

NMDA レセプターアンタゴニスト投与がマグネシウム欠乏ラットの肝臓における酸化ストレスおよび炎症反応に及ぼす影響

山本 茜, 友永 省三, 舟場 正幸, 松井 徹
(京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻動物栄養科学分野*)

Effect of NMDA receptor antagonist on hepatic oxidative stress and inflammatory response induced by magnesium deficiency in rats

Akane YAMAMOTO, Shozo TOMONAGA, Masayuki FUNABA, Tohru MATSUI
Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,
Kitashirakawa Oiwake-cho, Kyoto 606-8502, Japan

Summary

Excessive action of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor is induced by magnesium deficiency, which causes oxidative stress and inflammation in the heart. In the present study, we examined the effect of an NMDA receptor antagonist (dizocilpine, MK-801) on the hepatic oxidative stress and inflammatory response induced by magnesium deficiency in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into four groups of six rats as a 2 × 2 factorial arrangement (control and magnesium deficiency, and MK-801 and placebo treatment). The experiment was conducted for one week. Hepatic level of reactive oxygen species was increased by magnesium deficiency but MK-801 administration did not affect the level of reactive oxygen species. Magnesium deficiency increased the hepatic mRNA levels of Mac-1 and CD45 expressed by leukocyte-related cells such as macrophage, monocyte and neutrophil, and the mRNA level of Mcpt1 expressed by mast cells but MK-801 administration did not affect the increased levels of these mRNA by magnesium deficiency. As a conclusion, the excessive action of NMDA receptor was unlikely to be involved in hepatic oxidative stress and inflammatory response induced by magnesium deficiency in rats

マグネシウムは生体に必須の元素であり、骨や歯の構成成分であるだけでなく、能動輸送、エネルギー代謝、体温調節、ホルモン分泌など、多様な生理機能に関わっている。マグネシウム欠乏は皮膚を含む全身的な炎症症状や酸化ストレスを引き起こすことが知られている¹⁾。

N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) レセプターは中枢神経系を中心に体内に広く分布しており、カルシウムイオンを透過するイオンチャネル共役型受容体であり、細胞外マグネシウムイオンによって活性が部分的に阻害されている²⁾。したがって、マグネシウム欠乏時の細胞外マグネシウム濃度の減少は、NMDA レセプターを介した過剰なカルシウムイオンの細胞内流入を引き起こすと考えられている³⁾。マグネシウム欠乏時には、ラットは痛覚過敏となるが、これは NMDA レセプターアンタゴニストである dizocilpine (MK-801) 投与によって低減する⁴⁾。また、マグネシウム欠乏時には、心臓において酸化ストレスや炎症が生じるが、これらも MK-801 投与によって低減することが報告されている：NMDA レセプターを有する C 神経

線維は、後根神経節から心臓へ投影しており⁵⁾、マグネシウム欠乏時の NMDA レセプターを介した過剰なカルシウムイオン濃度の上昇は、C 神経線維終末からのサブスタンス P の分泌を促進し、それによって心臓では酸化ストレスと炎症が生じると考えられている^{6,7)}。肝臓にも C 神経線維が投影している⁸⁾。したがって、マグネシウム欠乏は肝臓に対しても NMDA レセプターの過剰な作用を介して炎症や酸化ストレスを発生させる可能性がある。

本試験では、MK-801 の投与がマグネシウム欠乏ラットの肝臓における炎症反応・酸化ストレスに及ぼす影響を検討した。

材料および方法

本試験は、京都大学における動物実験の実施に関する規程に従った。

AIN-93G⁹⁾ を対照飼料とし、ミネラルミックスからマグネシウムを除いた AIN-93G 飼料をマグネシウム欠乏飼料

*所在地：京都市左京区北白川追分町（〒606-8502）

とした。対照飼料, マグネシウム欠乏飼料中のマグネシウム濃度はそれぞれ 545 mg/kg, 47 mg/kg であった。4 週齢 Sprague-Dawley 系雄ラット 6 匹ずつを, 対照飼料を給与した群 (C 群), マグネシウム欠乏飼料を給与した群 (MgD 群), 対照飼料を給与し MK-801 を投与した群 (C + MK 群), マグネシウム欠乏飼料を給与し MK-801 を投与した群 (MgD + MK 群) の 4 群に割り当てた。5 日間の対照飼料を給与する馴致期間の後, すべてのラットの背部皮下に Alzet 浸透圧ポンプ (model 2001, Alza Corporation, California, USA) をイソフルラン (エスカイン, マイラン, 東京) 麻酔下で移植した。

