



## Effects of calcium and magnesium-balanced deep sea water on antioxidation in kidney cells

So Min Jo<sup>1</sup> · Jain Nam<sup>1</sup> · Geonhee Park<sup>2</sup> · Byeong Goo Kim<sup>2</sup> · Gwi-Hwa Jeong<sup>2</sup>  
· Byung Serk Hurh<sup>2</sup> · Ji Yeon Kim<sup>1</sup>

### 칼슘과 마그네슘이 조절된 해양심층수가 신장세포에서 항산화에 미치는 영향

조소민<sup>1</sup> · 남자인<sup>1</sup> · 박건희<sup>2</sup> · 김병구<sup>2</sup> · 정귀화<sup>2</sup> · 허병석<sup>2</sup> · 김지연<sup>1</sup>

Received: 4 May 2021 / Accepted: 31 May 2021 / Published Online: 30 June 2021  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

**Abstract** In this study, the antioxidant effects of mineral-containing deep sea water (DSW) on kidney function was confirmed using a cell model. DSW samples were prepared with different mineral concentrations including calcium and magnesium—the main minerals found in DSW—to derive the following sample groups: trace minerals (TM), high magnesium (HM), high magnesium, low salt (HMLS) and high magnesium, high calcium (HMHC). The purpose of this preparation was to determine the optimal calcium/magnesium ratio in DSW. Human embryonic kidney (HEK293) cells were exposed to sodium chloride (NaCl) for 2 h to induce release of reactive oxygen species (ROS). Thereafter, the cells were treated with the respective DSW samples before ROS concentrations, as well as antioxidant enzyme activity and protein levels, were measured. Among the water samples, HMLS showed the most protective effect against ROS, whereas the intracellular glutathione content was highest in cells from the HMLS- and HMHC-treated groups. However, TM-

and HMHC-treated cells showed similar tendencies to the control group, in terms of mRNA expression of antioxidant genes. These results suggested that DSW may aid in preventing renal oxidative stress caused by excessive sodium intake. Furthermore, it was determined that HMLS and HMHC water samples displayed good antioxidant effects in the kidney cell model, based on the combined results of ROS concentration and antioxidant marker measurements.

**Keywords** Antioxidation · Calcium · Deep sea water · Human embryonic kidney cells · Magnesium · Reactive oxygen species

## 서론

전 세계적으로 현대인의 식단에서 소금 섭취량이 증가했다. 이에 대한 많은 우려와 함께 소금 섭취의 증가가 건강에 미치는 악영향에 대한 연구가 꾸준히 진행되어왔다. 이전 연구에서 고염식은 고혈압, 심혈관 질환 및 만성 신장 질환을 유발하는 것으로 알려졌다[1,2]. 또한, 고염식은 신장에서 산화 스트레스를 유발하고[3], 고농도의 NaCl은 신장 세포에서 활성 산소종 (ROS)을 생성한다[4].

해양심층수(DSW)는 플랑크톤의 광합성이 적고 유기 분해가 많아[5], 마그네슘 (Mg), 칼슘 (Ca), 셀레늄 (Se), 칼륨 (K)과 같은 다양한 미네랄의 원천이다. 미네랄은 효소 보조 인자로 참여하여 적절한 세포 및 조직 기능에 기여하고 면역 체계를 개선함으로써 동물 대사에 필수적인 역할을 한다[6]. 다양한 미네랄을 기반으로 한 상업용 분유의 사용과 같은 일부 연구에서는 동물 건강에 있어 미네랄이 중요하다는 것이 입증되었다[7]. 해

Ji Yeon Kim (✉)  
E-mail: jiyeonk@seoultech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology; 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Republic of Korea

<sup>2</sup>Sempio Fermentation Research Center, 183, Osongsaengmyeong 4-ro, Osong-eup, Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28156, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

양심층수는 콜레스테롤 수치 개선, 심혈관 문제 및 비만 예방, 당뇨병 치료 등 건강에 큰 이점이 있다고 보고되었으며[5], 산화 스트레스를 줄이는데도 효과가 있다고 알려졌다[8].

칼슘과 마그네슘의 최적의 섭취 비율과 건강에 미치는 영향에 대한 연구도 꾸준히 진행되어왔다. 한 연구는 칼슘 대 마그네슘 섭취 비율이 제2형 당뇨병, 대사 증후군, 기타 염증 질환 등에 미치는 영향을 조사했다[9]. 다른 연구에서는 칼슘과 마그네슘을 1.70~2.63의 비율로 섭취하는 것이 결장암의 위험을 줄여준다고 보고했다[10]. Hyun 등[11]은 3T3-L1 지방세포와 고지방식을 먹인 마우스에서 미네랄이 풍부한 제주 용암해수의 칼슘과 마그네슘 비율에 따른 지질 축적 감소에 대해 보고했다. 그 밖에도 관련된 많은 연구가 있지만, 최적의 섭취 비율에 대한 의견도 상이하며 신장의 항산화능에 대해 해양심층수를 이용한 미네랄의 비율을 조사한 연구는 많지 않다.

