

## マグネシウム欠乏が卵巣摘出ラットの骨格筋中低分子親水性代謝物質濃度に及ぼす影響

西山 真奈美, 中川 良祐, 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\*)

(受付 2018年8月31日, 受理 2018年9月25日)

### Effects of magnesium deficiency on low-molecular-weight and hydrophilic metabolite contents in skeletal muscle of ovariectomized rats

Manami NISHIYAMA, Ryosuke NAKAGAWA, Shozo TOMONAGA, Masayuki FUNABA, Tohru MATSUI  
*Division of Applied Biosciences, Kyoto University Graduate School of Agriculture\**

#### Summary

Several researchers suggested that magnesium (Mg) deficiency induces metabolic disturbance in the liver. Skeletal muscle is an important organ for metabolism such as glucose and amino acids, and skeletal muscle is one of the organs affected by Mg deficiency. Because Mg deficiency is known to decrease feed intake, some researches adopted a pair-feeding control diet. However, restricted feeding changes feed-intake pattern, i.e., rapid and large consumption of feed just after feeding, which probably affect many metabolisms. In the present experiment, we determined low-molecular-weight and hydrophilic metabolite concentrations by non-targeted semi-quantitative analysis with GC-MS/MS in skeletal muscle of ovariectomized (OVX) rats because OVX induces hyperphagia and Mg deficiency is unlikely to induce the reduction of feed intake in OVX rats. Although Mg deficiency did not affect feed intake, body weight gain and feed efficiency were decreased in the Mg-deficient rats. One hundred and twenty-one metabolites were identified in the gastrocnemius muscle, in which 15 metabolite concentrations were affected by Mg deficiency. An enrichment analysis showed that Mg deficiency affected pentose phosphate pathway, purine metabolism, and pantothenic acid and CoA biogenesis. These results suggest that Mg deficiency disturbs these metabolisms in the skeletal muscle, which may be one of pathogenesis of Mg-deficient diseases.

ヒトにおけるマグネシウム (Mg) の欠乏は、動脈硬化、高血圧、骨粗しょう症、糖尿病、肥満などの様々な疾病の発症リスクとなることが示唆されている<sup>1)</sup>。また、日本国内での大規模な疫学研究においても、Mg 摂取が少ない集団では2型糖尿病の発症リスクが高いことが示されている<sup>2)</sup>。

Mg は多くの酵素の補助因子として機能し、様々な代謝過程において重要な役割を担っている。Mg 欠乏はラットにおいて耳根部や尾部での急性炎症および全身性の軽度な慢性炎症、酸化ストレス、高脂血症などを引き起こすことが認められている<sup>3,4)</sup>。Shigematsuら<sup>5)</sup> はラットの肝臓のメタボロミクスによって、タウリン・ヒポタウリン代謝、メチオニン代謝ならびにグリシン・セリン・スレオニン代謝が Mg 欠乏の影響を受けることを示唆しており、また、解糖系・糖新生系やペントースリン酸経路において重要な中間体であるグルコース 6-リン酸の減少を認めている。さらに、Mg 欠乏下の培養肝細胞では、グルコース 6-リ

ン酸をペントースリン酸経路に導入するグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性が上昇することも認められている<sup>6)</sup>。このように Mg 欠乏は肝臓において様々な代謝変化を引き起こすと考えられている。

骨格筋も Mg 欠乏の影響を受ける組織のひとつであり、Mg 欠乏の成長期ラットではタンパク質合成の抑制が示唆されている<sup>7)</sup>。成長期ラットでは Mg 欠乏による筋小胞体の障害を介してフリーラジカルが増大し、筋損傷が起こる<sup>8)</sup>。8週齢のラットに Mg 欠乏飼料を4週間給与した試験では、腓腹筋重量の減少、脂質過酸化の増加、骨格筋分化において重要な転写因子である MyoD と Myogenin の遺伝子発現の上昇が認められ、Mg 欠乏による酸化ストレスが筋損傷を生じ、その結果、筋肉の再生が促進されていることが示唆されている<sup>9)</sup>。また、Matsuiら<sup>10)</sup> は、Mg 欠乏による成長期ラットの骨格筋における TNF- $\alpha$  遺伝子発現の上昇を報告しており、これがインスリン感受性低下の