MK-801 の投与量ならびに投与法は, MK-801 投与がグルコサミン誘導性の肝臓障害を低減することを示した Cauli らの報告¹⁰⁾ に従って設定した。MK-801 (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) を 2 mg/mL になるように生理食塩水に溶解し, 浸透圧ポンプに充填した。この浸透圧ポンプの排出速度は, 1 μ L/h に設計されているので, MK-801 の投与速度は 2 μ g/h となる。MK-801 を投与しない区では, 生理食塩水を充填した浸透圧ポンプを同様に移植した。その後 7 日間にわたり各試験飼料を給与した。試験期間中 4 群で pair-feeding を行い, 飲水は純水を自由摂取させた。

試験期間中, 尾部と耳根部の炎症スコアと摂食量を毎日測定し, 試験開始時と終了時の体重を測定した。炎症スコアは Kotani らの報告¹¹⁾ に基づき, 片耳の腫脹を伴った充血を 1 ポイント, 片耳のかさぶたを伴った炎症を 1 ポイント, 尾部の炎症を 1 ポイント, 合計 5 ポイントとして評価した。試験期間終了後, イソフルラン麻酔下で, あらかじめヘパリンを注入しておいた注射筒器を用いて腹部大動脈から血液を採取した。採取した血液は 2500 \times g, 4°C で 15 分間遠心分離を行い, 血漿を得た。血液採取後, 肝臓, 脾臓を採取し, 重量を測定した。採取した血漿は硝酸および塩酸で湿式灰化後, 原子吸光分光光度計 (AA-6600F, 島津, 京都) により血漿中マグネシウムおよびカルシウム濃度を測定した。ヒドロキシルラジカル, ペルオキシラジカルやパーオキシナイトライトなど強い活性を持つ活性酸素種 (ROS) の肝臓中濃度を 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) 法を用いて測定し¹²⁾, ビシンコニン酸 (BCA) 法¹³⁾ によってタンパク質濃度を求め補正した。

マクロファージ, 単球や好中球など多くの白血球系細胞で発現している Mac-1¹⁴⁾ と CD45¹⁵⁾, マスト細胞が特異的に発現している Mcpt1¹⁶⁾ の mRNA を定量的リアルタイム

RT-PCR (qRT-PCR) により, 過去の報告に従って測定した^{11, 17)}。肝臓から Trizol 試薬 (Life Technology, California, USA) を用いて全 RNA を抽出し, 試料中 RNA 濃度を 260 nm の吸光により測定するとともに, RNA の純度を確認するため 260 nm の吸光度と 280 nm の吸光度の比を求めた。ABI high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, California, USA) を用いて逆転写反応を行い, cDNA を得た。次いで, SYBR premix Ex Taq II kit (タカラ, 大津) を用いて, Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) により qRT-PCR を行った。補正遺伝子産物には Gapdh を用い, 比較 Ct 法により目的とする各 mRNA の量を相対値で示した。使用したプライマー配列を Table 1 に示した。

統計処理は SAS (SAS Institute Inc., North Carolina, USA) を用い, 二元配置分散分析を行った。すべての検定は $P < 0.05$ を有意とした。また, C 群および C + MK 群のラットの肝臓における Mcpt1 mRNA の Ct 値は 40 サイクルを超えたものが多く, 測定ができなかったため, MgD 群と MgD + MK 群間の一元配置分散分析を行った。尾部と耳根部の炎症スコアはノンパラメトリック多重検定法である Steel-Dwass 法を用いた。なお, C 群および C + MK 群では, 試験を通して尾部と耳根部の炎症は認められなかったため, C 群のみを統計検定に用いた。

