

제주용암해수의 배양액 첨가가 L6 근육세포 포도당수송 활성에 미치는 영향

마건정¹, 김수정¹, 박덕배²

¹제주대학교 의학전문대학원 의학과, ²조직학교실

(Received May 15, 2017; Revised May 22, 2017; Accepted May 29, 2017)

Abstract

Effect of Supplementation of Jeju Magma Seawater on Glucose Transport in Cultured L6 Skeletal Muscle Cells

Gun Jung Ma¹, Soo Jung Kim¹, Deok Bae Park²

¹Department of Medicine, ²Laboratory of Histology, Jeju National University School of Medicine

Magma seawater, the underground seawater in Jeju island, contains abundant minerals. Previous studies have suggested the beneficial effect of deep seawater on hyperlipidemia and cardiovascular diseases. We investigated the in vitro effect of magma seawater on the glucose transport by skeletal muscle cells, a key regulatory mechanism to maintain blood glucose levels. Stepwise supplementation of magma seawater (898–1,898 of hardness) to the cell culture medium did not affect the viability of L6 myoblasts. In differentiated L6 skeletal muscle cells, the supplementation of magma seawater elevated the basal- and insulin-induced glucose transport into cells. Akt and AMPK, insulin-dependent and -independent signaling pathways to lead glucose transport respectively, were stimulated by the supplementation of magma seawater to the culture medium. Taken together, magma seawater of Jeju has a physiological potential to maintain body glucose homeostasis. (*J Med Life Sci* 2017;6(1):23–28)

Key Words : Magma seawater, glucose transport, skeletal muscle cells

서 론

용암해수는 바닷물이 제주도 화산 암반층에 의해 자연적으로 여과되면서 육지 지하로 흘러들어온 해수로 특히 동부지역은 연안으로부터 최대 8 km까지 내륙으로 흘러들어와 있는데 그 이유는 동부지역은 평균 해수면 하부에 투수성이 양호한 균질 지층이 넓고 두껍게 분포되어 있어서 해수의 압력에 의해 바닷물이 내륙 쪽으로 쉽게 유입될 수 있기 때문이다. 용암해수의 수질은 일일/계절변동 및 물리적특성 변화가 적고, 안정성을 확보하고 있어 지속적 개발이 가능하다. 수온, pH, 염분 등 연중 변동이 거의 없고 제주도 현무암에 의해 자연 여과되어 병원균 및 오염물질 등이 검출되지 않는 청정한 수자원이라고 볼 수 있다¹⁾.

용암해수는 화산암반층에서 유래되는 미네랄 성분을 다량 함유하고 있는데, 염도가 매우 높아서 역삼투압(reverse osmosis, RO) 또는 전기투석(electrodialysis, ED) 방식을 사용하여 대부분의 염분을 제거하고 상대적으로 다른 미네랄의 농도를 올릴 수 있다. 이렇게 두 가지 방식으로 생성된 물을 적절하게 사용하면 염분이 많이 제거된 고농도의 미네랄 수를 다양하게 만들 수 있다. 일반해수, 해양심층수 및 용암해수는 모두 해수를 기원으로 하기 때문에 나트륨(Na), 마그네슘(Mg), 칼슘(Ca) 등의 미네랄 함량이 높고 그 함량도 비슷한데, 특히 용암해수는 화산 암반에서 유래한 유용 미네랄(바나듐, 셀레늄, 게르마늄 등) 성분이 다른 해수보다 높은 편이다²⁾. 용암해수와 미네랄 성분이 유사한 해양 심층수는 이전의 연구들에서 고지혈증, 동맥경화 또는 심혈관질환과 관련한 유익한 활성을 나타낼 수도 있다는 가능성이 제안되기도 하였다³⁻⁴⁾. 또한 미네랄 성분 중 칼슘과 마그네슘은 비만과 동맥경화, 당뇨병을 예방하는 효과가 있다는 연구결과들도 있다⁵⁻⁶⁾.

