만 발생을 확인한 소아비만 코호트 연구결과를 기반으로 나트륨과 비만 발생의 관련 기전을 규명하고자 Sprague-Dawley(SD)계 수컷 흰쥐에

게 나트륨을 농도별(0 mM, 100 mM, 400 mM)로 투여하여 다양한 조직(혈액, 간, 지방조직)에서 비만 관련 바이오마커(adipogenesis, thermogenesis, 유전자 발현)를 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물 및 식이

실험동물은 대사케이지를 이용하여 생후 4주령된 SD계 수컷 흰쥐 총 24마리(평균 체중 88.15 g, 대한바이오링크)를 1주간 적응시켰다. 적응 후에는 각 실험 군당 8마리씩 난괴법으로 배치하고, 3주간 normal chow(Rodfeed, 대한바이오링크)를 공급하면서 나트륨 공급량에 따라 CON군, Salt-100 mM군, Salt-400 mM군으로 나누어 구강 투여하였다. 동물사육실의 온도는 22.6°C, 습도는 19%로 유지하였으며, 명암은 12시간(9:00~21:00) 광주기로 조절하였다. 물은 매일 100 mL씩 급여하였으며, 식이 조성 형태는 Table 1과 같다. 식이 섭취량, 물 섭취량, 체중은 매일 1회 같은 시간에 측정하였다. 식이효율(food efficiency ratio; FER)은 체중증가량(g)을 식이 섭취량(g)으로 나눠 계산하였다. 희생 24시간 전 식이 공급은 중단하고, 24시간 노는 여과한 후 4°C에서 보관하였다. 실험동물은 에틸 에테르로 마취한 후 전혈을 채취하였고, 간, 위, 신장, 신장지방, 내장지방, 부고환지방, 심장, BAT, 피하지방 순으로 적출하여 -80°C의 deep freezer에 보관한 후, 6개월 이내에 조직 분석을 완료하였다. 동물실험은 성신여자대학교 동물연구윤리위원회로부터 승인(SSWU AEC 2011-001)을 받은 후 진행되었다.

### 2. 실험방법

#### 1) 조직의 지질농도 측정

혈청 중 triglycerides(TG), total cholesterol(TC) 값은 효소법을 토대로 중성지방 측정용 시액 kit(ASAN pharmaceutical, Seoul, Korea)와 총콜레스테롤 측정용 시액 kit(ASAN pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하였다. 효소시약 750  $\mu$ L에 표준액 5  $\mu$ L를 넣고 표준 곡선을 그린 다음, 표준액 대신 측정 시료를 5  $\mu$ L를 넣고 TG는 10분간, TC는 5분간 37°C incubator에 암실 상태로 방치하였다. 이후 Multiskan Spectrum(Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finland)을 이용하여 각각 550 nm, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간 조직의 TG 및 TC는 지질을 Folch법으로 추출한 다음 혈청용 kit를 사용하였다(Folch J 등 1957). 결과값은 흡광도를 표준 곡선( $y=ax+b$ )에 대입하여 구한  $x$ 값으로 나타내었다.

#### 2) 간 독성 검사

간의 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotrans-

**Table 1. Nutrients, ingredients and its composition in diet**

| Nutrients(%)               | 3 groups           |             |             |             |
|----------------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|
|                            | CON                | Salt-100 mM | Salt-400 mM |             |
| Carbohydrate <sup>1)</sup> | 60.89              | 60.89       | 60.89       |             |
| Protein                    | 18                 | 18          | 18          |             |
| Fat <sup>2)</sup>          | 5                  | 5           | 5           |             |
| Fiber                      | 4.4                | 4.4         | 4.4         |             |
| Vitamins                   | 2.6                | 2.6         | 2.6         |             |
| Minerals                   | Calcium            | 1.11        | 1.11        |             |
|                            | Phosphorus         | 0.93        | 0.93        |             |
|                            | Potassium          | 0.57        | 0.57        |             |
|                            | Magnesium          | 0.22        | 0.22        |             |
|                            | Salt <sup>3)</sup> | 0.28(+0)    | 0.28(+0.58) | 0.28(+2.34) |
|                            | Ash                | 6           | 6           | 6           |
| Total <sup>4)</sup>        | 100                | 100         | 100         |             |

<sup>1)</sup> Corn, wheat, middlings, soybean meal, corn gluten meal.

<sup>2)</sup> Soybean oil, fish oil.

<sup>3)</sup> The percentage of salt orally administrated is written in parentheses. The composition of salt(%) is converted by its molecular weight.

<sup>4)</sup> The percentage of oral administration is excluded.

fecrase(ALT)는 대사산물로 각각 oxaloacetate와 pyruvate를 만든다. 즉, 2,4-dinitrophenylhydrazine(DNPH) 시약과 oxaloacetate 혹은 pyruvate이 반응하여 hydrazone을 생성하는 원리를 이용한 Reitman-Frankel method(ASAN pharmaceutical, Seoul, Korea)로 분석하였다. 혈청과 시약을 반응시켜 AST는 37°C에서 60분, ALT는 30분간 방치한 다음 0.4 N-NaOH 용액에 혼합하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였고, 결과값은 TG, TC와 동일한 방법으로 계산하였다.

### 3) 단백질분리 및 Western Blotting

간, 내장지방, 피하지방, BAT를 1.0 g씩 잘라 조직 무게의 3,000배만큼 lysis buffer(RIPA buffer, EDTA, protease inhibitor)와 beads를 넣어 조직 분쇄기(Next Advance, Averill Park, NY, USA)로 파쇄하였다. 이후 4°C에서 30분 동안 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 얻고, Bradford 방법으로 단백질을 정량하였다(Bradford MM 1976). Western blot sample은 10% SDS-PAGE gel(UCP1은 12%)을 이용하여 100 V로 30분, 120 V로 90분 동안 전기영동한 후, transfer blot module(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 사용하여 280 mA에 90분 동안 nitrocellulose membrane으로 단백질을 이동시켰다. 단백질의 1차 항체는 acetyl-CoA carboxylase (ACC; 1:1,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA,

USA), PPAR $\gamma$ (1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), C/EBP $\alpha$ (1:500, Novus biologicals, Littleton, Co, USA), UCP1(1:1,000, Abcam, Cambridge, MA, USA), TNF- $\alpha$  (1:1,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)를 사용하였다. 2차 항체로 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 는 anti-mouse (1:5,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), ACC와 UCP1 및 TNF- $\alpha$ 는 anti-rabbit(1:5,000, Enzo Life Science, Plymouth Meeting, PA, USA)을 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, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)과 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH; 1:1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 vinculin (1:1,000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)을 기준으로 단백질 발현량을 비교하였다.