結果

血漿中マグネシウム濃度, 血漿中カルシウム濃度, 増体重, 摂食量, 飼料効率, 肝臓重量, 脾臓重量, 肝臓中 ROS 濃度の結果を Table 2 に示す。血漿中マグネシウム濃度に対するマグネシウム欠乏の影響は有意であり, マグネシウム欠乏飼料給与によって低い値となったが ($P < 0.001$), MK-801 投与の効果は認められなかった。血漿中カルシウム濃度に対するマグネシウム欠乏, MK-801 投与の効果は認められなかった。本試験では pair-feeding を行ったため, マグネシウム欠乏ならびに MK-801 投与が摂食量に及ぼす影響は認められなかった。また, マグネシウム欠乏ならびに MK-801 投与は体重増加, 飼料効率に影響を及ぼさなかった。肝臓重量はマグネシウム欠乏によって増加した ($P = 0.001$) が, MK-801 投与の効果は認められなかった。脾臓重量に対するマグネシウム欠乏の影響も有意であり, マグネシウム欠乏によって増加した ($P = 0.002$)。しかし, MK-801 投与の効果は認められなかった。

Table 1 Sequence of the PCR primers for amplification

Genes	Forward primer	Reverse primer
Mac-1	5'-CAAGGTCGTTGTGACCAAGTG-3'	5'-CACAGGCAACTCCAAGTGA-3'
CD45	5'-ACAAGACAGAAGGGTGCAGAC-3'	5'-CATTGAACATGGGGAAGCAT-3'
Mcpt1	5'-GCAAAAATGCAGGCCCTACTA-3'	5'-GCGGGAGTGTGGAATAGACT-3'
Gapdh	5'-ACAACCTTGGCATCGTGGA-3'	5'-CTTCTGAGTGGCAGTGATGG-3'

肝臓中 ROS 濃度に対するマグネシウム欠乏の影響は有意であり、マグネシウム欠乏によって増加したが (P = 0.034), MK-801 投与の効果は認められなかった。

C 群と C + MK 群では試験期間を通して炎症は生じなかった。MgD 群では試験開始5日目から、MgD + MK 群では6日目から有意な炎症が認められ、両群とも7日まで炎症スコアは増加し続けたが、試験期間を通して MgD 群と MgD + MK 群の炎症スコアに有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

Mac-1 ならびに CD45 の mRNA 発現量は、マグネシウム

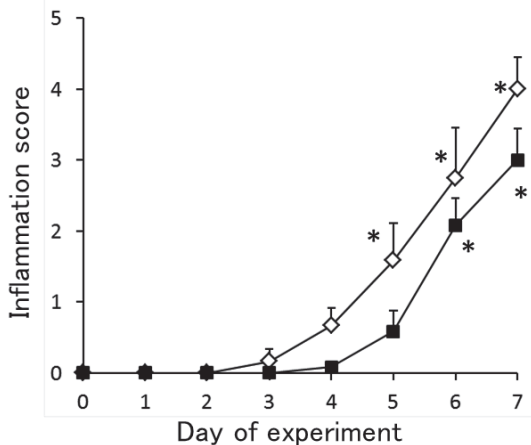


Fig. 1 Effect of magnesium deficiency and the NMDA receptor antagonist on the inflammation score in the skin of rats.

Values are means with their standard errors represented by vertical bars (n = 6).

◇, rats given the magnesium-deficient diet; ■, rats given the magnesium-deficient diet with administered the NMDA receptor antagonist.

Lesions were not observed in the rats the control diet and the rats given the control diet with administered the NMDA receptor antagonist throughout the experimental period. Therefore, inflammation scores were not shown in the figure, and the data of one group were adopted as representative data in the statistical analysis.

Statistical significance was not observed between both groups given the magnesium-deficient diet.

* Mean values were significantly different from the groups given control diet (P < 0.05).

ム欠乏によって増加したが (Mac-1, P = 0.008; CD45, P = 0.013), MK-801 投与の影響は認められなかった (Table 3)。対照飼料を給与したラットの肝臓における Mcpt-1 の mRNA は、MK-801 の投与に関係なく多くの個体で発現が認められなかった。マグネシウム欠乏ラットでは Mcpt-1 の mRNA は発現していたが、MK-801 投与の影響は認められなかった。

考 察

マグネシウム欠乏飼料を給与したラットの血漿中マグネシウム濃度は、対照飼料を給与したラットと比較し著しく低下し、MK-801 投与は血漿中マグネシウム濃度に影響を及ぼさなかった。したがって、本試験における NMDA レセプターの阻害は、マグネシウム代謝に大きな影響を及ぼさなかった可能性がある。

