

노화와 운동이 백서의 항산화 유전자 발현에 미치는 영향

분당서울대학교병원 내과¹, 서울의대 내과학교실², 연세대학교 노화과학대학원³, 국립암센터⁴, 분당서울대학교병원 재활의학과⁵

조봉준^{1,3} · 김준태¹ · 이유진⁴ · 유성훈^{1,2} · 최성희^{1,2} · 임 수^{1,2} · 임재영⁵ · 장혁재^{1,2} · 박영주^{1,2} · 장학철^{1,2}

Alteration of Antioxidant Enzyme Gene Expression with Aging and Exercise in Fisher Rats

Bong Jun Cho, M.S.^{1,3}, Jun-Tae Kim, M.S.¹, You Jin Lee, M.D.⁴, Sung Hoon Yu, M.D.^{1,2},
Sung Hee Choi, M.D.^{1,2}, Soo Lim, M.D.^{1,2}, Jae-Young Lim, M.D.⁵, Hyuk Jae Chang, M.D.^{1,2},
Young Joo Park, M.D.^{1,2}, Hak Chul Jang, M.D.^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

²Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

³Graduate Program in Science of Aging, Graduate School, Yonsei University, Seoul, Korea

⁴Thyroid Cancer Clinic, National Cancer Center, Goyang, Korea

⁵Department of Rehabilitation Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, Korea

Background: It has been reported that radical oxygen species (ROS) production increased drastically during ageing. This increase in ROS had negative effects on many age-related diseases. In this study, we investigated the effects of ageing and exercise on antioxidant gene expression in Fisher rats and the mechanism of chronic exercise on ROS generation related to ageing.

Methods: After a standard diet, young and old male Fischer rats were assigned to sedentary control groups (young control group: YC, old control group: OC) and exercise training groups (young exercised group: YE, old exercised group: OE). After a 12-week treadmill exercise training in the exercise training groups, antioxidant gene expression (catalase, glutathione peroxidase) in the liver and muscle was measured by RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction).

Results: Liver catalase mRNA expression was lower in the old group compared with that in the young group. However, this remained unchanged post-exercise. Liver glutathione peroxidase mRNA expression was not different between the young and old groups and remained unchanged in both these groups. The expression of catalase mRNA in the soleus muscle was significantly lower in the old control rats compared with that in the young rats. Exercise significantly increased catalase mRNA expression in the soleus in both the young and old rats. The expression of glutathione peroxidase mRNA in the soleus was lower in the old control rats than in the young. Exercise significantly increased glutathione peroxidase mRNA expression in both young and old rats.

Conclusion: This study showed that chronic exercise could be an important contributor to the recovery in the decline of certain antioxidant gene expressions in both young and aged rats. Long-term exercise may positively affect metabolic diseases by modulating antioxidant gene expression.

Key Words: Aging, Exercise, Reactive Oxygen Species (ROS), Catalase, Glutathione peroxidase

접수: 2008년 6월 21일 승인: 2008년 9월 11일

Address for correspondence: Hak Chul Jang, M.D., Ph.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University

Bundang Hospital, 300 Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam

463-707, Korea

Tel: 82-31-787-7005, Fax: 82-31-787-4052

E-mail address: janghak@snu.ac.kr

*본 연구는 대한노인병학회 연구비(2007) 지원과 한국과학재단 연구비 (M10642140004-06N4214-00410 to H.C.J.) 지원을 통해 이루어 졌음.