본 연구에서는 HEK293 세포를 이용하여 미네랄이 균형을 이루는 해양심층수가 신장에서 고 나트륨으로 인한 산화 스트레스에 미치는 영향을 확인하였다. 미네랄을 함유한 물에서 미네랄의 최적 비율을 찾기 위해 DSW를 탈염하고 다른 이온을 추가했다. HEK293 세포 모델을 사용하여 다양한 항산화 실험을 수행하고 미네랄 함유 물이 신장에서 항산화에 미치는 영향을 평가했다.

## 재료 및 방법

### 미네랄 균형을 갖춘 해양심층수 제조

동해 510 m 깊이에서 채취한 해양심층수를 가공한 샘플은 청주에 소재한 샘플 발효 연구 센터에서 제공받았다(Table 1). 해양심층수의 경우 높은 나트륨 함량을 가지고 있어, 탈염 과정을 가졌고 해양심층수의 특성상 다른 이온보다 높은 마그네슘 함량을 가지고 있었다. 특히, 마그네슘과 칼슘의 함량 비율이 1:3.4로 이에 주목하여, 칼슘과 마그네슘 함량은 적지만 비율은 같으면서 아연이나 셀레늄과 같은 미량 미네랄을 가지고 있는 trace mineral (TM), 높은 마그네슘 함량을 가지고 있으나 칼슘의 함량이 현저히 적은 high magnesium (HM), 마그네슘과 칼슘의 비율이 해양심층수와 비슷하면서 다른 샘플보다 음용하기에 적합한 함량을 가진 high magnesium low sodium (HMLS), 칼슘과 마그네슘의 함량이 거의 1:1인 high magnesium high calcium (HMHC)로 크게 네 가지로 제조되었다.

**Table 1** Mineral content of water samples

Sample	Mineral Contents (ppm)				Na/Mg	Mg/Ca
	Na	Mg	K	Ca		
DSW	10700	1380	480	390	7.75	3.5
TM	29.5	6.7	1.7	2.4	4.4	2.8
HM	39.9	248	45.2	0.78	0.16	318
HMLS	36	179	1.7	41.5	0.2	4.3
HMHC	133	211	48	200	0.63	1.1

DSW (Deep sea water), TM (Trace minerals), HM (High magnesium), HMLS (High magnesium, low sodium), HMHC (High magnesium, high calcium). The ionic content of each sample prepared by dialysis of deep sea water, is shown in the table

### 세포 배양

HEK293 세포는 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. HEK293 세포는 Ad5 DNA 단편을 유산된 태아의 신장에서 추출한 세포로 형질 감염시켜 형질 전환된 세포주이다. 10% fetal bovine serum (Biowest, Nuaille, Cholet, France), 1% nonessential amino acid (MEM-NEAA) (Gibco, Rockville, MD, USA)와 100 U/mL penicillin-100 µg/mL streptomycin (Gibco)이 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco)배지를 사용하였다. 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>의 인큐베이터에서 배양하였다.

### Reactive oxygen species 측정

ROS는 DCF-DA법을 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 있는 배지를 다 제거해 준 후 DPBS로 세척하였다. 모든 well에 배지를 180 µL씩 분주하고, CON군에는 배지를, NaCl군에는 NaCl이 들어있는 배지를, 샘플군에는 샘플이 들어있는 배지를 20 µL씩 넣은 후 2시간 동안 배양하였다. 상층액을 모두 제거하고 빛을 차단한 후 DCF-DA 용액을 넣고 1시간 배양한다. 상층액 제거 후 DPBS를 분주한 후 fluorescence spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 485 nm에서 형광을 측정하였다.

### Glutathione assay

Potassium phosphate buffer 0.1 M를 pH 7.5에 맞춰 준비하였다. Potassium phosphate buffer를 기반으로 Glutathione (GSH) standard (Sigma, St.Louis, Missouri, USA, cat. no. G-4251), DNTB용액, Glutathione reductase (GR) (Sigma, cat. no. G-3664), β-NADPH (Sigma, cat. no. N-7505) 용액을 준비하였다. HEK293 세포가 seeding 되어있는 96 well-plate에 DTNB 용액과 GR 용액을 1:1로 잘 섞어 각 well에 120 µL씩 분주하였다. 30초 후, 빛을 차단하고 β-NADPH을 60 µL씩 분주한 후 microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Superoxide dismutase

Superoxide Dismutase Activity은 제조사의 프로토콜에 따라 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(Biovision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정되었다. 세포를 PBS로 세척한 다음 PBS에서 균질화하여 상층액을 수집하고 SOD activity 수준을 측정