マグネシウム欠乏ならびに MK-801 投与は体重増加量ならびに飼料効率に影響を及ぼさなかった。ラットにマグネシウム欠乏を給与し、pair-feeding を行った試験では、飼料効率が低下し、成長が抑制されることが報告されているが¹⁸⁾、本試験におけるマグネシウム欠乏飼料給与期間は1週間と短かったため、飼料効率や成長に及ぼす影響が明瞭にならなかったと考えられた。

マグネシウム欠乏飼料を給与したラットでは、尾部および耳根部に炎症が認められ、脾臓重量が増加したが、MK-801 投与はマグネシウム欠乏により生じる尾部および耳根部の炎症や脾臓重量に影響を及ぼさなかった。マグネシウム欠乏による尾部と耳根部の炎症と脾臓重量の増加は、実験動物における典型的なマグネシウム欠乏時の反応である¹⁾。尾部と耳根部の炎症には、皮膚におけるヒスタミン放出を伴ったマスト細胞の脱顆粒が関係している¹⁹⁾。また、マグネシウム欠乏ラットの脾臓では、多形核白血球やマクロファージが増加し、炎症反応により肥大化する²⁰⁾。マグネシウムは天然のカルシウムアンタゴニストであり、細胞外から細胞内へのカルシウム流入を抑制すると考えられている²¹⁾。本試験ではマグネシウム欠乏ならびに MK-801

Table 2 Effect of magnesium deficiency and the NMDA receptor antagonist on plasma magnesium and plasma calcium concentration, body weight gain, feed intake, feed efficiency, organ weights, and hepatic level of reactive oxygen species.

Group	C		MgD		C + MK		MgD + MK		ANOVA Effect (P)		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mg	MK	Mg × MK
Plasma Mg (mg/L)	21.10	1.07	3.40	0.64	20.76	0.64	2.57	0.11	< 0.001	0.415	0.730
Plasma Ca (mg/L)	124.42	4.64	131.91	2.31	118.20	3.56	120.42	2.80	0.355	0.443	0.629
Weight gain (g/d)	5.73	0.21	5.82	0.18	5.98	0.12	6.13	0.16	0.441	0.142	0.765
Feed intake (g/d)	14.94	0.05	14.83	0.15	14.90	0.08	14.76	0.23	0.404	0.718	0.907
Feed efficiency (g/g)	0.38	0.01	0.39	0.01	0.40	0.01	0.40	0.02	0.105	0.266	0.718
Liver weight (g)	7.04	0.20	7.91	0.26	7.42	0.21	8.19	0.20	0.001	0.147	0.827
Spleen weight (g)	0.49	0.03	0.63	0.07	0.49	0.02	0.69	0.05	0.002	0.563	0.586
Liver ROS (nmol/g protein)	29.45	5.15	48.58	13.65	26.23	2.39	50.7	12.1	0.034	0.956	0.782

Mean values with their standard errors (n = 6).

Feed efficiency = Weight gain/Feed intake

C, rats given the control diet; C + MK, rats given the control diet with administered the NMDA receptor antagonist (MK-801); MgD, rats given the magnesium-deficient diet; MgD + MK, rats given the magnesium-deficient diet with administered the NMDA receptor antagonist; Mg, Magnesium; ROS, reactive oxygen species; MK, MK-801.

Table 3 Effect of magnesium deficiency and the NMDA receptor antagonist on the expression of Mac-1, CD45, and Mcpt1 mRNA.

Group	C		MgD		C + MK		MgD + MK		ANOVA Effect (P)		
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mg	MK	Mg × MK
Mac-1	1.00	0.56	2.53	0.91	0.46	0.17	3.26	0.81	0.008	0.985	0.588
CD45	1.00	0.28	2.24	0.55	1.00	0.29	2.58	0.70	0.013	0.898	0.893
Mcpt1	—	—	1.00	0.43	—	—	0.51	0.20	—	0.714	—

Mean values with their standards errors (n = 6).

C, rats given the control diet; C + MK, rats given the control diet with administered the NMDA receptor antagonist (MK-801); MgD, rats given the magnesium-deficient diet; MgD + MK, rats given the magnesium-deficient diet with administered the NMDA receptor antagonist; Mg, Magnesium; MK, MK-801.