\*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

一因である可能性を示唆している。

骨格筋を含む多様な組織における低分子代謝物含量は Mg 欠乏などの影響を直接的に反映しているため、代謝の乱れを検討する上で有効であると考えられる。さらに、各組織に含まれる低分子代謝物を網羅的に検討することで、様々な代謝変化を包括的に把握できる。一方、Mg 欠乏はラットの摂食量を減少させることが知られており、対照食を用いた pair-fed が雌および雄ラットで行われている<sup>7,11)</sup>。しかし pair-fed 時には、飼料給与直後に著しく多くの飼料摂取が生じるなど採食パターンが飽食時とは異なっており、行動学的・生理学的な概日リズムが乱され、代謝を検討する際に問題となる可能性が考えられる<sup>12)</sup>。卵巣摘出 (OVX) によるエストロジェンの減少は過食を引き起こす。したがって、OVX 動物に対する Mg 欠乏では摂食量減少は生じない可能性がある。OVX は骨格筋におけるグルコース代謝やタンパク質代謝に影響を与えることが報告されている<sup>13,14)</sup> が、Mg 欠乏時の代謝変化を検討する上で良い対象となると考えられる。そこで本試験では、ラットに OVX を行い、Mg 欠乏時の骨格筋における様々な低分子親水性代謝物濃度を網羅的に測定し、Mg 欠乏により変化する代謝系を推定することを目的とした。

## 材料および方法

### 供試飼料

維持用飼料としては MF (オリエンタル酵母, 東京) を用いた。試験期には、対照飼料として AIN-93M<sup>15)</sup> を用い、Mg 欠乏飼料としては AIN-93M のミネラルプレミックスを Mg 無添加のプレミックスに置き換えた飼料を用いた。対照飼料と Mg 欠乏飼料の Mg 濃度は、それぞれ 498.4 mg/kg、47.5 mg/kg であり、対照飼料はラットの Mg 要求量である 500 mg/kg<sup>15)</sup> をほぼ満たしていたが、Mg 欠乏飼料は要求量の 10% 程度であり、大きく下回っていた。

### 動物試験

12 頭の 5 週齢 Sprague-Dawley 系雌ラット (日本 SLC, 静岡) をステンレスケージで単飼し、蒸留水は自由摂取とした。室温が 24±1℃、明期 14 時間/暗期 10 時間の環境下で、13 週齢まで維持した。その後、イソフルラン (マイラン, 大阪) 麻酔下で両側の OVX を行い、術後 7 日間は対照飼料を給与した。その後 6 頭には継続して対照飼料を (対照群)、他の 6 頭には Mg 欠乏飼料を (Mg 欠乏群) 12 週間給与した。供試飼料給与期間中、摂食量を毎日、体重を週に 1 度計測し、あわせて、飼料効率 (体重増加量/飼料摂取量) を算出した。なお、試験期間中に死亡した個体を除き、対照群と Mg 欠乏群それぞれ 5 頭を対象とした。動物試験は、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 25 年環境省告示第 84 号) を遵守し、京都大学における動物実験の実施に関する規程

(京都大学動物実験委員会) に基づき行った (承認番号: 29-7)。

### 試料採取

飼育試験終了後、イソフルラン (マイラン) 麻酔下で腹部大動脈から注射筒を用いて採血し、採血による失血によって屠殺した。採取した血液にはヘパリンナトリウム (和光純薬, 大阪) を添加し、4℃、3000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、血漿を得た。血漿サンプルは分析まで -80℃ で保存した。また、屠殺後速やかに腓腹筋を採取し、湿重量を測定した。採取した筋肉サンプルは液体窒素で凍結後、分析まで -80℃ で保存した。

### Mg 濃度の測定

採取した血漿は、10% トリクロル酢酸を用いて除タンパク質処理を行ったのち、原子吸光分光光度計 (AA-6600F, 島津製作所, 京都) により血漿中 Mg 濃度を測定した。また、飼料中 Mg 含量を硝酸による湿式灰化の後に、同様の方法で測定した。