서론

노화가 진행되면 특별한 질환이 없어도 쉽게 무기력해 지며, 외부 자극에 대한 반응이 줄어들어 일상생활에 어려움을 겪게 된다. 이러한 노화에 따른 쇠약(fragility)의 원인으로 근감소증(sarcopenia)이 중요한 인자로 대두되고 있다¹⁾. 그러므로, 노인에서 이러한 근육의 감소 및 기능의

쇠되, 즉 근감소증과 연관되는 기전을 밝히는 연구^{2,3)}가 많은 관심을 모으고 있다. 최근 연구 결과에 따르면 근감소증과 이와 연관된 대사 이상의 중요한 원인의 하나로 조직에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species)이 거론되고 있다²⁾. 활성산소종에 의한 산화 스트레스의 방어 기전으로 항산화방어 물질과 항산화효소가 있으며, 항산화효소의 종류에는 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 등이 있다. SOD는 superoxide radical을 과산화수소(H₂O₂)와 산소(O₂)로 변환을 촉매한다. 이때 생성된 과산화수소는 peroxisome에 존재하는 catalase와 세포질에 풍부한 glutathione peroxidase에 의해서 가수분해된다. 대부분의 동물세포들은 두 가지의 SOD, 즉 세포질의 Cu, Zn-SOD와 미토콘드리아의 Mn-SOD를 가지고 있으며, glutathione peroxidase는 이러한 반응에서 glutathione을 조효소로 이용하며 세포질 내에 존재하는 대부분의 과산화수소를 가수분해 시킨다. Glutathione peroxidase는 지질의 과산화에 대하여 세포막을 지키는 주요한 효소로서 이는 환원된 glutathione이 세포막 지질에 전자를 공여함으로써 세포막 지질이 환원된 상태를 유지할 수 있기 때문이다⁴⁾. 이와 더불어 활성산소종에 의한 세포 내 미토콘드리아의 기능이 감소 됨에 따라 근육의 기능 저하 및 근감소증 등이 가속화되는 것으로 알려져 있다. 근육의 노화 및 근감소증 예방에 운동이 효과적인 것으로 보고되었고, 특히 장기적인 유산소운동이 권장되고 있다⁵⁻¹¹⁾. 또한 운동 효과 기전의 하나로 산화활성의 변화가 제시되고 있다^{12,13)}. 그러나, 아직까지 운동이 노화 개체의 활성산소종을 조절하는 항산화 기전에 미치는 영향에 대하여 확실하게 알려지지 않았다. 이에 저자들은 운동과 노화에 따라 대표적인 항산화 유전자인 catalase와 glutathione peroxidase의 발현에 차이가 있는지를 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 실험 동물

12주령과 88주령이 된 수컷 Fischer 344 백서(Samtako, Osan, Korea)를 구입하여 표준식이와 물을 공급하고, 주야 12:12시간 주기로 사육하였다. 실험동물은 실험실에서 1주일간의 적응기간을 가진 후, 실험시작 시점에 몸무게를 측정하고 무작위로 운동군과 대조군으로 나누었다. 또 노

화에 따른 변화를 평가하기 위하여 젊은군(12주령 쥐)과 노령군(88주령 쥐)으로 구별하였다. 운동군은 12주간의 답차운동(tread-mill)을 시행하였다. 본 연구는 분당서울대학교병원 동물실험위원회(Seoul National University Bundang Hospital, Institutional Animal Care and Use Committee)의 방침 및 범규에 따라 진행되었다.

2. 운동 방법

답차운동 전에 실험동물은 답차운동에 적응할 수 있도록 2주간 매일 10분씩 답차운동 기기(1004RVI Exer-4R Open Treadmill; Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)에서 걸거나 뛰도록 했다. 이후 노령운동군은 4 m/min의 속도로 하루에 20-30분, 주당 5회의 운동을 시작하여 12주 동안 점차 속도와 시간을 높여 최종적으로 15 m/min의 속도로 하루에 45-60분, 주당 5회의 운동을 수행하였다. 대조군은 이후 최대 운동능력을 측정을 위해 답차운동에 적응하도록 주 1회 10분간 답차운동 기기에서 걸거나 뛰도록 했다.

3. Catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현 측정

실험동물을 희생하여, 간과 근육을 적출한 후, 조직에서 mRNA를 추출한 이후에 역전사중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 시행하여 catalase와 glutathione peroxidase mRNA의 발현 정도를 측정하였다. RNA의 분리는 Qiagen RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하였고, RT-PCR은 NMLV-RT (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)를 사용하여 42°C에서 5분, 99°C에서 5분, 0-5°C에서 5분간 역전사 반응을 시켰다. 사용한 primer 염기 서열은 catalase (sense: 5'-gccttttgcctaccagacac-3', anti-sense 5'-ttacaggttagctttccctt-3'), glutathione peroxidase (sense: 5'-atgtctgctgctgctctcc-3', anti-sense: 5'-ttaggggttgctaggctctt-3')를 이용하였고, 결과는 2% agarose gel에 전기영동 장치를 사용하여 확인하였다.

4. 통계 분석

결과는 각 군 별로 평균±표준 오차로 표기 하였다. 각 군 사이의 결과를 비교하기 위해 unpaired two-sided Student's t-test를 사용하였다. P값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다. 통계 프로그램은

SPSS 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 사용하였다.

결 과

1. 백서의 간 조직에서 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현

백서의 간 조직에서 발현되는 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 양을 비교한 결과, 노령군(OC)에서 catalase의 발현이 젊은군(YC)에 비하여 감소되어 있었다(Fig. 1). 두 군 모두에서 운동 후 catalase mRNA 발현 정도는 운동 전과 비교하여 변화하지 않았다. Glutathione peroxidase의 mRNA는 젊은군(YC, YE)과 노령군(OC, OE)의 발현 정도의 차이는 없었으며, 운동 전후에도 차이가 없었다.

2. 백서의 가자미근에서의 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현

백서의 가자미근(soleus muscle)에서 발현되는 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현양을 확인한 결과

catalase의 경우 젊은군(YC)에 비하여 노령군(OC)에서의 발현이 유의적으로 감소하였다(YC vs. OC: 1.0 ± 0.09 vs. 0.77 ± 0.11 , $p=0.01$) (Fig. 2). 젊은군과 노령군에서 모두 운동 후 catalase mRNA 발현이 유의하게 증가하였으며(YC vs. YE: 1.0 ± 0.09 vs. 1.23 ± 0.04 , $p=0.05$; OC vs. OE: 0.77 ± 0.11 vs. 1.13 ± 0.07 , $p=0.05$), 특히 노령군(OE)에서 발현량의 증가가 많아서(YE/YC vs. OE/OC: 23% vs. 46%) 노령군에서 더 높은 증가 폭을 확인하였다. 운동 후의 catalase mRNA 발현 정도는 젊은군(YE)과 노령군(OE)에서 차이가 없었다(YE vs. OE: 1.23 ± 0.04 vs. 1.13 ± 0.07 , $p=0.34$). Glutathione peroxidase의 mRNA 발현 양상도 catalase의 변화와 동일하게 관찰되어, 젊은군에 비하여 노령군에서의 발현이 유의적으로 감소(YC vs. OC: 1.0 ± 0.11 vs. 0.42 ± 0.04 , $p=0.05$)되었으며, 운동 후 그 발현이 증가하였다(YC vs. YE: 1.0 ± 0.11 vs. 1.39 ± 0.01 , $p=0.05$) (OC vs. OE: 0.42 ± 0.04 vs. 1.21 ± 0.05 , $p=0.05$). 또한 노령군에서 더 높은 증가폭이 관찰되어(YE/YC vs. OE/OC: 39% vs. 286%), 장기적 운동을 실시한 후에는 측정된 glutathione peroxidase mRNA 발현량은(YE vs. OE: 1.39 ± 0.01 vs. 1.21 ± 0.05 , $p=0.145$) 젊은군(YE)과 노령군(OE)에