본 연구에서는 제주 용암해수에 포함되어 있는 여러 미네랄 성분들이 당뇨병의 예방에 영향을 미칠 수 있는지를 규명하기

Correspondence to : Deok Bae Park
Department of Histology, Jeju National University School of Medicine, 15, Aran 13gil, Jeju-si, Jeju Special self-governing province, 63241, Republic of Korea
E-mail : parkdb@jejunu.ac.kr

Two authors (Gun Jung Ma and Soo Jung Kim) contributed equally to this work.

위한 하나의 방법으로, 제주 용암해수의 세포배양액 첨가가 혈중 포도당농도 조절에 가장 중요한 역할을 하는 근육세포의 포도당 수송에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 연구에서는 흰쥐의 골격근 세포주인 미분화 L6 근육모세포(myoblast)를 세포주은행(서울)로부터 공여받아 사용하였다. 세포는 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 Dulbecco's Minimal Essential Medium (D-Mem) 배양액을 사용하였으며 5% CO₂ 및 37°C가 유지되는 배양기에서 배양하였다. 세포(L6 myoblast)는 T75 배양용기에서 배양된 후 우태아혈청이 2% 포함된 배양액에서 6-8 일 동안 배양하여 L6 근육세포(myotube)로의 분화과정을 거친 뒤에 Dulbecco's phosphate-buffered saline (D-PBS)로 2회 세척한 후 실험에 사용하였다.

MTT assay

세포독성 또는 세포의 생존능의 지표인 mitochondria의 활성을 측정하기 위하여 MTT 측정법을 사용하였다. 시료의 처리가 끝난 뒤 세포배양액과 동량의 MTT reagent(1 mg/ml in D-PBS)를 섞어 37°C에서 30분 동안 더 배양한 후 상층액을 제거하고 200 µl isopropanol을 넣어 발색반응을 유도하였으며 흡광도는 570-690nm에서 측정하였다.

포도당수송 활성 측정

24-well 배양접시에 성장이 70-80% 정도 완료된 L6 근육모세포를 2% 우태아혈청이 포함된 배양액에서 6-8일 동안 배양하여 L6 근육세포(myotube)로 분화시켰다. 이후 포도당이 1g/L 농도로 포함된 D-Mem으로 배양하면서 여러 가지 실험처리조건에서의 배양액내 잔여 포도당농도를 측정하여 최초 배양시점 대비 감소한 포도당의 양을 L6 근육세포 내로 이동한 포도당수송 활성의 지표로 삼았다. 배양액내 포도당 농도는 glucose oxidase 활성을 이용한 측정키트(Asan Pharm., Korea)를 사용하여 측정하였다.

전기영동 및 Western blot 분석

배양이 끝난 세포를 직접 5%의 2-mercaptoethanol을 포함한 cell lysis buffer(7)에 녹여 균질화시켰다. 70°C에서 10분간 가열하고 4-20%의 polyacrylamid gel에 전기영동하고 poly(vinylidene

difluoride)(PVDF)에 흡착시켰다. PVDF membrane을 blocking buffer(Tris-buffered saline-0.1%(w/v) Tween-20) (TBS-T)으로 상온에서 1시간동안 반응시키고 난 뒤 여러 가지 1차항체(1:1000-1:3000)가 들어있는 TBS-T에서 1시간(25°C) 또는 16시간(4°C)동안 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 HRP-conjugated 2차 항체와 상온에서 30분 반응시킨 뒤 Enhanced Chemiluminescence(ECL) 방법으로 각 band의 영상을 얻었다.

통계분석

대조군과 실험군 사이의 통계적 유의성은 student's t-test를 사용하였고 p 수치가 0.05 이하일 경우 통계적 유의성을 부여하였다.