### 4) 뇨 분석

뇨 중 알부민(albumin)은 QuantiChrom™ BCG albumin assay kit(BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)를 이용하여 비색정량법으로 측정하였다. 희석한 뇨는 반응 시약에 5분 방치한 다음 570 nm와 670 nm에서 흡광도를 측정하여 계산

하였다. 뇨 크레아티닌(creatinine)은 Jaffe 반응법을 이용한 Embiel creatinine test kit((주)Embiel, Korea)로 측정하였다. 희석한 뇨에 제단백 정색 시약을 혼합하여 10분 동안 3,000 rpm으로 원심분리한 후 20분간 방치한 다음 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. 통계처리

모든 실험은 3반복을 진행하였으며, 본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 22.0(Statistical Package for the Social Science Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램으로 분석하여 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 한 후 Duncan's multiple range test로  $p$ -value<0.05인 수준에서 유의성을 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 식이·물 섭취량, 체중, 식이 효율 변화

실험동물의 3주간 식이 및 물 섭취량, 체중, 식이 효율 변

화는 다음과 같다(Fig. 1). 사육 기간이 길어질수록 모든 실험동물의 식이 섭취량은 증가하는 경향을 보였다. 1주차에는 CON군보다 Salt 투여군(100 mM군 및 400 mM군)에서 섭취량이 증가하였고( $p<0.05$ ), 2주차에는 CON군 및 Salt-100 mM군보다 Salt-400 mM군에서 유의적으로 식이 섭취량이 증가하였다( $p<0.001$ ). 3주차 식이 섭취량은 Salt-400 mM군에서 가장 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 실험 기간 동안 물 섭취량 및 체중은 CON군, Salt 투여군 간의 유의적인 차이가 없었다. 식이 효율은 1주차에 Salt-100 mM군이 유의적으로 낮았고( $p<0.05$ ), Salt-400 mM군, CON군 간에는 유의적인 차이가 없었다. 하지만 2주차에 Salt-400 mM군의 식이 효율이 현저하게 낮아지면서 CON군의 식이 효율이 Salt 투여군에 비해 유의적으로 높게 나타났다( $p<0.05$ ). Wistar 쥐에게 9주간 고나트륨 식이를 제공한 타 연구에서 대조군에 비해 3.12%의 나트륨 식이를 제공받은 고나트륨군에서 식이와 물 섭취량이 유의적으로 증가하는 것으로 확인되었다(Fonseca-Alaniz MH 등 2007). 본 연구에서 나트륨 투여 농도에 따라 식이 섭취량은 유의적인 차이를 보였으나, 물 섭

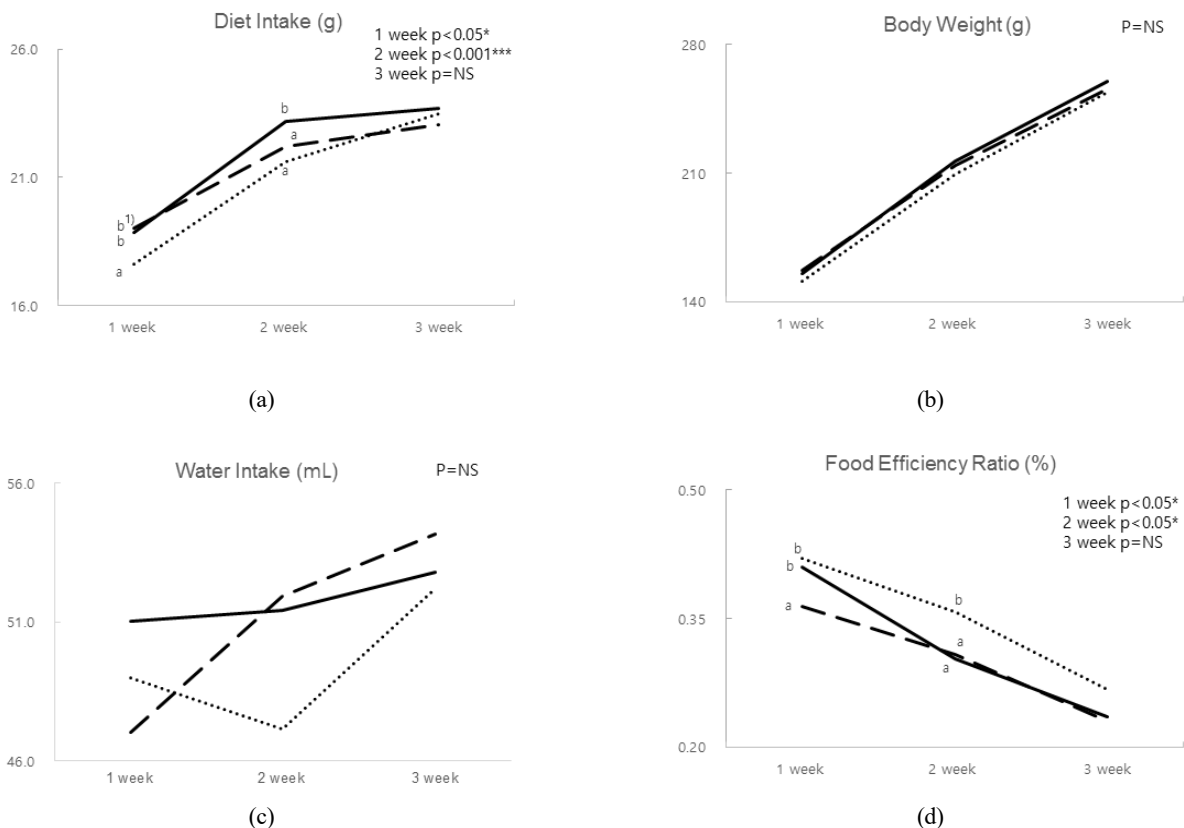


Fig. 1. Changes in diet intake, body weight, water intake, food efficiency ratio during 3 weeks of salt treatment.