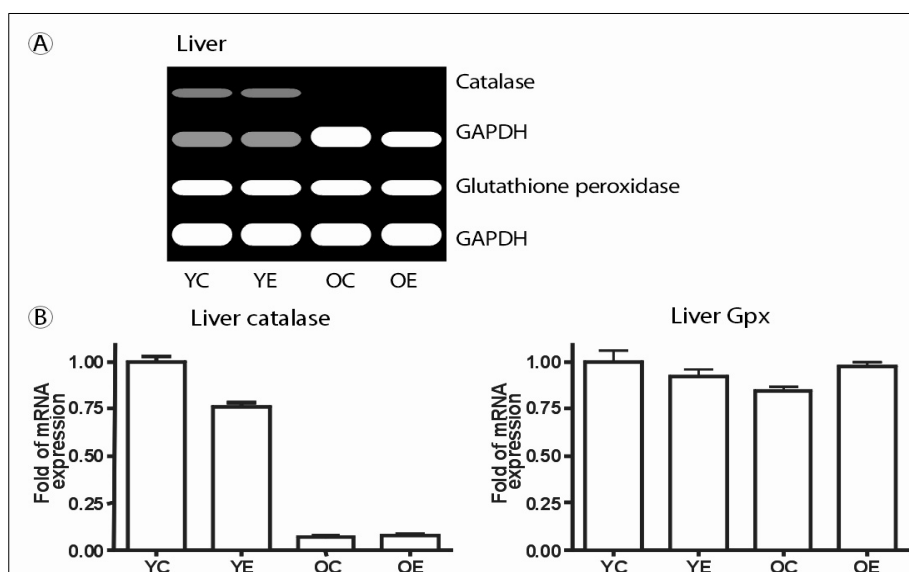


Fig. 1. mRNA expression of catalase and glutathione peroxidase in liver. (A) Catalase was lower in aged group. After chronic exercise, catalase mRNA expression remained unchanged in both (young and old) groups. Glutathione peroxidase expression was similar in both (young and old) groups. After chronic exercise, glutathione peroxidase mRNA expression showed no change in both (young and old) groups. (B) Graph shows ratio of expression to young sedentary group. YC, young control; YE, young exercised; OC, old control; OE, old exercised.

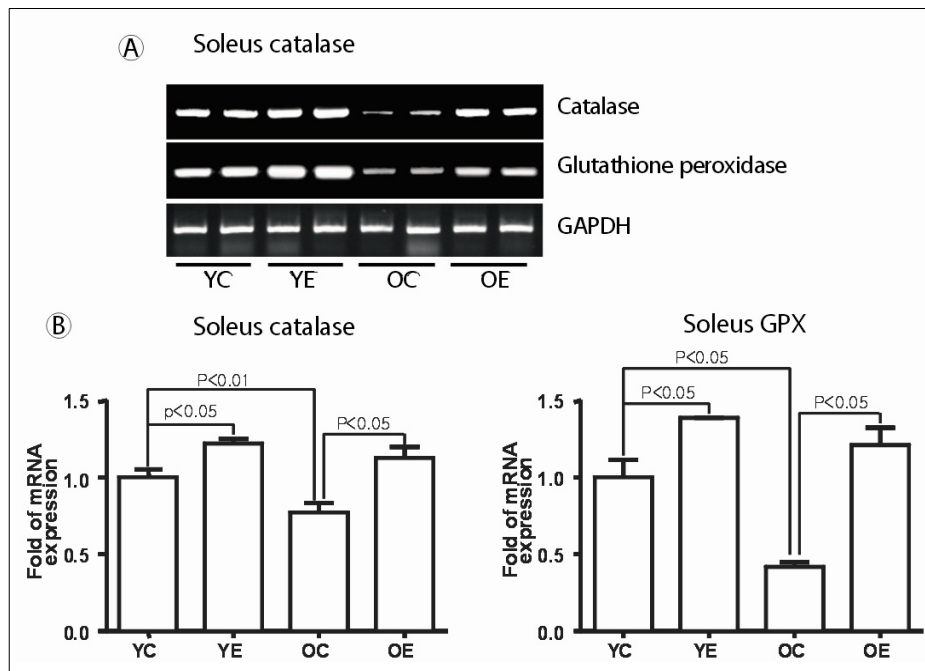


Fig. 2. mRNA expression of catalase and glutathione peroxidase in soleus muscle. (A) The expression of catalase in the soleus was lower in old control rats than in young. Exercise increased catalase expression significantly in both young and old rats. The expression of glutathione peroxidase in soleus was lower in old control rats than in young. Exercise increased glutathione peroxidase expression significantly in both young and old rats. (B) Graph shows ratio of expression to young sedentary group. YC, young control; YE, young exercised; OC, old control; OE, old exercised.