결과

용암해수의 배양액첨가가 분화전 근육모세포의 생장에 미치는 영향

전기투석을 거친 탈염용암수(electrodialyzed seawater, EDSW)는 경도가 6,000 정도로서 대부분 칼슘과 마그네슘의 함유량을 표시하며 생체에 다량 흡수될 경우 체액의 삼투압에 영향을 미쳐 여러 가지 세포독성의 부작용이 초래될 수 있다. 수용액의 경도는 칼슘과 마그네슘의 함량을 나타내는 지표로서 [칼슘(mg/L)+마그네슘(mg/L)] x 4.1의 공식으로 산출된다. 따라서, 탈염용암수를 단계적으로 희석하여 저경도-고경도 구간의 세포배양 조건들이 세포의 성장 또는 생존성에 미치는 영향을 비교하였다. 이를 위하여 세포증식 활성이 있는 근육모세포(L6 myoblast)를 저밀도-고밀도 세포 수 배양조건에서 서로 다른 경도의 용암수들이 미치는 효과를 4일간 배양하여 MTT 활성을 측정하였다 (Figure 1). MTT 활성은 생존해 있는 세포의 수를 간접적으로 나타내므로 세포증식을 촉진하는 지, 또는 증식이 포화상태에 이른 세포의 생존성에 영향을 미치는 지에 대한 지표를 나타낸다.

L6 근육모세포를 저밀도(A), 중밀도(B), 고밀도(C)로 배양접시에 정착한 후 배양액내 경도의 차이에 따라 어떤 변화가 일어나는지를 조사한 결과, 미약하게 경도-의존적으로 세포의 증식을 촉진(A)하거나 세포의 생존성을 증가(B, C)시키는 현상을 발견하였다. 이러한 결과는 체외 배양조건에서 근육모세포는 최대 약 3,000 정도의 고경도에서 유의할 만한 직접적 세포독성을 나타내지는 않는다는 사실을 보여준다. 그러나 생체 내에서는 신장세포, 혈관내피세포 등 삼투압이나 특정 미네랄에 민감하게 반응하는 다른 세포들이 혼재하고 있기 때문에 실제로는 체외배양 조건보다는 적절한 경도 구간이 상대적으로 낮을 것이라고 판단된다.

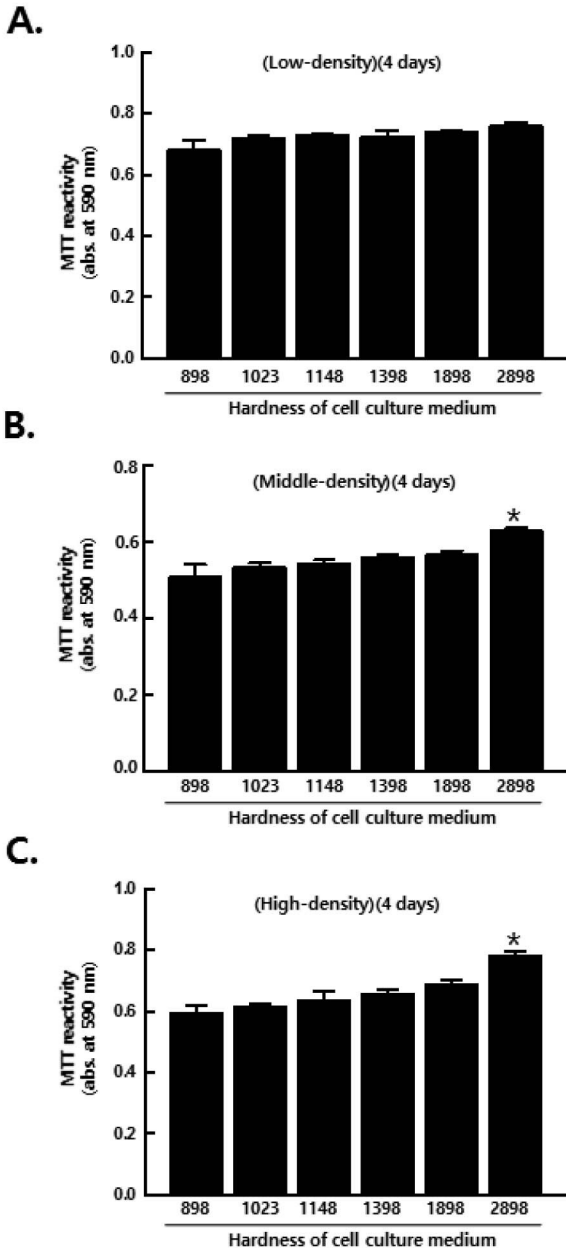


Figure 1. Effect of magma seawater on the viability of undifferentiated L6 myoblasts. L6 myoblasts were plated with different densities (low-A, medium-B, high-C) and incubated for 4 days in a serum-free DMEM with different hardness by magma seawater supplementation. Data represent the mean \pm SE (n=4). *P<0.05, significantly different from the control (898 of hardness).