..... CON, --- Salt-100 mM, — Salt-400 mM. Food efficiency ratio(%) = body weight gain(g/d) / food intake(g/d).

1) The data are presented as mean±S.D. of 8 independent rats. Means with different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

취량이 증가하지 않은 것은 단기간의 실험 및 상대적으로 낮은 나트륨 투여 농도로 인한 결과로 보인다. 또한 체중 변화가 유의적이지 않은 것은 실험동물의 성장 시기에 따른 전반적인 식이 섭취량의 증가가 원인인 것으로 사료된다.

## 2. 조직(간, 신장, 지방) 무게

각 조직의 무게는 Table 2와 같다. 실험군의 총 WAT의 무게는 나트륨 섭취 농도와 비례하여 유의적으로 증가하였다 ( $p < 0.01$ ). 또한 체중 대비 WAT의 무게 비율도 같은 경향을 보였다 ( $p < 0.01$ ). BAT를 포함하여 간, 신장의 무게는 실험군 간의 유의성을 보이지 않았으나, 신장의 무게는 나트륨 투여 농도에 의존적으로 증가하여 Salt-400 mM군에서 가장 높게 나타났다 ( $p < 0.05$ ).

나트륨과 비만의 상관성을 확인하고자 9주간 쥐를 사육한 타 연구에서도 쥐의 체중 변화는 유의적이지 않았으나, 나트륨 농도에 따른 WAT 무게가 증가하였다(Fonseca-Alaniz MH 등 2007). 따라서 WAT 무게 및 WAT/weight 비율의 결과, Salt-400 mM군은 고나트륨 섭취로 인해 지방조직이 증가한 반면 근육형성(제지방)이 억제되었으며, CON군은 제지방 비율 증가에 따른 체중 증가가 일어난 것으로 유추할 수 있다.

## 3. 혈청 및 간 조직의 지질농도 및 간 손상 변화

혈청 및 간 조직에서 TG와 TC를 측정된 결과, 혈청 및 간의 TG와 TC 모두 CON군에 비해 Salt 투여군에서 증가하였다 (Table 3). 혈청 TG는 CON군에서 가장 낮았으며, CON군 대비 Salt-100 mM군은 51%, Salt-400 mM군은 25% 증가하였다 ( $p < 0.001$ ). 혈청 TC 또한 Salt-100 mM군에서 가장 높았으며, CON군에 비하여 15% 가량 증가하였다 ( $p < 0.05$ ). 간 TG는 CON군에 비하여 Salt-100 mM군에서 약 22.6%, Salt-400 mM군에서 40.6% 증가하여 나트륨 투여 농도와 비례하여 높아졌

다 ( $p < 0.001$ ). 간 TC는 CON군 대비 Salt-100 mM군에서 약 5%, Salt-400 mM군에서 25% 높아졌으나 유의성을 보이지 않았다.

비만의 지표로 혈중 TG 및 TC가 증가하는 고지혈증 현상이 나타나는데, 고지방 식이로 비만을 유도한 동물실험에서 혈청 TG 및 TC가 증가하였고(Li M 등 2016), 체질량지수가 높은 사람에서도 TG 및 TC를 포함한 혈액 생화학적 지표가 유의하게 증가하였다(Na YK 등 2014). 본 연구에서도 앞서 언급한 연구들과 같은 결과를 보였으며, 이는 고나트륨 섭취가 지방조직뿐만 아니라, 혈청과 간에도 지질을 축적하였고, 특히 간에서의 지방 축적은 Salt-400 mM군에서 가장 높았다.

에너지 공급 과잉으로 간 내 지질 축적이 계속될 경우 비알코올성 지방간이 발생하게 되는데(Sohn JH & Kim TY 2010), 본 연구에서는 고나트륨 섭취로 인한 비알코올성 지방간의 위험이 나타났다. Milić S 등(2014)의 연구에 따르면 799명의 비만인에서 혈액의 AST 혹은 ALT가 높았으며, 이들은 지방간이 유발되었다. 본 연구에서도 나트륨 투여에 따른 간 손상을 살펴보고자 AST와 ALT 수치를 측정된 결과, AST와 ALT 모두 CON군에 비해 Salt-400 mM군에서 유의적으로 증가하였으며, ALT에 비해 AST가 매우 높은 수치를 보여 고나트륨 투여가 간 손상에 영향을 준 것으로 관찰되었다 ( $p < 0.01$ ). 이는 고나트륨을 섭취할수록 간에 지방이 축적되고, 이에 따른 간세포 손상이 진행될 가능성이 높음을 나타낸다.

## 4. 조직의 비만 관련 유전자 확인

나트륨 투여 농도에 따라 비만이 발생하였는지를 알아보기 위하여 lipogenesis 및 adipogenesis 관련 유전자인 ACC 및 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$  발현 정도를 간 및 체지방(피하지방, 내장지방)에서 측정하였다. 간에서 PPAR $\gamma$  ( $p < 0.001$ )와 C/EBP $\alpha$  ( $p < 0.05$ )의 발현량은 Salt-100 mM군이 유의적으로 가장 높았다(Fig. 2). 하지만 ACC는 통계적 유의성을 보이지 않았다.