서 차이가 없었다.

고 찰

세포는 정상적인 세포내 대사 과정에서 혹은 외부환경의 자극에 의해 끊임없이 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생산한다. 이 활성산소종은 항산화효소들의 항산화작용에 의해 제거되며, 생리적으로 정상인 상태에서는 활성산소종의 생성과 항산화효소에 의한 제거작용이 균형을 이루고 있다. 그러나 활성산소종의 생성이 증가하거나 항산화효소의 작용이 감소되면 불균형이 초래되고 이로 인하여 세포는 소위 산화 스트레스 상태에 빠지게 된다^{14,15}. 산화 스트레스는 세포의 단백질과 지질의 변형을 초래할 뿐만 아니라, DNA도 손상시키며 세포의 증식, 성장 및 분화를 억제할 뿐만 아니라, 여러 신호 전달 체계를 활성화시킴으로써 세포의 노화와 사멸에 영향을 미

치게 된다. 이러한 과정을 통하여 산화 스트레스는 발암 과정¹⁴, 동맥경화¹⁷, 노화¹⁸, 골다공증¹⁹ 및 근감소증 등 여러 가지 퇴행성질환의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그 중 근감소증은 골격근육의 감소와 기능적 저하가 이루어지는 노화과정에서 일어나는 질병으로 알려져 있다²⁰. 활성산소종에 대항하는 항산화 방어 기전은 세포내와 세포외에서 다르게 작용하며, 효소 또는 비효소적 특성을 가지고 있다. 그 중 glutathione은 환원력을 가지고있어 활성산소종에 전자를 제공함으로써 활성산소종의 산화능을 제거한다. Glutathione은 모든 세포에 존재하는 항산화 시스템이며, 이외에도 활성산소종을 제거하는 몇 가지 효소 시스템이 있다. Catalase는 H₂O₂를, SOD는 O₂⁻를 제거하며, glutathione peroxidase는 ROOH를 ROH로 환원시킨다. Cysteine-rich metallothionein 또한 항산화능력이 있으며, quinone reductase, haem oxygenase도 산소에 의한 래디칼 형성을 억제한다. 이상의 각종 항산

화 시스템은 기능적인 산화-환원 반응 분자들, 예를 들면 thioredoxin (Trx), redox factor 1 (Ref-1) 혹은 라디칼 소거제인 vitamin C와 vitamin E 등과 함께 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 수행한다.

그 중 세포내 효소제 방어기전인 catalase, glutathione peroxidase가 주된 역할을 담당하고 있으므로 본 실험에서는 노화와 운동에 의한 catalase, glutathione peroxidase의 발현에 대한 실험을 하였다. 보고된 바에 의하면, Luhtala 등²¹⁾, Leeuwenburgh 등²²⁾ 그리고 Gianni 등²³⁾은 사람이나 설치류에서 노화에 따른 골격근의 항산화 효소(catalase, glutathione peroxidase)의 기능이 강화 된다고 하였으며, Ji 등²⁴⁾의 경우 설치류의 골격근 조직에서 노화에 의한 활성산소종(ROS)의 증가와 SOD, glutathione peroxidase의 항산화 기능이 비례해서 증대 된다고 하였다. 하지만 이와 다르게 Pansarasa 등²⁵⁾, Pansarasa 등²⁶⁾은 설치류에서 노화에 따라 심장 골격근의 SOD 기능 저하가 일어난다고 하였다. 이렇듯 기존의 연구 결과들에서 노화에 따라 활성산소종의 증가와 항산화효소 발현에 변화가 생긴다고 하였는데 항산화 효소의 발현에는 서로 다른 의견을 보이고 있다. 이렇게 항산화효소의 발현에 대한 결과가 다르게 보여지는 것은 각각 실험에 사용한 동물종과 노화된 정도의 기준이 각각 다르고 항산화효소 발현을 분석한 조직의 차이가 있기 때문이다.