용암해수의 배양액첨가가 분화 근육세포(myotube)의 포도당 흡수 활성에 미치는 영향

생체에서는 식후 포도당의 혈중농도가 증가하면 췌장베타세포에서의 인슐린분비가 증가하고 근육, 지방, 간세포 조직에서는 인슐린의 작용으로 여분의 포도당 흡수를 촉진하는 동시에 간세포에서 기저 포도당신생을 억제하므로써 다시 혈중 포도당 농도를 정상적으로 회복시킨다. 당뇨병의 경우, 근육(지방, 간)에서의 인슐린의존성 포도당흡수가 저해되어 있고, 동시에 간세포에서 지속적으로 포도당을 생산하기 때문에 만성적인 고혈당이 유지된다. 따라서 인슐린의존적, 또는 비의존적으로 포도당흡수를 촉진할 수 있는 생리활성 소재의 발굴은 당뇨병 치료제의 개발을 위한 첫 번째 단계의 시도이다. 본 연구에서는 서로 다른 경도의 용암수가 근육세포에서 포도당흡수를 촉진하는 지의 여부를 조사하였다. L6 근육모세포(myoblast)를 저혈청(2%) 배지에서 4일 이상 배양하면서 근육세포(myotube)로 분화하도록 유도한 후 포도당흡수 활성실험에 사용하였다 (Figure 2).

배양액내 경도구간은 898 (기본배양액) - 1,898/2,898 세 가지로 구분하였고, 단독 또는 인슐린과 병용하였다. 경도 2,898의 배양조건에서 2시간 배양 후 대조군(898)에 비해 약 40%의 포도당흡수가 증가하였고, 인슐린(10 nM)에 의한 포도당흡수도 미약하게나마 증진되었다. 이러한 결과는 용암수의 미네랄 성분들 중 인슐린과 상관없이 단독으로 포도당흡수를 촉진하는 요소들이 있을 가능성을 보여준다. 즉, 용암수가 항당뇨활성을 가진 기본소재 또는 다른 유효활성소재와의 융합을 위한 소재로서 활용될 수 있을 것으로 보여진다.

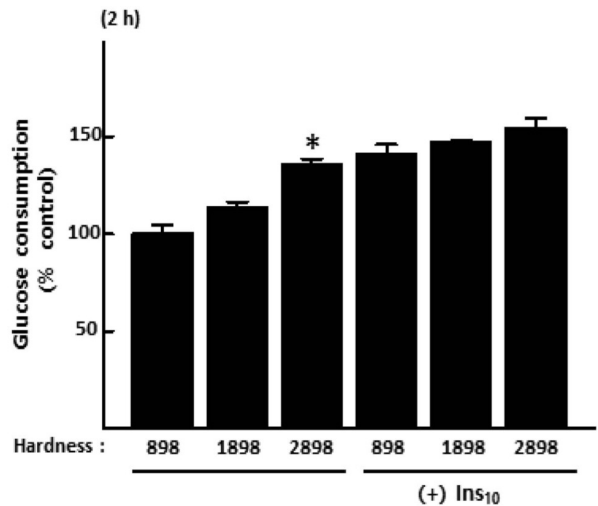


Figure 2. Stimulatory effect of magma seawater on glucose transport in skeletal muscle cells. Differentiated L6 myotubes were preincubated in a serum-free DMEM overnight and further incubated for 2 h in a fresh serum-free DMEM with different hardness by magma seawater supplementation in the absence or presence of 10 nM insulin. Data represent the mean \pm SE (n=4). *P<0.05, significantly different from the control (898 of hardness).