Table 2. Organ weights (g) of SD rat

| Organ                   | CON                              | Salt-100 mM                     | Salt-400 mM                     | p-value             |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Total WAT <sup>1)</sup> | 9.209 $\pm$ 0.700 <sup>a2)</sup> | 10.527 $\pm$ 0.592 <sup>a</sup> | 12.570 $\pm$ 0.705 <sup>b</sup> | <0.01 <sup>**</sup> |
| Total WAT/ body weight  | 0.0348 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>  | 0.0403 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup> | 0.0455 $\pm$ 0.005 <sup>b</sup> | <0.01 <sup>**</sup> |
| BAT                     | 2.330 $\pm$ 0.317                | 2.098 $\pm$ 0.280               | 1.888 $\pm$ 0.285               | NS                  |
| Liver                   | 2.848 $\pm$ 0.129                | 2.882 $\pm$ 0.214               | 2.912 $\pm$ 0.180               | NS                  |
| Heart                   | 0.316 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>   | 0.338 $\pm$ 0.177 <sup>ab</sup> | 0.352 $\pm$ 0.028 <sup>b</sup>  | <0.05 <sup>*</sup>  |
| Kidney                  | 0.743 $\pm$ 0.051                | 0.730 $\pm$ 0.069               | 0.763 $\pm$ 0.066               | NS                  |

<sup>1)</sup> Total WAT includes kidney fat, epididymal fat, visceral fat, and subcutaneous fat.

<sup>2)</sup> The data are presented as mean $\pm$ S.D. of 8 independent rats. Means with different letters are significantly different at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

\*  $p < 0.05$ ; significantly different, \*\*  $p < 0.01$ ; significantly different, \*\*\*  $p < 0.001$ ; significantly different.

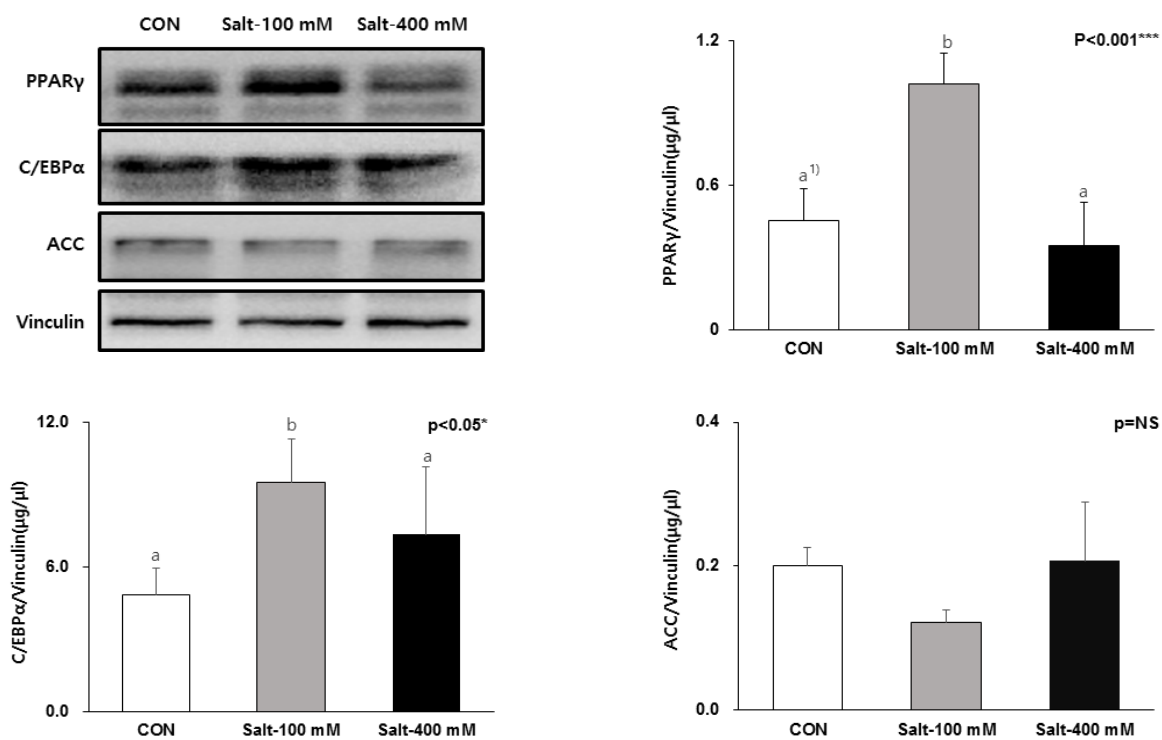
**Table 3. Blood and urine chemistry analysis of SD rat**

|       | Ingredients               | CON                        | Salt-100 mM               | Salt-400 mM               | <i>p</i> -value       |
|-------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Blood | TG (mg/dL)                | 68.85±16.38 <sup>a3)</sup> | 104.04±57.92 <sup>c</sup> | 86.30±43.81 <sup>b</sup>  | <0.001 <sup>***</sup> |
|       | TC (mg/dL)                | 76.71±27.41 <sup>a</sup>   | 88.84±38.03 <sup>b</sup>  | 78.47±20.66 <sup>a</sup>  | <0.05 <sup>*</sup>    |
|       | AST (IU/mL) <sup>1)</sup> | 51.95± 8.65 <sup>a</sup>   | 51.33±18.90 <sup>a</sup>  | 65.89±20.58 <sup>b</sup>  | <0.01 <sup>**</sup>   |
|       | ALT (IU/mL) <sup>2)</sup> | 6.43± 4.70 <sup>a</sup>    | 5.15± 4.43 <sup>a</sup>   | 10.04± 4.94 <sup>b</sup>  | <0.01 <sup>**</sup>   |
|       | AST/ALT ratio             | 9.84± 7.14                 | 7.50± 3.99                | 7.84± 4.23                | NS                    |
|       | Glucose (mg/dL)           | 96.94± 8.17 <sup>a</sup>   | 102.50± 7.43 <sup>a</sup> | 125.44± 5.19 <sup>b</sup> | <0.05 <sup>*</sup>    |
| Liver | COX-2 (mg/μL)             | 0.04± 0.14 <sup>a</sup>    | 0.18± 0.12 <sup>b</sup>   | 0.14± 0.11 <sup>b</sup>   | <0.001 <sup>***</sup> |
|       | TG (mg/dL)                | 71.58±17.17 <sup>a</sup>   | 87.79±23.50 <sup>b</sup>  | 100.70±27.26 <sup>c</sup> | <0.001 <sup>***</sup> |
| Urine | TC (mg/dL)                | 22.04±16.64                | 23.24±16.13               | 27.64±16.96               | NS                    |
|       | Creatinine (mg/dL)        | 35.59±14.83 <sup>a</sup>   | 57.13±20.25 <sup>b</sup>  | 50.83± 4.07 <sup>b</sup>  | <0.001 <sup>***</sup> |
|       | Albumin (d/dL)            | 0.53± 0.28 <sup>a</sup>    | 0.55± 0.30 <sup>a</sup>   | 0.87± 0.34 <sup>b</sup>   | <0.001 <sup>***</sup> |