The expression of Mac-1 and CD45 mRNA was expressed as the relative value to the control group.

The expression of Mcpt1 mRNA was expressed as the relative value to the MgD group because Mcpt1 mRNA was not detected in most rats of the C and C-MK groups.

投与は血漿中カルシウム濃度に影響を及ぼさなかったが、Bussiere ら²²⁾は、マグネシウム欠乏により引き起こされる尾部と耳根部の炎症が、血漿中カルシウム濃度低下を伴ったカルシウム欠乏飼料給与により軽減することを見出し、細胞外液のカルシウム濃度低下は、細胞外液の低いマグネシウム濃度による細胞内へのカルシウムイオン流入増加を抑制する結果、炎症を妨げることを示唆している。一方、Kotani ら¹¹⁾は、血漿中カルシウム濃度低下を伴わないカルシウム欠乏でも、マグネシウム欠乏による尾部と耳根部の炎症が軽減することから、軽度のカルシウム欠乏が骨吸収を促進することにより、骨からのマグネシウムの供給が増加し、部分的にマグネシウム欠乏が緩和されることによって、皮膚の炎症反応が起こりにくくなることを報告している。カルシウムイオンを透過するイオンチャネル共益型受容体である NMDA レセプターは細胞外マグネシウムイオンによって活動が部分的に阻害されている²⁾。したがって、マグネシウム欠乏時の細胞外マグネシウムイオン濃度の減少は、NMDA レセプターを介して、カルシウムイオンの細胞内への過剰な流入を引き起こし、これがマグネシウム欠乏による心筋の炎症を引き起こすことが示唆されている³⁾。本試験では、MK-801 投与はマグネシウム欠乏により生じる皮膚の炎症や脾臓の重量増加に影響しなかったため、NMDA レセプターの作用はマグネシウム欠乏時の皮膚や脾臓の炎症に関与しないことが示された。

マグネシウム欠乏により肝臓重量が増加したが、この増加に MK-801 投与は影響しなかった。マグネシウム欠乏は肝臓中トリグリセリド濃度を上昇させることが知られている^{23, 24)}。本試験では、肝臓中のトリグリセリド濃度を測定していないが、マグネシウム欠乏時に認められた肝臓重量の上昇は、脂肪蓄積増加に起因している可能性があり、この脂肪蓄積増加には NMDA レセプターの作用は関与しないことが示唆された。

肝臓中 ROS 濃度はマグネシウム欠乏によって増加した (P = 0.034)。この結果は、短期間のマグネシウム欠乏による肝臓での酸化ストレス発生を示しており、マグネシウム欠乏飼料給与 8 日間で、ラット肝臓中過酸化脂質濃度が上昇した過去の報告と一致している²²⁾。本試験では、マグネシウム欠乏時の肝臓中 ROS 濃度上昇に MK-801 投与

は影響しなかった。本試験の結果から、マグネシウム欠乏時に肝臓では酸化ストレスが生じるが、これには NMDA レセプターの作用は関与しないことが示唆された。

マクロファージ、単球や好中球など多くの白血球系細胞で発現している Mac-1¹⁴⁾ ならびに CD45¹⁵⁾ の mRNA 発現がマグネシウム欠乏ラットの肝臓では増加したが、MK-801 投与による効果は認められなかった。肝臓ではマクロファージであるクッパー細胞が常在している²⁵⁾。クッパー細胞も Mac-1, CD45 を発現していることが知られている^{26, 27)}。単離した肺胞マクロファージをマグネシウム欠乏培地で培養すると、TNF- α および IL-1 β 放出が促進され、カルシウム阻害剤であるニフェジピン投与によって、このマグネシウム欠乏の影響が消失することが報告されている²⁸⁾。したがって肝臓のクッパー細胞も肺胞マクロファージ同様に、マグネシウム欠乏によって活性化が生じている可能性がある。また、肝臓で大量の ROS が産生されると酸化ストレスが生じ、それによってクッパー細胞が活性化し、活性化したクッパー細胞での炎症性サイトカイン産生が増加し、炎症反応やさらなる酸化ストレス増大につながることを報告されている²⁹⁾。以上の結果から、マグネシウム欠乏自体またはマグネシウム欠乏によって生じる ROS が、肝臓におけるクッパー細胞の活性化を生じ、炎症反応が生じている可能性がある。一方、マグネシウム欠乏時の Mac-1 ならびに CD45 の mRNA 発現増加は、MK-801 投与の影響を受けなかったため、このような反応には NMDA レセプターは関連しないことが示された。