용암해수의 배양액 첨가가 L6 분화 근육세포에서 포도당흡수 활성관련 세포신호전달에 미치는 영향

근육세포에는 인슐린의존적-, 비의존적으로 포도당흡수를 촉진하는 세포내 신호전달단백질 체계가 존재한다. 근육세포의 세포막에서 인슐린수용체가 인슐린과 결합하면 인슐린수용체의 티로신(tyrosine) 잔기들에서 자가인산화(autophosphorylation)가 활성화되고 단계적으로 인슐린수용체기질(insulin receptor substrates), PI3 kinase, protein kinase B (=Akt)의 인산화 및 활성화가 이어져 궁극적으로 포도당수송체(glucose transporter)가 세포막으로 이동하여 포도당이 세포막을 통해 세포질 안쪽으로 들어온다. 이들 신호전달단백질의 인산화를 측정하는 것은 인슐린의존성 포도당수송의 생화학적 지표이며 이들 중 PKB(Akt)의 serine부위 인산화의 측정이 가장 널리 사용된다. 또 한편으로는 인슐린비의존적으로 포도당수송을 증진하는 효소인 AMP-activated protein

kinase(AMPK)의 인산화 측정도 광범위하게 사용된다. 본 실험에서도 서로 다른 경도 조건에서 이들 효소단백질들의 인산화 변화를 측정하였다. 이를 위하여 인산화단백질에 특이하게 결합하는 항체를 사용한 면역측정법(immunoblot assay)을 활용하였다 (Figure 3). L6 근육세포를 24시간 배양하였을 때 경도 2,898 배양군에서 포도당수송을 증진하는 두 효소 Akt와 AMPK의 기저인산화가 증가하였다 (Figure 3A). 다음으로는 인슐린의 농도를 저농도-고농도로 변화시키면서 배양액의 경도차이가 어떤 변화를 가져오는 지를 비교 하였는데 인슐린의 처리로 증가하는 Akt, AMPK, ACC 단백질의 인산화가 배양액내 고경도(2,898) 용암수에 의해 부가적으로 더욱 증가하는 현상이 발견되었다(Figure 3B). 이러한 사실은 용암수내 미네랄 성분(들)은 포도당수송과 관련된 단백질의 기저활성을 증가시키므로서 인슐린의 효과를 더욱 증강시키는 효능을 가지고 있다는 사실을 의미한다.