하였다. 시료를 적절하게 희석한 후 각 well에 standards와 상청액을 분주한 후 WST 용액과 enzyme 용액을 분주한다. 37 °C에서 20분동안 방치 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Catalase activity**

250 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Daejung, Siheung-si, Gyeonggi-do, Korea, cat. no. 6613-4405), 0.27% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Duksan, Ansan-si, Gyeonggi-do, Korea, cat. no. 1145), methanol (Duksan, cat. no. 58) 을 샘플 혹은 STD와 혼합하여 20분 방치하였다. 7.8 M KOH (Daejung, cat. no. 6597-4400)로 반응을 종결한 후, 34.2 mM purpald 용액을 가하여 10분간 배양하였다. 65.2 mM potassium periodate (Samchun, Seoul, Korea, cat. no. P3453)을 추가하고 실온에서 10분 방치하였다. 흡광도는 550 nm에서 측정되었다.

**RT-qPCR**

Trizol (Life Technologies, Rockville, MD, USA)을 사용하여 배양된 세포에서 RNA를 분리하였다. cDNA는 transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Life Technologies)를 사용하여 역전사 방법을 통해 합성되었으며 Step-One-Plus RT-PCR system 에서 Universal Probe Library probe method을 사용하여 RT-qPCR에 사용되었다. 상대적인 mRNA 수준은 comparative 2-ΔΔCT method을 사용하여 계산하고 β-actin으로 정규화하였다. 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다: Keap1 forward 5'-accacaacagtgtggagaggt-3' and reverse 5'-cgatcctctgtgcagcat-3'; Heme oxygenase 1 forward 5'-ggcagagggtgatagaagagg-3' and reverse 5'-agctcctgcaactcctcaaa-3'; GST-a forward 5'-ggtgacagcgtttaacaaagc-3' and reverse 5'-ccgtgcatgaagtgtgga-3'; GSR forward 5'-atgatcagcaccactgcac-3' and reverse 5'-cgacaagctttttaacctctt-3'; b-actin forward 5'-aagtccttgcctcctcaaaa-3' and reverse 5'-atgctatcacctcccctgtg-3'.

**통계처리**

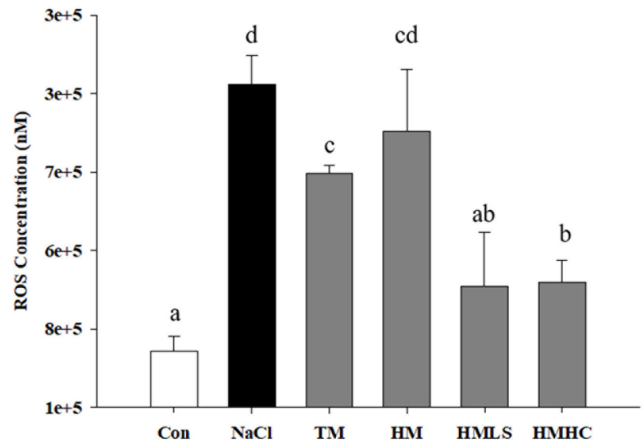
모든 측정값의 통계 분석은 SPSS program (20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 수행되었다. 모든 데이터는 평균±표준 오차 (SE)로 표시하였다. 통계 분석은 Duncan's multiple range test one-way ANOVA를 수행하였으며, p < 0.05에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

**결과 및 고찰**

**Reactive Oxygen Species 농도 측정**

고농도의 NaCl 처리가 HEK293 세포에서 활성 산소 종을 증가시킨다는 것은 다른 연구들에서 확인되었다[12,13]. NaCl이 ROS를 생성하는 다양한 메커니즘이 알려져 있다. NaCl은 미토콘드리아의 대사과정에서 NADPH oxidase를 활성화시켜 ROS 생성을 자극한다[14]. 특히, 신장에서는 고농도의 NaCl에 의한 Renin-Angiotensin-Aldosterone system 자극에 의해 활성화된 알도스테론이 NADPH oxidase 활성의 증가와 미토콘드리아에 의한 ROS 생성을 촉진시킨다고 알려져 있다[15,16].

HEK293 세포에 2시간 동안 NaCl을 처리하여 활성 산소 종의 수준을 증가시킨 후, 서로 다른 미네랄 함량을 가진 해양심



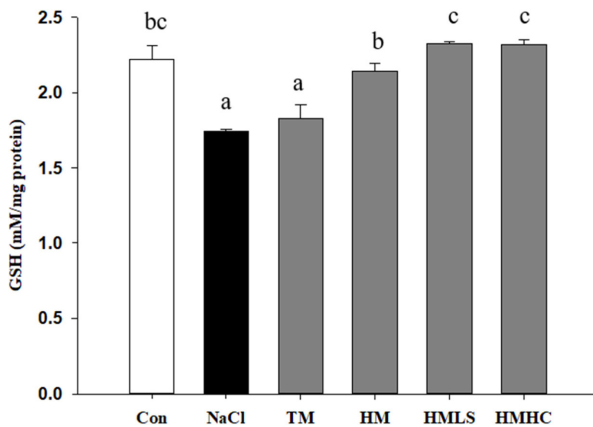
**Fig. 1** Effect of deep sea water on reactive oxygen species concentrations. Reactive oxygen species (ROS) concentration was higher in the NaCl group, but significantly lower in the TM, HM, HMLS, and HMHC groups, than in the CON group. The HMLS group had the lowest ROS concentration