肝臓中 Mcpt1 の mRNA は、マグネシウムを充足した多くのラットでは発現が認められなかったが、マグネシウム欠乏ラットでは発現しており、その発現量は MK-801 の影響を受けなかった。マグネシウム欠乏は十二指腸、腎臓粘膜下組織、舌、骨髄におけるマスト細胞数を増加させる^{19, 30-32)}。Takemoto ら³³⁾はマグネシウム欠乏により肝臓中のマスト細胞数が出現するとともに、マスト細胞特異的な Mcpt1 の mRNA が発現することを報告している。本試験でも、マグネシウム欠乏は肝臓においてマスト細胞を誘導することが示唆された。一方、マグネシウム欠乏によるマスト細胞の誘導には、NMDA レセプターは関与しないことが示された。

本試験では、マグネシウム欠乏ラットの肝臓では、ROS産生増加による酸化ストレスが発生しており、白血球関連伝子発現増加やマスト細胞特異的遺伝子発現増加が示すように炎症反応が生じている可能性が示唆された。しかし、MK-801投与はこれらマグネシウム欠乏に対する反応に影響しなかった。マグネシウム欠乏飼料給与1週後は、ラット心臓に投射されているC神経線維末端からのサブスタンスP分泌がNMDAレセプターの過剰作用により増加し、炎症が生じることが報告されている⁷⁾。肝臓にも心臓と同様にC神経投射が投影されているが^{5,8)}、マグネシウム欠乏により生じる肝臓での酸化ストレスや炎症反応は、心臓とは異なりNMDAレセプターの作用過剰を介していないことが示唆された。

参考文献

- Mazur A, Maier JA, Rock E, Gueux E, Nowacki W, Rayssiguier Y (2007) Magnesium and the inflammatory response: potential physiopathological implications. *Arch Biochem Biophys* 458: 48-56.
- Dingreline R, Boreges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamine receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 8-63.
- Kramer JH, Spurney C, Lantorno M, Tziros C, Mak IT, Tejero-Talado MI, Chmielinska JJ, Komarov AM, Weglicki WB (2009) Neurogenic inflammation and cardiac dysfunction due to hypomagnesemia. *Am J Med Sci* 338: 22-27.
- Dubray C, Alloui A, Bardin L, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y, Eschalier A, Lavarenne J (1997) Magnesium deficiency induces an hyperalgesia reversed by the NMDA receptor antagonist MK801. *Neuroreport* 8: 1383-1386.
- Fu LW, Longhurst JC (2013) Functional role of peripheral opioid receptors in the regulation of cardiac spinal afferent nerve activity during myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305: 76-85.
- Weglicki WB, Mak IT, Stafford RE, Dickens BF, Cassidy MM, Phillips TM (1994) Neurogenic peptides and the cardiomyopathy of magnesium deficiency: effects of substance P-receptor inhibition. *Mol Cell Biochem* 130: 103-109.
- Tajero-Talado MI, Chmielinska JJ, Gonzalez G, Mak IT, Weglicki WB (2004) *N*-methyl-D-aspartate receptor blockade inhibits cardiac inflammation in the Mg²⁺-deficient rat. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 8-13.
- Longhurst JC, Kaufman MP, Ordway GA, Musch TI (1984) Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs. *Am J Physiol* 247: 552-559.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
- Cauli O, Rodrigo R, Boix J, Piedrafita B, Agusti A, Felipo V (2008) Acute liver failure-induced death of rats is delayed or prevented by blocking NMDA receptors in brain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 295: 503-511.
- Kotani M, Kim KH, Ishizaki, Funaba M, Matsui T (2012) Magnesium and calcium deficiencies additively increase zinc concentrations and metallothionein expression in the rat liver. *Br J Nutr* 9: 1-8.
- Kajikawa S, Imada K, Takeuchi T, Shimizu Y, Kawashima A, Harada T, Mizuguchi K (2011) Eicosapentaenoic acid attenuates progression of hepatic fibrosis with inhibition of reactive oxygen species production in rats fed methionine- and choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* 56: 1065-1074.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.
- Olyslaegers DA, Dedeurwaerder A, Desmaretz LM, Vermeulen BL, Dewerchin HL, Nauwynck HJ (2013) Altered expression of adhesion molecules on peripheral blood leukocytes in feline infectious peritonitis. *Vet Microbiol* 1135: 342-348.
- Moore JP, Sakkal S, Bullen ML, Kemp-Harper BK, Ricardo SD, Sobey CG, Drummond GR (2013) A flow cytometric method for the analysis of macrophages in the vascular wall. *J Immunol Methods*. doi: 10.1016/j.jim.2013.07.009.
- Pejler G, Abrink M, Ringvall M, Wernersson S (2007) Mast cell proteases. *Adv Immunol* 95: 167-255.
- Suenaga M, Matsui T, Funaba M. (2010) BMP Inhibition with dorsomorphin limits adipogenic potential of preadipocytes. *J Vet Med Sci* 72: 373-377.
- Dorup I, Flyvbjerg A, Everts ME, Clausen T (1991) Role of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiencies. *Br J Nutr* 66: 505-521.
- Kraeuter SL, Schwartz R (1980) Blood and mast cell histamine levels in magnesium-deficient rats. *J Nutr* 110: 851-858.