### 親水性低分子代謝物質の網羅的半定量分析

筋肉サンプルは、Shigematsu<sup>5)</sup> の方法により親水性画分を抽出後、メトキシアミン塩酸塩 (MP Biomedicals, California, USA) によりオキシム化し、更に *N*-メチル-*N*-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミド (フナコシ, 東京) によりトリメチルシリル誘導体とした。これらのサンプルを GC-MS/MS (GCMS-TQ8050, 島津製作所) による SCAN モードおよび MRM モードでの分析に供した。両モードでの GC 分析条件も Shigematsu<sup>5)</sup> に準じた。取得データのピークの検出、アライメントおよびピークの同定には、保持時間ならびにマススペクトルを基準として半自動同定を行う MS-DIAL ver. 2.76<sup>16)</sup> と、データベースソフトウェアである Smart Metabolites Database (島津製作所) を用いた。類似度が 70% 以上、保持指標が ±10 以内を基準とした。それぞれの物質の濃度は対照群の平均値を 100 とし相対値で示した。

### 統計分析

データは、平均±標準誤差として表した。平均値間の差の検定を、Student's t-test を用いて行い、P < 0.05 を有意とした。

対照群、Mg 欠乏群の 2 群間で、有意な差または差がある傾向 (P < 0.1) が認められた代謝物質を MetaboAnalyst4.0<sup>17)</sup> でエンリッチメント解析に用い、検出された代謝経路のうち P < 0.05 であったものを、Mg 欠乏の影響を受けたとした。

## 結果と考察

Mg 欠乏により、血漿中 Mg 濃度は低下した (Table 1)。しかしその程度は成長期の Mg 欠乏ラットにおける低下

よりも軽度であり<sup>8, 10, 11, 18, 19)</sup>、一方、4ヶ月齢から5ヶ月齢の雄雌成熟ラットにそれぞれ31日、46日、62日間Mg欠乏飼料を与えた試験における血漿中Mg濃度の低下と同程度であった<sup>20)</sup>。また、成長期のラットではMg欠乏によって耳根部や尾部、脚部に炎症病変が生じるが<sup>4, 11)</sup>、本試験では皮膚の炎症は認められなかった(データは示していない)。AINにおける成熟(維持)ラットのMg要求量は実験により得られた値ではなく、成長期のラットの要求量を満たせば問題ないとし、そのため成熟ラット用のAIN-93Mと成長期ラット用のAIN-93Gに含まれるMg含量は等しく設定されている<sup>15)</sup>。本試験の結果から、成長期ラットよりも成熟期ラットのMg要求量は低く、同程度のMg欠乏飼料を与えた場合、成熟期ラットにおける欠乏は、成長期ラットよりも軽度であることが示唆された。

Mg欠乏により、摂食量は影響を受けなかった(Table 1)。Mg欠乏ラットでは摂食量が減少することが知られている。一方、OVXラットでは過食が起るため、本試験ではMg欠乏群においても過食となり、その結果、Mg欠乏による摂食量抑制効果は生じなかった可能性がある。また、成熟ラットのMg要求量は低いため、本試験で用いた水準のMg欠乏飼料では、摂食量の低下が生じなかった可能性もある。

ラットでは、性成熟後も体重が増加し続ける<sup>15)</sup>。本試験でも14週齢から26週齢まで試験を行ったが、Mg栄養状態にかかわらず体重増加が認められた。また、摂食量に差が認められなかったが、体重増加と飼料効率もMg欠乏によって低下した。対照飼料のpair-fedを行った群と比較しても、Mg欠乏群では体重増加の抑制および飼料効率の低下が認められている<sup>11)</sup>。したがって、摂食抑制だけではなく、他の要因によっても、Mg欠乏時には飼料効率が低下する結果、増体が抑制されることは明らかである。成長期ラットを用いた試験において、Mg欠乏群ではpair-fed群に比べ体重およびIGF-1が低下することが報告されており、Mg欠乏はIGF-1分泌低下を介して成長を抑制していることが示唆されている<sup>21)</sup>。

Furutaniら<sup>9)</sup>の成長期ラットを用いた試験では、Mg欠乏によって腓腹筋重量が減少することが示されている。一方、本試験では、同程度のMg欠乏飼料は、腓腹筋重量