층수가 ROS 농도에 미치는 영향을 측정한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. ROS 농도는 NaCl로 처리하지 않은 세포에서 가장 낮은 값(143522±38387.29 nM)을 보였고 NaCl로만 처리된 세포에서 가장 높은 값(823583.7±73937.35 nM)을 나타냈다. 미네랄 워터는 NaCl 그룹에 비해 샘플로 처리 된 모든 그룹에서 ROS를 유의적으로 억제하였다(TM: 597437.3±19209.56 nM, HM: 704916±156378.1 nM, HMLS: 309312.7±137549.5 nM, HMHC: 319988±55951.55 nM). Bian 등[17]의 연구는 항산화 활성을 가진 ferulic acid를 처리한 HEK293 세포에서 ROS의 축적을 억제하였다고 밝혔다. 따라서 ROS를 감소시킨 미네랄워터 샘플도 항산화 활성을 보임을 확인할 수 있다. ROS를 줄이는 데 가장 효과적이었던 샘플은 HMLS였고, 그 다음은 HMHC, TM, HM 순서로 효과적임을 확인할 수 있다.

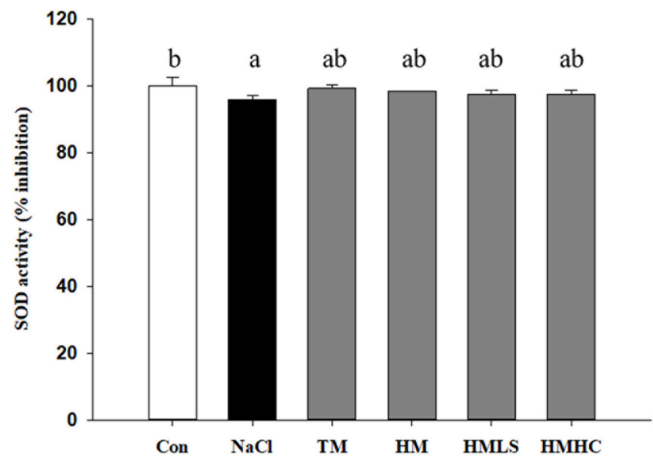
**Glutathione 측정**

미네랄 워터를 처리한 HEK293세포의 GSH 농도에 미치는 영향을 확인하였다. HEK293 세포에 NaCl만 처리한 경우, GSH는 CON 군보다 감소했으며 (NaCl: 1.65±0.012 mM/mg protein, CON: 2.10±0.08 mM/mg protein), HEK293 세포를 샘플로 처리 한 경우 GSH가 증가했다(Fig. 2). GSH는 TM 군에서는 NaCl 군과 유의한 차이가 없었지만, HM, HMLS 및 HMHC 군에서 유의하게 증가했다(HM: 2.02±0.05 mM/mg protein, HMLS: 2.20±0.01 mM/mg protein, HMHC: 2.19±0.03 mM/mg protein). HMLS 군과 HMHC 군에서 GSH는 CON 군보다도 높았다. 따라서 HMLS와 HMHC가 NaCl처리로 감소했던 GSH 수준을 다시 끌어올리는 데에 효과적인 것으로 확인되었다.

GSH 대사는 산화 스트레스로부터 보호하고 ROS에 대한 방어 역할을 제공하는 메커니즘이며 마찬가지로 antioxidant response elements (ARE)에 의해 달성된다[18,19]. GSH는 glutathione peroxidase에 의해 과산화물을 분해하고 산화된 GSH 형태 (GSSG)로 변한다[18,20]. Glutathione reductase (GSR)는 GSSG를 GSH로 재활용한다 Meister의 연구[20]와 Djukic 등의 연구



**Fig. 2** Effect of deep sea water on glutathione concentrations. No significant difference in glutathione (GSH) levels was observed between the TM and NaCl groups, whereas GSH was significantly increased in the HM, HMLS, and HMHC groups. In particular, the HMLS and HMHC groups had higher GSH content than the CON group



**Fig. 3** Analysis of the effect of deep sea water on superoxide dismutase activity. No significant difference was observed in superoxide dismutase (SOD) activity between the different sample groups. However, SOD activity was lower in the NaCl group; significant difference was observed in comparing SOD activity levels of the CON and NaCl groups