- 20) Malpuech-Brugere C, Kuryszko J, Nowacki W, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A (1998) Early morphological and immunological alterations in the spleen during magnesium deficiency in the rat. *Magnes Res* 11: 161-169.
- 21) Iseri LT, French JH (1984) Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 108: 188-193.
- 22) Bussière FI, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y (2002) Protective effect of calcium deficiency on the inflammatory response in magnesium-deficient rats. *Eur J Nutr* 41: 197-202.
- 23) Akiyama S, Uehara M, Katsumata S, Ihara H, Hashizume N, Suzuki K (2008) Effects of dietary ascorbic acid supplementation on lipid peroxidation and the lipid content in the liver and serum of magnesium-deficient rats. *Magnes Res* 21: 232-236.
- 24) Rayssiguier Y, Gueux E, Weiser D (1981) Effect of magnesium deficiency on lipid metabolism in rats fed a high carbohydrate diet. *J Nutr* 111: 1876-1883.
- 25) Kinoshita M, Uchida T, Sato A, Nakashima M, Nakashima H, Shono S, Habu Y, Miyazaki H, Hiroi S, Seki S (2010) Characterization of two F4/80-positive Kupffer cell subsets by their function and phenotype in mice. *J Hepatol* 53: 903-910.
- 26) Ikarashi M, Nakashima H, Kinoshita M, Sato A, Nakashima M, Miyazaki H, Nishiyama K, Yamamoto J, Seki S. (2013) Distinct development and functions of resident and recruited liver Kupffer cells/macrophages. *J Leukoc Biol*. doi: 10.1189/jlb.0313144.
- 27) De Vito R, Alisi A, Masotti A, Ceccarelli S, Panera N, Citti A, Salata M, Valenti L, Feldstein AE, Nobili V (2012) Markers of activated inflammatory cells correlate with severity of liver damage in children with nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med* 30: 49-56.
- 28) Shogi T, Oono H, Nakagawa M, Miyamoto A, Ishiguro S, Nishio A (2002) Effects of a low extracellular magnesium concentration and endotoxin on IL-1beta and TNF-alpha release from, and mRNA levels in, isolated rat alveolar macrophages. *Magnes Res* 15: 147-152.
- 29) Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, Méndez-Sánchez N (2012) Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem* 19: 4850-4860.
- 30) Veilleux R (1975) Mast cell increase in the duodenum and kidney of magnesium-deficient rats. *Lab Invest* 33: 80-87.
- 31) Bois P (1963) Effect of magnesium deficiency on mast cells and urinary histamine in rats. *Br J Exp Pathol* 44: 151-155.
- 32) Bélanger LF (1977) Variations in the mast cell population of skin and bone marrow in magnesium-deprived rats. The influence of sex hormones. *J Nutr* 107: 2164-2170.
- 33) Takemoto S, Yamamoto A, Tomonaga S, Funaba M and Matsui T (2013) Magnesium deficiency induces emergence of mast cells in the liver of rats. *J Nutr Sci Vitaminol* accepted.