に影響を及ぼさなかった。先に述べたように、Mg要求量は成長期のラットよりも成熟期ラットで低いと考えられるので、成長中のラットで生じる腓腹筋重量の減少が成熟期ラットでは認められないことが推察される。しかしながら、本試験でも、Furutaniら<sup>9)</sup>の試験同様に、Mg欠乏による体重増加抑制が認められたことから、腓腹筋重量はMg欠乏の影響を受けにくいことが示唆された。

腓腹筋のメタボローム解析により、121種類の親水性低分子代謝物質が同定された。対照群、Mg欠乏群間で7種類の物質濃度において有意な差があり、8種類の物質濃度において差がある傾向(P<0.1)が認められた。これらの物質のエンリッチメント解析を行い、OVXラットにおいてMg欠乏の影響を受ける代謝経路を推定したところ、ペントースリン酸経路、プリン代謝、パントテン酸・CoA生合成が検出された。

ペントースリン酸経路に関連する物質のうち、Mg欠乏によりリボース濃度は有意に増加し、セドヘプツロース7-リン酸濃度は増加傾向(P=0.09)、AMPは減少傾向(P=0.05)を示した(Fig.1)。また、グルコース6-リン酸、フルクトース6-リン酸、リボース5-リン酸、ジヒドロキシアセトンリン酸、リン酸は検出されたが、Mg欠乏の影響を受けなかった。ペントースリン酸経路は解糖系の側路であり、グルコース6-リン酸からリブロース5-リン酸に至る酸化的過程とリブロース5-リン酸からリボース5-リン酸を介しグリセルアルデヒド3-リン酸やフルクトース6-リン酸を生成する非酸化的過程から構成される(Fig.2)。なお、この経路で合成されるリボース5-リン酸の一部は核酸合成に供されるとともに、脱リン酸化されリボースに代謝される。また、非酸化的過程の逆行によってフルクトース6-リン酸からセドヘプツロース7-リン酸を介してリボース5-リン酸が合成される。本試験ではペントースリン酸経路の構成物質であるセドヘプツロース7-リン酸とリボースの濃度増加が認められたが、骨格筋では酸化的過程に関わる酵素の活性が非酸化的過程に比べて非常に小さい<sup>22)</sup>。したがって、セドヘプツロース7-リン酸とリボース濃度の増加はペントースリン酸経路酸化的過程の亢進の結果であるとは考えにくく、ペントースリン酸経路非酸化的過程の抑制、または、非酸化的過程経路の逆行

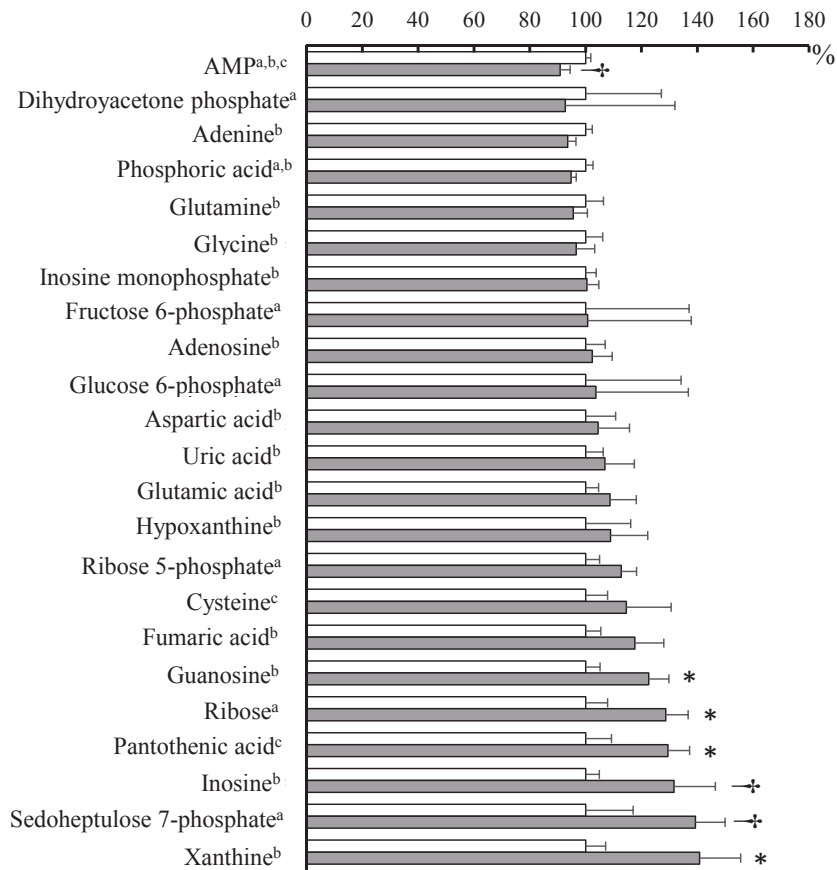
**Table 1** Effect of Mg deficiency on body weight, feed intake, feed efficiency, muscle weight and plasma Mg concentration in ovariectomized rats