<sup>1)</sup> Normal AST values in rats: 94~116 IU/L.

<sup>2)</sup> Normal ALT values in rats: 27~35 IU/L.

<sup>3)</sup> The data are presented as mean±S.D. of 8 independent rats. Means with different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

**Fig. 2. Effect of salt in adipogenesis and lipogenesis of liver.**

After 3 weeks of treatment, the level of PPARγ and C/EBPα were up-regulated when 100 mM was treated and down-regulated when salt intake was higher. Compared to the control group, ACC decreased in Salt-100 mM and increased in Salt-400 mM. Vinculin was used as a standard for western blot. <sup>1)</sup> The data are presented as mean±SD of 8 independent rats. Means with different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

이는 간에서 lipogenesis가 일어나기보다 지방조직으로부터 유래된 유리지방산을 이용하여 TG를 합성 및 저장한 것으로 보이지만, 본 연구에서는 간의 TG를 제외한 다른 인자의 측정(glycerol kinase(GK) 등)이 미흡하였다(Rodríguez A 등 2015). Koschins T 등(1971)의 연구에 따르면 비만한 쥐에서 측정된 간의 GK가 마른 쥐에 비해 2배 이상 증가했으며, Portois L 등(2012)은 오메가3 지방산 결핍 쥐 모델의 경우 내장지방만이 유발된다고 알려져 있으며, 연구결과 GK의 발현도 증가했다고 발표했다. 따라서 본 연구에서도 간에서 glycerol과 유리지방산을 통해 TG를 합성하는 GK의 발현이 증가했을 것으로 예측할 수 있다.

내장지방의 PPAR $\gamma$ ( $p < 0.05$ ) 발현량은 나트륨 투여 농도에 따라 높아졌으며, CON군 대비 Salt-100 mM군에서 1.8배, Salt-400 mM군에서 약 3배 증가하였다(Fig. 3). C/EBP $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) 발현량 또한 나트륨 투여 농도에 따라 증가하였으며, CON군에 비해 Salt 투여군에서 약 3배 증가하였다. 피하지방의 PPAR $\gamma$  발현량은 나트륨 투여 농도가 증가할수록 유의적으로 증가하여 CON군 대비 Salt-100 mM군에서 1.6배, Salt-400 mM군에서 2.5배 증가하였다( $p < 0.05$ ). 반면 C/EBP $\alpha$  발현량은 나트륨 투여 농도에 따라 증가하여 CON군 대비 Salt-400 mM군에서 약 6배 증가하였으나 통계적 유의성은 없었다. 위와 같은 결과는 고나트륨에 의해 지방조직의 증식 및 분화가 활발하게 이루어졌음을 나타내며, 피하지방에서 C/EBP $\alpha$  발현이 유의적이지 않은 것은 적절한 피하지방의 부위가 다양하고 표준편차가 큰 결과로 보여진다. 아울러 조직 간 상관성 규명은 부작용 및 합병증 규명에도 중요하며, 특히 내장지방에서 증가한 유전자(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ ) 발현이 인슐린 저항성, 지방간, 심혈관 질환 등에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 관련 바이오마커 확인이 필요하다. 따라서 인슐린 저항성의 포도당 운반수송체(glucose transporters; GLUT) 및 insulin receptor substrate1(IRS1)과 심혈관질환의 nuclear factor- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), 비알코올성 지방간의 fatty acid synthase (FAS) 등이 고려되어야 한다.

### 5. BAT 조직의 UCP1 발현

나트륨이 WAT의 갈색화(browning)에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BAT에서 열 발생을 통해 에너지를 소비하는 UCP1 발현량을 측정하였다(Fig. 3). UCP1은 CON군과 Salt-100 mM군에서는 유의한 차이가 없었으나, WAT/weight 비율이 가장 높은 Salt-400 mM군에서 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ ).

본 연구결과와 마찬가지로 UCP1과 비만의 관련성을 연구한 동물실험에서도 6주간 사육한 UCP1-ablated 쥐의 체중이 대조군에 비해 50% 증가하는 경향을 보였으며, 지방 무게도

증가하였다(Feldmann HM 등 2009). 현재까지 나트륨이 WAT의 갈색화에 영향을 미친다는 연구는 부족하나, UCP1과 비만의 상관관계를 볼 때 본 연구에서 나트륨에 의한 UCP1의 발현량이 감소한 것은 쉽게 비만해질 수 있는 환경이 조성된 것으로 보인다(Kim SH & Plutzky J 2016).