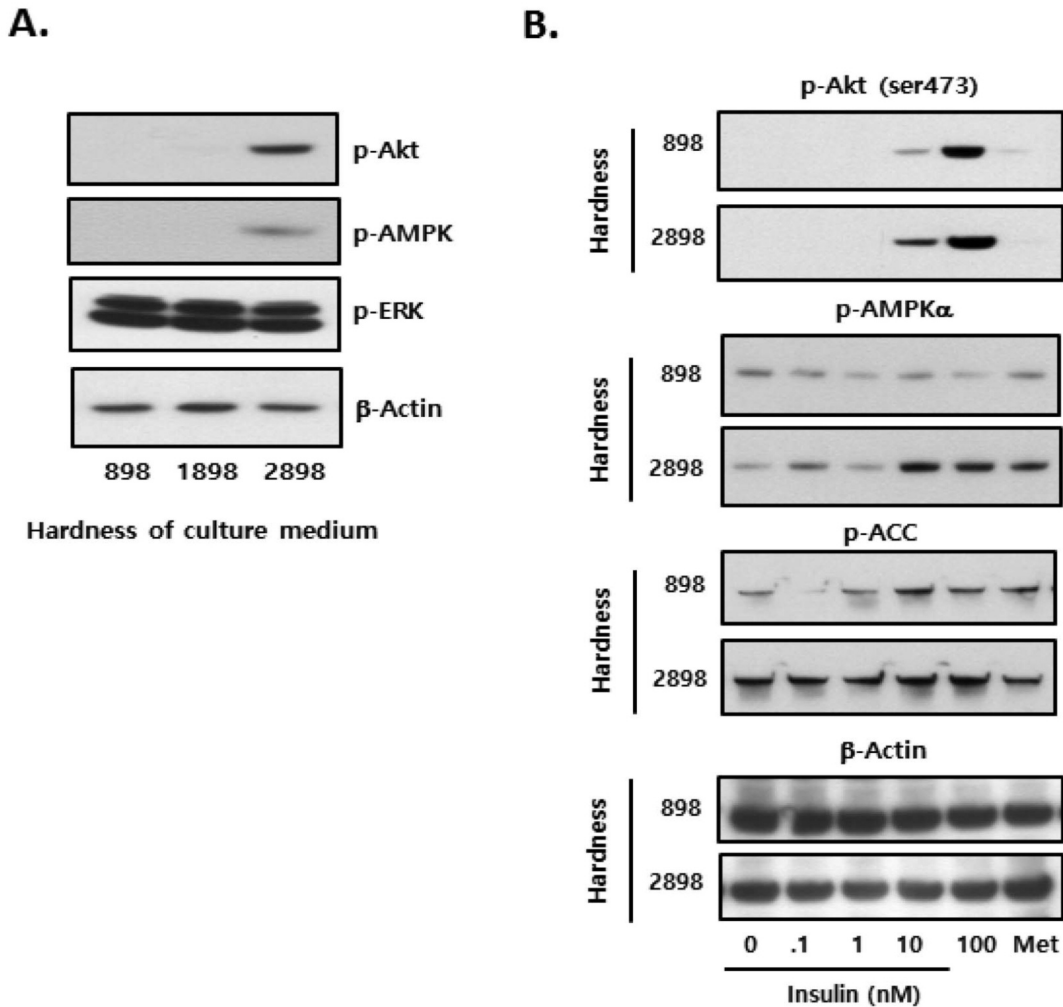


Figure 3. Stimulatory effect of magma seawater on Akt and AMPK, two signaling proteins involved in the glucose transport in skeletal muscle cells. Differentiated L6 myotubes were preincubated in a serum-free DMEM overnight (A) in a fresh serum-free DMEM with different hardness by magma seawater supplementation, or treated with insulin (0-100 nM) or metformin (2 mM) for an additional 4 h (B). After treatments, cells were homogenized and subjected to the electrophoresis and immunoblot analysis.

고찰

제2형 당뇨병(Type II Diabetes Mellitus, T2DM)은 인슐린저항성, 고혈당, 단계적인 췌장베타세포의 기능저하들과 같은 증상을 수반하여 궁극적으로는 신경, 신장, 망막에서의 병증과 케토산혈증과 같은 당뇨합병증이 복합적으로 발생하여 생명을 위협하는 위험한 질병으로서 T2DM을 예방하거나 치유하기 위한 기본적 방법은 혈중 포도당 농도를 일정하게 유지하도록 하는 것이다⁸⁾. 이를 위해서 근육이나 지방조직, 간으로의 포도당흡수가 효율적으로 이루어져 말초혈액 내 포도당농도를 일정한 범위 내에서 유지되도록 하는 약제들이 사용되고 있으나 보다 근본적으로는 약제의 처방에 앞서 생활습관이나 섭식의 조절, 영양의 균형 등을 통해 기저 포도당수준이 유지되도록 하는 것이 당뇨병의 발병을 방지할 수 있는 좋은 방법이다. 당뇨병 발병이후 치료약제의 사용은 저혈당, 체중변화, 부종, 소화장애 등과 같은 부작용을 일부 가져올 수 있으므로⁹⁾ 이러한 부작용을 최소화할 수 있는 대체수단, 예를 들면 식용천연물의 추출성분이나 이들로부터 얻은 특정 분획들을 당뇨병의 예방이나 기존약제의 보완수단으로 발굴하는 노력들이 여러 방면에서 활발히 진행 중이다¹⁰⁾. 이러한 다양한 시도들 중 하나로서 일반해수에 비해 칼슘, 마그네슘, 아연, 바나듐 등 생리활성 증진과 관계되는 여러 미네랄들이 상대적으로 다량 포함되어 있는 해양심층수(deep-sea water)를 이용하여 고지혈증이나 고혈압¹¹⁾, 동맥경화¹²⁾ 등과 같은 대사성질환을 예방하거나 질환의 진행을 늦추도록 하는 수단의 하나로 개발하고자 하는 연구들이 수행되어 왔다. 또한 해양심층수에 고농도로 존재하는 칼슘과 마그네슘이 비만이나 당뇨의 예방 또는 개선과 관련된 생리활성을 증진시킨다는 연구결과도 있다^{6, 13)}.