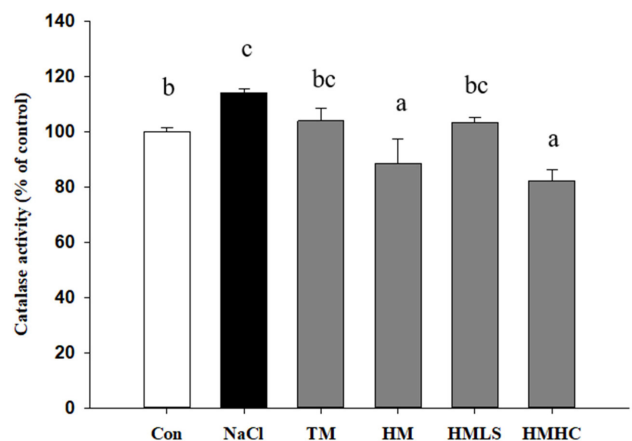
[21]에 따르면 마그네슘 보충은 GSH 활성화에 긍정적인 영향을 미친다. 또한 GSH 합성은 마그네슘에 의존하기 때문에 GSH 대사는 마그네슘에 의해 영향을 받을 수 있다[22].

### Superoxide Dismutase Activity 측정

고농도의 NaCl은 SOD 발현을 감소시킴으로써 신장 내 산화 스트레스를 유발한다고 알려졌다[3]. 미네랄 워터가 SOD activity에 미치는 영향을 측정하여 Fig. 3에 나타내었다. SOD activity는 CON 군에서 가장 높은 값을 보였고 NaCl군에서 유의적으로 감소하였다(CON:  $100 \pm 2.40\%$ , NaCl:  $95.76 \pm 1.20\%$ ). SOD 활성은 NaCl 군에 비해 미네랄 워터로 처리했을 때 증가했으며 각 샘플간에는 유의한 차이가 없었다(TM:  $99.15 \pm 1.20\%$ , HM:  $98.31 \pm 0.00$ , HMLS:  $97.46 \pm 1.29\%$ , HMHC:  $97.46 \pm 1.29\%$ ). Superoxide dismutase (SOD)는 superoxide radical을 산소 분자( $O_2$ )와 과산화수소( $H_2O_2$ )로 분해된다[23]. 이전 연구에 따르면 마그네슘 보충은 SOD activity를 개선한다는 것이 밝혀졌다[21]. 각 샘플에 있는 마그네슘이 SOD activity를 증가시켰다고 판단할 수 있다.

### Catalase Activity 측정

SOD로 분해된  $H_2O_2$ 는 catalase (CAT)에 의해 물과 산소로 분해된다[19]. Fig. 4는 CAT activity에 대한 미네랄 워터의 영향을 측정한 결과이다. CAT activity는 CON군에 비해 NaCl군에서 증가했다(CON:  $100 \pm 1.30\%$ , NaCl:  $114.06 \pm 1.55\%$ ). 모든 샘플처리군에서 CAT activity는 NaCl군에 비해 감소하였으며, 특히 HM ( $88.54 \pm 8.81\%$ )군과 HMHC ( $82.27 \pm 3.84\%$ )군의 CAT activity는 CON군에 비해서도 유의하게 낮았다. 다른 연구에서 항산화제인 ascorbic acid 처리가 높은 나트륨으로 인한 산화 스트레스를 감소시켰고, CAT activity 또한 감소시켰다고 보고하였다[24]. 마그네슘은 특히 라디칼을 직접 제거하는 방식으로 다양한 메커니즘을 통해 산화 스트레스를 줄이는 역할을 할 수 있음이 밝혀졌다[25,26]. 이와 같이, 해양심층수의 미네랄은 항산화제 그 자체로 작용할 수 있는 것으로 보인다. 우리 연구에