	Control	Mg deficiency
Initial body weight (g)	301.3 ± 15.1	300.7 ± 9.7
Body weight gain (g/day)	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1*
Feed intake (g/day)	18.6 ± 0.8	18.0 ± 0.5
Feed efficiency (g/g)	0.08 ± 0.002	0.06 ± 0.005*
Gastrocnemius weight (g)	2.17 ± 0.11	2.01 ± 0.07
Plasma Mg (mg/L)	18.9 ± 0.3	7.7 ± 1.0*

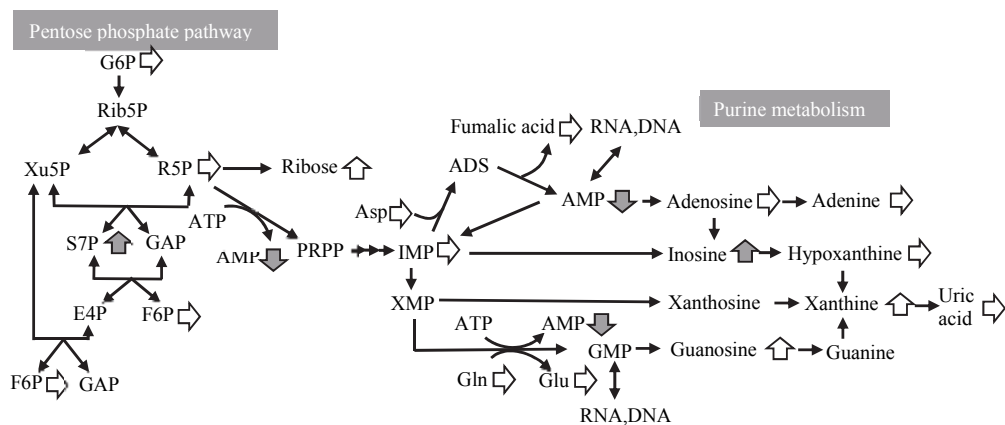
Values are the mean ± SEM (n = 5).

\* Significantly different from control group (P < 0.05).

Feed efficiency = Body weight gain / Feed intake



**Fig. 1** Effects of Mg deficiency on metabolite contents related to pentose phosphate pathway, purine metabolism, and pantothenate and CoA biosynthesis in the skeletal muscle of ovariectomized rats. Open column shows control group and closed column shows Mg-deficient group. Data were expressed as percentage of control group. Values are means  $\pm$  SEM (n = 5). \* Significantly different from the control group ( $P < 0.05$ ). † Tended to be different from the control group ( $0.05 \leq P < 0.10$ ). a, Metabolite related to pentose phosphate pathway. b, Metabolite related to purine metabolism. c, Metabolite related to pantothenate and CoA biosynthesis.



**Fig. 2** Mg affecting metabolic pathways suggested by an enrichment analysis in the skeletal muscle of ovariectomized rats. Up arrow indicated the metabolites increased by Mg deficiency. Down arrow indicated the metabolite decreased by Mg deficiency. Open arrow showed the significant difference between the two groups ( $P < 0.05$ ). Closed arrow showed the tendency of difference between the two groups ( $0.05 \leq P < 0.10$ ). Right arrow indicated the metabolites not affected by Mg deficiency. The metabolites without arrow indicated not detected. G6P, Glucose 6-phosphate; F6P, Fructose 6-phosphate; GAP, Glyceraldehyde 3-phosphate; E4P, Erythrose 4-phosphate; S7P, Sedoheptulose 7-phosphate; Xu5P, Xylulose 5-phosphate; Rib5P, Ribulose 5-phosphate; PRPP, Phosphoribosyl pyrophosphate; IMP, Inosine monophosphate; XMP, Xanthosine monophosphate; GMP, Guanosine monophosphate; ADS, Adenylosuccinate