제주의 용암해수는 기본적으로 함유미네랄의 조성이 해양심층수와 유사하거나 일부 미세미네랄의 함량이 상대적으로 높은 특성을 갖고 있다. 또한 해양심층수에 비해 취수가 쉽고 오랜 기간 동안 제주 지하현무암층에 저장되어 안전하고 안정된 생물학적 안전성이 보다 높은 수자원인데, 기존의 해양심층수를 대상으로 하는 연구에 비해 선행연구결과들이 대단히 부족하다. 따라서 용암해수를 다양한 방법으로 활용하여 인체나 세포의 생리활성에 어떤 영향을 미치는지를 조사, 분석하는 것은 매우 시급하며 필수적인 접근이다. 따라서 본 연구에서는 용암해수의 기본물성에 관한 데이터를 바탕으로 첫째, 용암해수 성분이 세포의 생존에 영향을 미치는지(세포독성), 둘째, 체내 포도당수송에 가장 큰 기여를 하는 골격근세포에 의한 포도당흡수 기능에 영향을 미치는지, 셋째, 만약 포도당흡수를 증진시킨다면 골격근세포의 생화학적 반응(신호전달)을 자극하는 지를 분석하고자 하였다.

배양중인 세포는 실제로 인체내에서 생존하거나 성장하는 세포를 모사(mimicking)하는 실험모델로서 배양중인 세포의 생존이나 성장에 변화가 온다는 것은 인체 내에서도 유사한 변화를 가져올 수 있다. 세포의 생존/생장을 위해서는 적절한 영양성분의 균형, 산-염기의 평형, 삼투압의 유지 등이 필요한데, 용암해수의 생리활성과 관련하여 세포배양액에 일시적인 삼투압의 증가가 과연 세포의 생존/생장에 어떤 영향을 미치는가에 대한 고찰

은 이후 계속 이어지는 생리활성의 분석에 앞서 선행되어야 한다. 본 실험에서는 배양액의 경도가 898-2,898의 범위로 변화하였을 때 미분화 L6 근육세포의 생존/생장에 미치는 효과를 비교하였다. 그 결과, 여러 가지 배양조건(세포의 배양밀도, 기간)을 달리하였을 때 저경도-고경도 배양조건의 변화가 세포의 생존에 어떠한 독성도 나타내지 않았으며 오히려 고경도 조건(2,898)에서 배양세포의 수가 증가하는 결과를 보여, 최소한 용암해수의 첨가 자체가 최소한 2,898 정도 이내 수준에서는 어떠한 세포독성도 가져오지 않는 생물학적 안전성(biological safety)을 가지고 있다는 사실을 확인할 수 있었다. 이는 고염수의 경우 과도한 나트륨과 칼륨의 농도가 세포막의 삼투안정성을 위협하여 세포독성을 나타낼 수 있음에 비해 나트륨-칼륨에 비해서는 상대적으로 낮은 마그네슘-칼슘은 일정 농도 구간에서는 세포에 해롭지 않을 것이라는 사실을 보여준다.