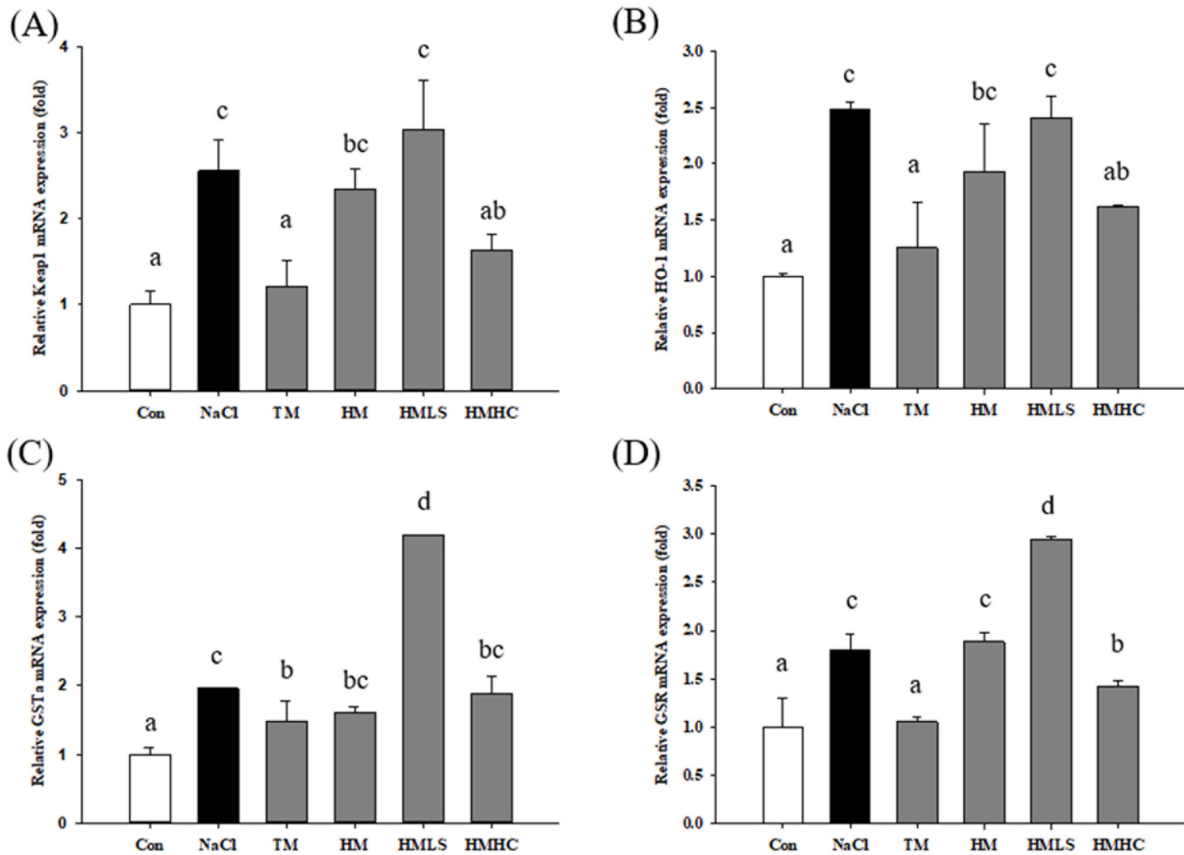
**Fig. 4** Analysis of the effect of deep sea water on catalase activity. Catalase (CAT) activity was highest in the NaCl group and conversely lower in the HM and HMHC groups, than in the CON group. The protective effect of magnesium against oxidative stress gave rise to the apparently reduced CAT activity in HM and HMHC groups, compared to the other groups

서 미네랄이 함유된 해양심층수도 항산화 작용을 하여 고 나트륨으로 인해 증가했던 CAT activity를 감소시키는 것으로 확인된다.

### RT-qPCR을 통한 항산화 유전자의 mRNA 발현 확인

Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 산화 스트레스 하에서 항산화 유전자를 자극하는 조절제이다[27]. Nrf2는 억제 분자 역할을 하는 Kelch-like ECH-associated protein (Keap1)과 결합하여 세포질에서 비활성 상태를 유지한다. 산화 스트레스는 Keap1-Nrf2 복합체의 파괴를 유발하고 Nrf2가 핵으로 전위되도록 한다[28,29]. Nrf2는 ARE에 결합하여 heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase, catalase 등의 항





**Fig. 5** Analysis of the effect of deep sea water on antioxidant gene mRNA expression. (A) Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), (B) Heme oxygenase-1, (C) Glutathione S-transferase-a, (D) Glutathione-disulfide reductase. Similar tendencies were observed in mRNA expression of all antioxidant genes, between the TM and CON groups

산화효소와 관련된 유전자를 활성화한다[27].

RT-qPCR을 이용하여 NRF2 pathway에 있는 항산화 유전자의 mRNA 발현을 측정하였다(Fig. 5). 모든 마커에서 NaCl 그룹은 NaCl로 처리되지 않은 CON 그룹보다 더 큰 항산화 mRNA 발현을 보였다. TM군에서 Keap1 mRNA 발현은 NaCl 군에 비해 유의적으로 감소했으며 CON 군과 유사한 경향을 보였다. HMHC 군에서 mRNA 발현도 NaCl군에 비해 유의적으로 감소했다. 그러나 NaCl 군과 비교하여 HMLS 군에서 Keap1 mRNA 발현은 유의한 차이가 없었다(Fig. 5A).

HO-1의 mRNA 발현은 CON 군과 유사한 경향으로 NaCl 군에 비해 TM 군에서 낮게 발현되었다. HMHC 군 또한 NaCl 군에 비해 HO-1 mRNA가 낮게 발현되었다. HMLS 그룹에서 HO-1 mRNA 발현은 NaCl 그룹과 유의한 차이가 없었다(Fig. 5B).