### 6. 내장지방의 TNF- $\alpha$ 발현

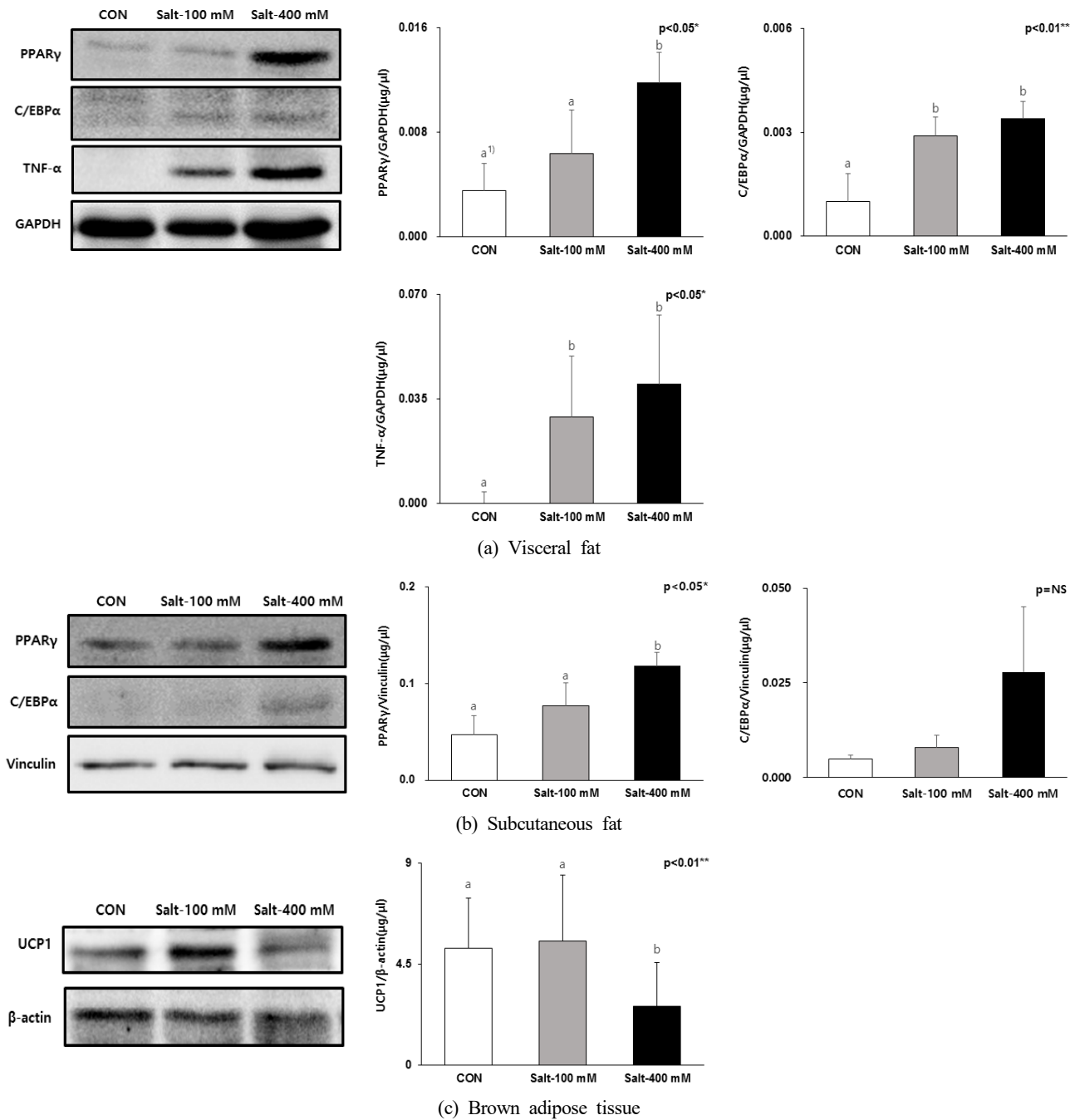
내장지방에서 나트륨 투여 농도에 따른 인슐린 저항성을 확인하기 위하여 TNF- $\alpha$ 의 발현량을 측정하였다(Fig. 3). 내장지방의 TNF- $\alpha$  발현량은 CON군에 비해 Salt 투여군에서 유의적으로 증가하였다. CON군에 비하여 Salt-100 mM군에서 8.6배 높은 발현량을 보였으며, Salt-400 mM군에서 약 12배 높은 발현량을 보였다( $p < 0.05$ ).

최근 연구에서 내장지방의 증가는 인슐린 감수성을 저하는 것으로 나타났으며, 비만에 의한 인슐린 저항성은 제2형 당뇨병을 발생시키는 주요 원인으로 알려져 있다(Lee HJ 등 1999; Choi CS 2009). 이때 TNF- $\alpha$ 가 염증성 지표일 뿐만 아니라, 인슐린 저항성 유발에 기여하는 유전자라는 것이 밝혀지면서, 비만한 쥐의 내장지방에서 TNF- $\alpha$ 의 높은 발현으로 인한 인슐린 저항성이 혈중 인슐린 및 포도당 농도를 증가시킬 수 있다고 보고하였다(Hotamisligil GS 1993; Borst SE 등 2005; Nieto-Vazquez I 등 2008). 따라서 본 연구에서 나트륨 투여 농도와 비례하여 내장지방의 TNF- $\alpha$  발현이 증가한 것은 인슐린 저항성이 유발됐음을 나타낸다.

### 7. 공복 혈당 및 뇨 단백질 손실 결과

공복 혈당 및 신장 손상에 따른 뇨 중 알부민과 크레아티닌을 측정하여 비만으로 인한 인슐린 저항성의 발생을 추정하였다(Table 3). 혈당은 나트륨 투여 농도에 의존적으로 증가하였으며, Salt-400 mM군에서 유의적으로 높은 결과를 보였다( $p < 0.05$ ). 뇨의 알부민 함량은 CON군 및 Salt-100 mM군에 비해 Salt-400 mM군에서 가장 높았다( $p < 0.001$ ). 뇨의 크레아티닌은 CON군에 비해 Salt-100 mM군에서 가장 높은 함량을 보였다( $p < 0.001$ ).