이러한 결과를 바탕으로 분화가 끝난 L6 골격근세포에서 용암해수의 배양액 첨가가 기저- 또는 인슐린의존성 포도당흡수에 영향을 미치는 지를 분석하였는데 배양액에 용암해수를 첨가하여 경도 898-2,898로 조정된 뒤 포도당이 세포 내로 얼마나 이동하였는 지를 측정하였다. 2시간 동안 세포내로 이동한 포도당의 양은 경도-의존적으로 기저(인슐린제외의 배양액) 또는 인슐린의존성 포도당 흡수를 증가시켰다. 이러한 결과는 용암해수의 함유성분(마그네슘-칼슘 포함)들이 그 자체만으로도 포도당흡수를 자극하여 배양액 안의 포도당 농도를 낮추었음을 의미하며 실제로 인체 내에서 골격근육으로의 포도당흡수를 자극하여 혈중 포도당 농도를 낮추는데 기여할 수 있다는 가능성을 보여준다. 골격근 세포에서 포도당흡수활성이 증가하는 것은 인슐린의존- 또는 비의존적인 반응을 통해 이루어지는데 그러한 반응들을 보여주는 지표의 예는 세포내 Akt (인슐린의존) 및 AMPK (인슐린 비의존) 두 단백질의 활성이 증가하는 것을 포함한다. 본 실험에서는 용암해수의 첨가가 Akt 활성과 AMPK 활성을 동시에 자극하는 결과를 보였는데, 이는 용암해수 함유성분이 위 두가지 반응에 모두 참여하여 포도당흡수를 자극하는 활성을 가지고 있을 것이라는 사실을 보여주는 것이다.

본 연구의 결과, 제주 용암해수는 이미 알려진 해양심층수의 활성과 유사하게, 혈중 포도당을 낮추므로써 당뇨병을 예방하거나 질환의 진행을 지연시킬 수 있는 생리활성 소재의 하나로 활용가능성을 확인하였고 세포수준에서의 안전성과 기본적인 작동 기전을 확인하였다.

참고문헌

- 1) Noh JR, Gang GT, Kim YH, Yang KJ, Lee CH, Na OS, et al. Desalinated underground seawater of Jeju Island (Korea) improves lipid metabolism in mice fed diets containing high fat and increases antioxidant potential in t-BHP treated HepG2 cells. *Nutr Res Pract* 2010;4:3-10.
- 2) Kim BY, Lee YK, Park DB. Metabolic Activity of Desalted Ground Seawater of Jeju in Rat Muscle and

- Human Liver Cells. *Fish Aquat Sci* 2012;15:21–27.
- 3) Miyamura M, Yoshioka S, Hamada A, Takuma D, Yokota J, Kusunose M, et al. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1784–7.
 - 4) Katsuda S, Nakagawa K, Miyake M, Yamasaki M, Katahira K, Mohri M, et al. Deep-seawater improves cardiovascular hemodynamics in Kurosawa and Kusanagi-Hypercholesterolemic (KHC) rabbits. *Biol Pharm Bull* 2008;31:38–44.
 - 5) Bloomgarden ZT. Magnesium deficiency, atherosclerosis, and health care. *Diabetes Care* 1995;18:1623–7.
 - 6) Robertson DS. Magnesium or calcium hypophosphite could be a treatment for obesity in humans. *Med Hypotheses* 2006;66:439–40.
 - 7) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680–5.
 - 8) Tahrani AA, Piya MK, Kennedy A, Barnett AH. Glycaemic control in type 2 diabetes: Targets and new therapies. *Pharmacol Ther* 2010;125:328–361.
 - 9) Moller DE. New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 2001;414:821–7.
 - 10) Liu Q, Chen L, Hu L, Guo Y, Shen X. Small molecules from natural sources, targeting signaling pathways in diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:854–865.
 - 11) Sheu MJ, Chou PY, Lin WH, Pan CH, Chien YC, Chung YL et al. Deep sea water modulates blood pressure and exhibits hypolipidemic effects via the AMPK-ACC pathway: An in vivo study. *Mar Drugs* 2013;11:2183–2202.
 - 12) Miyamura M, Yoshioka S, Hamada A, Takuma D, Yokota J, Kusunose M et al. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1784–7.
 - 13) Hwang HS, Kim HA, Lee SH, Yun JW. Anti-obesity and antidiabetic effects of deep sea water on ob/ob mice. *Mar Biotechnol* 2009;11:531–9.