GST-a mRNA의 발현은 NaCl 그룹에 비해 TM, HM 및 HMHC 그룹에서 하향 조절되었다. 그러나 GST-a mRNA 발현은 HMLS 군에서 매우 증가했다(Fig. 5C). GSR mRNA의 발현은 NaCl 군에 비해 TM 군과 HMHC 군에서 유의하게 하향 조절되었으나 HMLS 군에서는 크게 증가했다(Fig. 5D).

전체적으로, 항산화 유전자의 mRNA 발현은 TM 군에서 CON 군과 가장 비슷한 경향으로 나타났고, 그 다음은 HMHC 군이 CON 군과 비슷한 경향을 보였음을 확인할 수 있다. 많은 양의 독성 반응물질은 분자시스템을 손상시켜 항산화 효소의 발

현을 감소시키지만, 적당한 양의 독성 반응물질은 항산화효소의 활성화와 발현을 증가시켜 산화스트레스로부터 세포를 보호하고자 한다[30]. 우리의 연구에서, 항산화 유전자의 mRNA 발현이 NaCl 군에서 증가한 것은 산화스트레스에 의한 반응인 것으로 판단된다. 미네랄워터가 ROS를 제거하고 산화스트레스를 억제했기 때문에 상대적으로 mRNA 발현은 줄어든 것으로 보인다. GST-a 및 GSR의 mRNA 발현이 NaCl 군보다 HMLS 군에서 높은 증가를 보이는 예상치 못한 결과에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

## 초 록

본 연구에서는 미네랄이 함유된 해양심층수(DSW)가 신장 기능에 미치는 항산화 효과를 세포 모델을 사용하여 확인하였다. DSW 샘플은 최적의 칼슘/마그네슘 비율을 결정하기 위한 목적으로, 각기 다른 칼슘 및 마그네슘 비율을 가진 4가지 샘플-미량 미네랄(TM), 고 마그네슘(HM), 고 마그네슘 저염(HMLS) 및 고 마그네슘 고 칼슘(HMHC)로 준비되었다. 신장 세포주 HEK293를 2시간 동안 NaCl로 처리하여 ROS를 유도한 후, 마그네슘과 칼슘 등의 미네랄이 서로 다른 비율로 용해된 물로 처리하여 ROS 농도와 항산화 효소 활성화 및 단백질질을 측정하였

다. 물 샘플 중 HMLS는 ROS에 대한 세포에 가장 많은 보호 효과를 나타냈다. 세포 내 글루타티온 함량은 HMLS 그룹과 HMHC 그룹에서 가장 높았다. 반면, TM과 HMHC는 항산화 유전자의 mRNA 발현에서 대조군과 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과는 DSW가 과도한 나트륨 섭취로 인한 신장의 산화 스트레스를 예방하는 데 도움이 될 수 있음을 시사한다. 또한 ROS 농도와 항산화 마커 측정 결과를 종합하여 볼 때 HMLS와 HMHC가 신장 세포 모델에서 우수한 항산화 효과를 가진 DSW 샘플이라고 판단할 수 있다.