뇨 중 알부민 배설이 증가하는 만성 신장 질환(chronic kidney disease, CKD)에서는 근육과 간의 GLUT이 감소하여 인슐린 저항성이 유발되는 것으로 알려져 왔다(Baracho NCD 등 2016; Dion F 2017). 더불어 포도당 운반수송체의 감소는 포도당 흡수를 저해하여 혈당을 높이는 결과를 보이는데, 신장질환을 통한 CKD-유도 SD 쥐에서 포도당 내성검사를 한 결과, 대조군에 비해 CKD-유도 SD 쥐에서 혈당이 높아진 것을 관찰하였다(Dion F 2017). 본 연구의 결과에서도 공복 혈당을 비롯한 24시간 뇨 알부민과 크레아티닌이 Salt 투여군에서 유의적으로 증가하였으므로, 고나트륨 섭취는 신장



**Fig. 3. Regulative effect of salt in adipogenesis, inflammation, browning of visceral, subcutaneous, and brown fat.**

After 3 week treatment of salt, PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , TNF- $\alpha$  were up-regulated by the salt concentration in visceral fat (a). In subcutaneous fat, the protein level of PPAR $\gamma$  and C/EBP $\alpha$  increased when higher in salt intake (b). UCP1 of brown adipose tissue significantly decreased in salt-400 mM (c). <sup>1)</sup> The data are presented as mean $\pm$ SD of 8 independent rats. Means with different letters are significantly different at  $p<0.05$  by Duncan's multiple range test.

손상과 인슐린 저항성을 초래하며, 이는 공복혈당을 증가시키고 아울러 제2형 당뇨병의 위험을 높이는 것으로 예측할 수 있겠다.

국내외적으로 비만에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나,

여전히 비만 환자가 증가하는 것은 비만의 기전 및 환경 인간 상호작용 등의 규명에 연구가 더 필요하다는 것을 의미한다. 특히 나트륨 함량이 높은 식습관은 에너지 섭취와 무관하게 소아와 성인의 복부비만을 포함한 비만을 직접적으로 유발



하기도 한다(Yoon YS & Oh SW 2013). 본 연구의 결과, 지속적으로 과도한 나트륨 섭취는 간과 지방조직에 지방을 축적하고 열 발생을 감소시켜 비만뿐만 아니라, 지방간, 인슐린 저항성, 당뇨, 신장 질환 등 비만 합병증과 관련한 인자의 발현이 증가할 것으로 생각된다. 특히 한국인의 나트륨 섭취량이 높은 것은 김치, 장류, 젓갈 등의 전통 발효 식품에 기초한 식생활이 발달해왔기 때문이다(Kim YS & Paik HY 1987; Song DY 등 2013). 비록 나트륨과 비만 간의 상관관계에 대한 논란의 여지가 있지만, 우리 식습관을 교정할 수 있는 나트륨 저감화를 위한 노력뿐만 아니라, 고나트륨에 의한 비만 및 장기적인 항비만 기전 규명에 대한 지속적인 연구가 필요하다.

### 요약 및 결론

본 연구는 본 연구실에서 주도한 소아비만 코호트 연구결과를 기반으로 고나트륨 식습관에 따른 비만 발생의 기전을 확인하고자 SD계 수컷 흰쥐에게 3주간 농도별 나트륨(0 mM, 100 mM, 400 mM)을 투여하여 다양한 조직에서 비만 관련 유전자를 확인하였다. 나트륨 섭취가 높을수록 간에서는 지방합성이 증가하고, 지방조직에서는 지방합성 관련 유전자 및 염증 인자의 발현과 인슐린 저항성이 증가한 반면, BAT의 열 발생은 낮아졌고 신장 손상 인자도 증가하였다.

본 연구의 제한점으로는 첫째, 짧은 실험 기간(3주)으로 장기적인 고나트륨 섭취에 따른 비만 관련 유전자를 확인할 수 없었다. 둘째, 피하지방에서 비만 관련 유전자 발현이 나트륨 농도에 따라 증가하였으나, 적출한 부위가 다양하여 표준편차가 증가함으로써 유의성을 보이지 못하였다. 셋째, 나트륨 농도를 100 mM(저나트륨) 및 400 mM(고나트륨)을 설정하였으나 다양한 조직의 부작용을 확인할 수 있는 농도설정 및 합병증을 확인하는 인자 등이 충분하지 못하였다.

위와 같은 제한점에도 불구하고 혈액의 나트륨 항상성이 깨지는 장기적인 고나트륨 섭취 시, 간과 지방조직에 지방이 축적되고, 열 발생을 감소시켜 비만의 위험도를 높임을 예측할 수 있다. 따라서 본 연구는 비만뿐만 아니라, 지방간, 제2형 당뇨병, 신장 질환 등 비만 합병증을 예방하기 위한 나트륨 저감화 식사지침의 기초자료가 될 것이다. 향후 고나트륨 섭취에 따른 합병증을 고려하여 나트륨 민감성 동물모델을 설정하고, 장·단기 간 다양한 농도의 나트륨 섭취에 따른 비만 발생기전 및 비만 합병증 이환 기전 등을 규명하는 후속 연구가 필요하다.

### 감사의 글

이 논문은 2017년도 성신여자대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었습니다.

### REFERENCES

- Baracho NCD, Kangussu LM, Prestes TRR, da Silveira KD, Pereira RM, Rocha NP, Silva ACSE (2016) Characterization of an experimental model of progressive renal disease in rats. *Acta Cir Bras* 31(11): 744-752.
- Borst SE, Conover CF (2005) High-fat diet induces increased tissue expression of TNF- $\alpha$ . *Life Sci* 77(17): 2156-2165.
- 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.
- Cha BS, Park SE (2006) Insulin resistance and PPAR $\gamma$ . *J Korean Diabetes* 30(5): 317-323.
- Cheon SY, Wang HW, Lee HJ, Hwang KM, Yoon HS, Kang YJ (2017) Relationship of sodium consumption with obesity in Korean adults based on Korea National Health and Nutrition Examination Survey 2010~2014. *J Nutr Health* 50(1): 64-73.
- Choi CS (2009) Pathogenesis of insulin resistance. *Korean J Med* 77(2): 171-177.
- Cocores JA, Gold MS (2009) The salted food addiction hypothesis may explain overeating and the obesity epidemic. *Med Hypotheses* 73(6): 892-899.
- Dion F, Dumayne C, Henley N, Beauchemin S, Arias EB, Leblond FA, Lesage S, Lefrancois S, Cartee GD, Pichette V (2017) Mechanism of insulin resistance in a rat model of kidney disease and the risk of developing type 2 diabetes. *PloS One* 12(5): 1-17.
- Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N (2014) Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 105(2): 141-150.
- Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2009) UCP1 Ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell Metab* 9(2): 203-209.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Fonseca-Alaniz MH, Brito LC, Borges-Silva CN, Takada J, Andreotti S, Lima FB (2007) High dietary sodium intake increases white adipose tissue mass and plasma leptin in rats. *Obesity* 15(9): 2200-2208.

- Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Andreotti S, De Campos TBF, Campana AB, Borges-Silva CN, Lima FB (2008) High sodium intake enhances insulin-stimulated glucose uptake in rat epididymal adipose tissue. *Obesity* 16(6): 1186-1192.
- Grimes CA, Riddell LJ, Campbell KJ, Nowson CA (2013) Dietary salt intake, sugar-sweetened beverage consumption, and obesity risk. *Pediatrics* 131(1): 14-21.
- He FJ, Marrero NM, MacGregor GA (2008) Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: A link to obesity? *Hypertension* 51(3): 629-634.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM (1993) Adipose expression of tumor necrosis factor- $\alpha$ : Direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259(5091): 87-91.
- Jung JH, Lee MS (2017) Effects of interaction between SLC12A3 polymorphism, salt-sensitive gene, and sodium intake on risk of child obesity. *J Nutr Health* 50(1): 32-40.
- Kim DJ, Kwon CK, Choi DJ, Ka KH, Kim TM, Kim BT, Lee BK, Hwang JH, Ann ES, Kim DY (2009) Effects of nutritional education and exercise intervention on improvement of diet intakes and metabolic risk factors in obese middle aged women. *J Nutr Sci* 13(3): 179-184.
- Kim JH, Lim GE, Kang SY, Lee KY, Park TJ, Kim JS (2015) The relationship between daily sodium intake and obesity in Korean adults. *Korean J Health Promot* 15(4): 175-184.
- Kim SH, Plutzky J (2016) Brown fat and browning for the treatment of obesity and related metabolic disorders. *Diabetes Metab J* 40(1): 12-21.
- Kim YS, Paik HY (1987) Measurement of Na intake Korean adult females. *Korean J Nutr* 20(5): 341-349.
- Koschins T, Gries FA, Herberg L (1971) Regulation of glycerol kinase by insulin isolated fat cells and liver of bar harbor obese mice. *Diabetologia* 7(5): 316-322.
- Lee HJ, Shin GJ, Park SH, Cho HK (1999) Insulin resistance and visceral fat obesity in hyperlipidemia. *Korean Circ J* 29(7): 673-679.
- 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.
- Lee MS, Kwon DY, Park JA (2017) The impacts of the interaction of genetic variation, CYP11 $\beta$ 2 and NEDD4L, with sodium intake on pediatric obesity with gender difference: A 3-year panel study. *Int J Obes* 41(4): 542-550.
- Li M, Ye T, Wang XX, Li X, Qiang O, Yu T, Tang CW, Liu R (2016) Effect of octreotide on hepatic steatosis in diet-induced obesity in rats. *PLoS One* 11(3): e152085.
- Milić S, Lulić D, Štimac D (2014) Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: Biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol* 20(28): 9330-9337.
- Na YK, Hong HS, Suk HJ (2014) Blood biochemical parameters, physical activity, stress and sleep management by body mass index. *J Korean Biol Nurs Sci* 16(2): 133-140.
- Nieto-Vazquez I, Fernández-Veledo S, Krämer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M (2008) Insulin resistance associated to obesity: The link TNF- $\alpha$ . *Arch Physiol Biochem* 114(3): 183-194.
- Organization for Economic Co-operation and Development (2017) Obesity Update 2017. <https://www.oecd.org>. (accessed 18. 5. 2017).
- Park MJ (2005) Recent advances in regulating energy homeostasis and obesity. *Korean J Pediatr* 48(2): 126-137.
- Portois L, Zhang Y, Ladrière L, Perret J, Louchami K, Gaspard N, Hupkens E, Bolaky N, Delforge V, Beauwens R, Malaisse WJ, Sener A, Carpentier YA, Delporte C (2012) Perturbation of glycerol metabolism in hepatocytes from n3-PUFA depleted rats. *Int J Mol Med* 29(6): 1121-1126.
- Rodríguez A, Marinelli RA, Tesse A, Frühbeck G, Calamita G (2015) Sexual dimorphism of adipose and hepatic aquaglyceroporins in health and metabolic disorders. *Front Endocrinol* 6(171): 1-7.
- Sohn JH, Kim TY (2010) Recent update on pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Med* 79(5): 461-474.
- Song DY, Park JE, Shim JE, Lee JE (2013) Trends in the major dish groups and food groups contributing to sodium intake in the Korea National Health and Nutrition Examination Survey 1998~2010. *Korean J Nutr* 46(1): 72-85.
- Vázquez-Vela MEF, Torres N, Tovar AR (2008) White adipose tissue as endocrine organ and its role in obesity. *Arch Med Res* 39(8): 715-728.
- World Health Organization (2018) Fact sheet on obesity and overweight. <http://www.who.int>. (accessed 16. 2. 2018).
- Yon MY, Lee YN, Kim DH, Lee JY, Koh EM, Nam EJ, Shin HH, Kang BW, Kim JW, Heo S, Cho HY, Kim CI (2011) Major sources of sodium intake of the Korean population

at prepared dish level - Based on the KNHANES 2008 & 2009 -. Korean J Community Nutr 16(4): 473-487.  
Yoon YS, Oh SW (2013) Sodium density and obesity; The Korea National Health and Nutrition Examination Survey

2007~2010. Eur J Clin Nutr 67(2): 141-146.

---

|               |               |
|---------------|---------------|
| Date Received | Sep. 11, 2018 |
| Date Revised  | Oct. 15, 2018 |
| Date Accepted | Oct. 18, 2018 |