によってフルクトース 6-リン酸からのセドヘプツロース 7-リン酸とリボースの産生が増加した可能性が考えられる。Mg 欠乏ラットの肝臓において、グルコース 6-リン酸濃度が減少することが報告されており<sup>5)</sup>、Mg 欠乏下の培養肝細胞では、グルコース 6-リン酸をペントースリン酸経路に導入するグルコース 6-リン酸デヒドロゲナーゼ活性が上昇することも認められている<sup>6)</sup> ため、Mg 欠乏によって肝臓ではペントースリン酸経路が亢進している可能性が示唆されている。このように、Mg 欠乏が肝臓と筋肉におけるペントースリン酸経路に及ぼす影響は異なると考えられる。

プリン代謝に関連する物質のうちグアノシンとキサンチン濃度は Mg 欠乏によって増加し、イノシン濃度は増加傾向 (P=0.08) を、AMP は減少傾向 (P=0.05) を示した。一方、アデニン、アデノシン、アスパラギン酸、イノシン 5-リン酸、グリシン、グルタミン、グルタミン酸、尿酸、ヒポキサンチン、フマル酸、リン酸は検出されたが、Mg 欠乏の影響を受けなかった (Fig.1)。

核酸の異化によってプリン塩基含有物質として AMP や GMP が生じる。AMP はアデノシン、イノシン、ヒポキサンチンを介してキサンチンとなる。GMP はグアノシン、グアニンを介してキサンチンとなる (Fig.2)。

Mg は核酸の構造安定化に重要であることが知られている<sup>23)</sup>。本試験では、グアノシンとイノシン濃度が増加しており、さらにこれらの産物であるキサンチン濃度も上昇していたことから、Mg 欠乏によって核酸が不安定化し、その分解によってプリンヌクレオシドからのグアノシンとイノシン産生が増加するとともに、余剰のグアノシンとイノシンがキサンチンに異化された可能性がある。キサンチンから尿酸への代謝を触媒するキサンチンオキシダーゼの遺伝子発現および活性は筋肉では低い<sup>24)</sup>。したがって、筋肉では、キサンチンから尿酸への代謝がプリン塩基の異化の律速段階になっており、Mg 欠乏によってキサンチン濃度が上昇したにもかかわらず、尿酸濃度は変化しなかったと推察できる。

パントテン酸・CoA 生合成に関わる物質のうち今回検出されたのは AMP、パントテン酸、システインであり、そのうち増加していたのはパントテン酸、減少傾向がみられたのは AMP (P=0.05) であった (Fig.1)。今回は関連物質の同定数が少なく、また、AMP やシステインは他の代謝系でも用いられているので、どのような代謝変化が生じていたかは不明である。

本試験の結果から、OVX ラットにおいて Mg 欠乏は腓腹筋のペントースリン酸経路、プリン代謝経路、パントテン酸・CoA 生合成経路に影響を及ぼす可能性が示唆された。一方、本試験では、Mg 欠乏が各代謝経路に関連する物質濃度に及ぼす影響のみを検討しているため、Mg 欠乏によってどのように上記の代謝経路が変化するのかが明瞭ではない。今後は、各代謝経路に関連する酵素活性などを併せて検討する必要がある。また、OVX はグルコース代謝

やタンパク質代謝に影響を及ぼすことが知られている<sup>13,14)</sup>。本試験では、これらの代謝に対する OVX と Mg 欠乏の相互作用は不明である。この相互作用についてもさらに検討を行う必要がある。