**Keywords** 마그네슘 · 신장세포 · 칼슘 · 항산화 · 해양심층수 · 활성산소종

**감사의 글** 이 연구는 한국 정부(MEST)가 지원하는 한국연구재단(NRF) 보조금(No. 2017R1E1A1A01074320)에 의해 지원되었습니다.

## References

- Suckling RJ, Swift PA (2015) The health impacts of dietary sodium and a low-salt diet. *Clin Med* 15: 585–588. doi: 10.7861/clinmedicine.15-6-585
- Cappuccio FP (2007) Salt and cardiovascular disease. *British Medical Journal Publishing Group, BMJ*. 2007 Apr 28; 334(7599): 859–860. doi: 10.1136/bmj.39175.364954.BE
- Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, Welch WJ, Wilcox CS (2003) Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol* 14: 2775–2782. doi: 10.1097/01.asn.0000092145.90389.65
- Zhang Z, Dmitrieva NI, Park J-H, Levine RL, Burg MB (2004) High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. *Proc Natl Acad Sci* 101: 9491–9496. doi: 10.1073/pnas.0402961101
- Nani M, Zura S, Majid F, Jaafar A, Mahdzir A, Musa M (2016) Potential health benefits of deep sea water: a review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016: 6520475. doi: 10.1155/2016/6520475
- McDowell LR, Wilkinson N, Madison R, Felix TL (2007) Vitamins and minerals functioning as antioxidants with supplementation considerations. In: *Florida Ruminant Nutrition Symposium; Best Western Gateway Grand: Gainesville, FL, USA, 2007*. Citeseer, pp 30–31
- Soldá NM, Glombowsky P, Campigotto G, Bottari NB, Schetinger MRC, Morsch VM, Favero JF, Baldissera MD, Schogor ALB, Barreta D, Machado G, Silva AS (2017) Injectable mineral supplementation to transition period dairy cows and its effects on animal health. *Comp Clin Pathol* 26: 335–342. doi: 10.1007/s00580-016-2378-y
- Fan H, Tan Z, Hua Y, Huang X, Gao Y, Wu Y, Liu B, Zhou Y (2016) Deep sea water improves exercise and inhibits oxidative stress in a physical fatigue mouse model. *Biomedical reports* 4: 751–757. doi: 10.3892/br.2016.651
- Rosanoff A, Weaver CM, Rude RK (2012) Suboptimal magnesium status in the United States: are the health consequences underestimated? *Nutr Rev* 70: 153–164. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00465.x
- Dai Q, Shu X-O, Deng X, Xiang Y-B, Li H, Yang G, Shrubsole MJ, Ji B, Cai H, Chow W-H, Gao Y-T, Zheng W (2013) Modifying effect of calcium/magnesium intake ratio and mortality: a population-based cohort study. *BMJ open* 3. doi: 10.1136/bmjopen-2012-002111
- Hyun YJ, Kim JG, Kim MJ, Jung SK, Kim JY (2021) Mineral-rich Jeju lava sea water suppresses lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes and ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6 J mice. *Food Sci Biotechnol* 30: 299–304. doi: 10.1007/s10068-020-00859-8
- Zhou X, Ferraris JD, Burg MB (2006) Mitochondrial reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1169–F1176. doi: 10.1152/ajprenal.00378.2005
- Zhou X, Ferraris JD, Cai Q, Agarwal A, Burg MB (2005) Increased reactive oxygen species contribute to high NaCl-induced activation of the osmoregulatory transcription factor TonEBP/OREBP. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F377–F385. doi: 10.1152/ajprenal.00463.2004
- Fellner RC, Cook AK, O'Connor PM, Zhang S, Pollock DM, Inscho EW (2014) High-salt diet blunts renal autoregulation by a reactive oxygen species-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F33–F40. doi: 10.1152/ajprenal.00040.2014
- Briet M, Schiffrin EL (2010) Aldosterone: effects on the kidney and cardiovascular system. *Nat Rev Nephrol* 6: 261–273. doi: 10.1038/nrneph.2010.30
- Chen S, Meng X-F, Zhang C (2013) Role of NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species in podocyte injury. *BioMed Res. Int.* 2013: 839761. doi: 10.1155/2013/839761
- Bian Y-Y, Guo J, Majeed H, Zhu K-X, Guo X-N, Peng W, Zhou H-M (2015) Ferulic acid renders protection to HEK293 cells against oxidative damage and apoptosis induced by hydrogen peroxide. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 51: 722–729
- Hayes JD, McLellan LI (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31: 273–300. doi: 10.1080/10715769900300851
- Galano A, Alvarez-Idaboy JR (2011) Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *Rsc Advances* 1: 1763–1771
- Meister A (1983) Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472–477. doi: 10.1126/science.6836290
- Djukic-Cosic D, Ninkovic M, Malicevic Z, Matovic V, Soldatovic D (2007) Effect of magnesium pretreatment on reduced glutathione levels in tissues of mice exposed to acute and subacute cadmium intoxication: a time course study. *Magnes Res* 20: 177–186
- Hsu JM, Rubenstein B, Paleker A (1982) Role of magnesium in glutathione metabolism of rat erythrocytes. *J Nutr* 112: 488–496. doi: 10.1093/jn/112.3.488
- Hao M, Liu R (2019) Molecular mechanism of CAT and SOD activity change under MPA-CdTe quantum dots induced oxidative stress in the mouse primary hepatocytes. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 220: 117104. doi: 10.1016/j.saa.2019.05.009
- Behairy RT, El-Danassoury M, Craker L (2012) Impact of ascorbic acid on seed germination, seedling growth, and enzyme activity of salt-stressed fenugreek. *Journal of Medicinally Active Plants* 1: 106–113. doi: 10.7275/R5TT4NW9
- Zhang Y, Davies LR, Martin SM, Bawaney IM, Buettner GR, Kerber RE (2003) Magnesium reduces free radical concentration and preserves left ventricular function after direct current shocks. *Resuscitation* 56: 199–206. doi: 10.1016/s0300-9572(02)00353-2
- Hans CP, Chaudhary DP, Bansal DD (2003) Effect of magnesium supplementation on oxidative stress in alloxanic diabetic rats. *Magnesium research* 16: 13–19
- Anjos JS, Cardozo LFMF, Esgalhado M, Lindholm B, Stenvinkel P, Fouque D, Mafra D (2018) Could low-protein diet modulate Nrf2 pathway in chronic kidney disease? *J Ren Nutr* 28: 229–234. doi: 10.1053/j.jrn.2017.11.005
- Aminzadeh MA, Nicholas SB, Norris KC, Vaziri ND (2013) Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 28: 2038–2045. doi: 10.1093/ndt/gft022
- Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levenon A-L (2013) The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* 1: 45–49. doi: 10.1016/j.redox.2012.10.001
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ (2004) Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J pineal Res* 36: 1–9. doi: 10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x