## 参考文献

- 1) Nielsen FH (2010) Magnesium, inflammation, and obesity in chronic disease. *Nutr Rev* 68: 333-340.
- 2) Hata A, Doi Y, Ninomiya T, Mukai N, Hirakawa Y, Hata J, Ozawa M, Uchida K, Shirota T, Kitazono T, Kiyohara Y (2013) Magnesium intake decreases Type 2 diabetes risk through the improvement of insulin resistance and inflammation: the Hisayama Study. *Diabet Med* 30: 1487-1494.
- 3) Heggtveit HA (1969) Myopathy in experimental magnesium deficiency. *Ann N Y Acad Sci* 162: 758-765.
- 4) 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.
- 5) Shigematsu M, Nakagawa R, Tomonaga S, Funaba M, Matsui T (2016) Fluctuations in metabolite contents in the liver of magnesium-deficient rats. *Br J Nutr* 116: 1694-1699.
- 6) Voma C, Barfell A, Croniger C, Romani A (2014) Reduced cellular Mg<sup>2+</sup> content enhances hexose 6-phosphate dehydrogenase activity and expression in HepG2 and HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* 548: 11-19.
- 7) Dørup I, Clausen T (1991) Effects of magnesium and zinc deficiencies on growth and protein synthesis in skeletal muscle and the heart. *Br J Nutr* 66: 493-504.
- 8) Astier C, Rock E, Lab C, Gueux E, Mazur A, Rayssiguier Y (1996) Functional alterations in sarcoplasmic reticulum membranes of magnesium-deficient rat skeletal muscle as consequences of free radical-mediated process. *Free Radic Biol Med* 20: 667-674.
- 9) Furutani Y, Funaba M, Matsui T (2011) Magnesium deficiency up-regulates MyoD expression in rat skeletal muscle and C2C12 myogenic cells. *Cell Biochem Funct* 29: 577-581.
- 10) Matsui T, Kobayashi H, Hirai S, Kawachi H, Yano H (2007) Magnesium deficiency stimulated mRNA expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in skeletal muscle of rats. *Nutr Res* 27: 66-68.
- 11) Kotani M, Kim KH, Ishizaki N, Funaba M, Matsui

- T (2013) Magnesium and calcium deficiencies additively increase zinc concentrations and metallothionein expression in the rat liver. *Br J Nutr* 109: 425-432.
- 12) Spear LP, Heyser CJ (1993) Is use of a cellulose-diluted diet a viable alternative to pair-feeding? *Neurotoxicol Teratol* 2: 85-89.
  - 13) Saengsirisuwan V, Pongseeda S, Prasannarong M, Vichaiwong K, Toskulkao C (2009) Modulation of insulin resistance in ovariectomized rats by endurance exercise training and estrogen replacement. *Metabolism* 58: 38-47.
  - 14) Tagliaferri C, Salles J, Landrier JF, Giraudet C, Patrac V, Lebecque P, Davicco MJ, Chanet A, Pouyet C, Dhaussy A, Huertas A, Boirie Y, Wittrant Y, Coxam V, Walrand S (2015) Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *Eur J Nutr* 54: 1139-1149.
  - 15) National Research Council (US) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition (1995) *Nutrient Requirements of Laboratory Animals: Fourth Revised Edition, 1995*. Washington DC
  - 16) Lai Z, Tsugawa H, Wohlgemuth G, Mehta S, Mueller M, Zheng Y, Ogiwara A, Meissen J, Showalter M, Takeuchi K, Kind T, Beal P, Arita M, Fiehn O (2018) Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics. *Nat Methods* 15: 53-56.
  - 17) Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J (2018) *MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis*. *Nucleic Acids Res* 46: 486-494.
  - 18) Sanchez-Morito N, Planells E, Aranda P, Llopis J (2000) Influence of magnesium deficiency on the bioavailability and tissue distribution of iron in the rat. *J Nutr Biochem* 11: 103-108.
  - 19) Tashiro M, Inoue H, Konishi M (2013) Magnesium homeostasis in cardiac myocytes of Mg-deficient rats. *PLoS One* 8: e73171.
  - 20) Martindale L, Heaton FW (1964) Magnesium deficiency in the adult rat. *Biochem J* 92: 119-126.
  - 21) Dørup 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.
  - 22) Wagner KR, Kauffman FC, Max SR (1978) The pentose phosphate pathway in regenerating skeletal muscle. *Biochem J* 170: 17-22.
  - 23) Hartwig A (2001) Role of magnesium in genomic stability. *Mutat Res* 475: 113-121.
  - 24) Saksela M, Lapatto R, Raivio K.O (1998) Xanthine oxidoreductase gene expression and enzyme activity in developing human tissues. *Biol Neonate* 74: 274-280.