본 실험에서는 노화에 의해서 catalase, glutathione peroxidase의 mRNA 발현을 간 조직과 가자미근에서 발현의 차이를 확인하였다. 간 조직에서 catalase의 mRNA 발현을 확인한 결과 젊은 군에서 그 발현이 나타나는 것에 비하여 노령군의 경우 catalase 발현이 보이지 않았다. 이는 노화에 의해서 그 발현이 감소한 것으로 보이며, 운동에 의한 증대 효과는 보이지 않았으며, glutathione peroxidase mRNA 발현은 노화와 운동에 의한 유의적 변화는 없었다. 이러한 결과는 노화에 따른 항산화효소의 발현 감소가 catalase에서 더욱 두드러지게 나타나는 것으로 볼 수 있으며, glutathione peroxidase는 노화에 의한 발현의 감소가 나타나지 않는 것으로 판단된다. 그리고 운동 후 catalase, glutathione peroxidase의 증감이 나타나지 않는 것으로 미루어 볼 때, 운동에 의한 간에서는 활성산소종의 발현에 큰 영향이 없으며, 이는 활성산소종 제거를 위한 항산화효소의 발현에 큰 영향이 없는 것으로 생각된다.

그리고 가자미근(soleus muscle)의 경우에는 catalase의 발현이 젊은군에 비해 노령군의 경우 유의적으로 그 발현이 감소되어 있으며, 운동에 의해 젊은군과 노령군 모두 유의적으로 catalase의 발현이 증대되었다. 그리고 glutathione peroxidase의 경우에도 catalase와 마찬가지로 노령군의 경우 기본적 발현 양상이 감소되어 있으며, 운동에 의하여 그 발현이 유의적으로 증가되었다. 이러한 결과는 Ji 등²⁷⁾, Matsuo 등²⁸⁾ 그리고 Rikans과 Hornbrook²⁹⁾의 결과처럼 운동에 의해서 증대된 근육내 활성산소종의 효과적 제거를 위해 항산화효소의 발현이 증가되는 것과 같은 이유로 보인다. 하지만 이와 다르게 노화에 따른 기본적인 항산화 효소의 감소는 활성산소종의 감소로 인한 것으로 기인하기 보다 기본적 항산화 효소의 발현 능력이 감소된 것으로 보인다.

본 연구에서는 실험동물의 근육과 간에서 항산화 효소의 mRNA 발현 정도만을 측정하였으나, 향후 연구에서 조직 또는 혈청에서 활성산소종의 농도를 측정하거나, 항산화 효소의 활성을 측정한다면 근감소증에서 항산화 효소의 역할을 구체적으로 규명할 수 있을 것이다.

결과적으로 노화를 통한 항산화 효소(catalase, glutathione peroxidase)의 기능적 저하를 운동을 통해 증대시킬 수 있음을 확인하였고, 젊은군에 비하여 노령군의 경우에 운동을 통한 활성산소종에 대한 항산화 효소의 발현이 더 높게 발현이 되었다. 이러한 결과는 고령에서의 경우 운동을 통해 항산화 효소의 발현을 증가시켜 활성산소종의 증가를 중화할 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

연구배경: 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 증가는 체내 여러 가지 대사조절 과정에 좋지 않은 영향을 미치는데, 최근 노화가 진행함에 따라 이러한 활성산소종 경로가 증가됨이 보고되고 있다. 본 연구에서는 젊은 백서와 고령의 백서에서 활성산소종을 조절하는 항산화 유전자의 발현을 살펴보고, 이에 미치는 만성 운동의 효과를 살펴봄으로써, 노화와 연관된 활성산소종 증가 기전의 일단을 살펴보고자 하였다.

방법: 백서를 표준 식이를 이용하여 기른 후 젊은군(12주령)과 노령군(88주령)으로 나누고, 각 군을 대조군(젊은

대조군; YC, 노령 대조군; OC)과 운동군(젊은 운동군; YE, 노령 운동군; OE)으로 분류하여 운동군은 12주간의 답차 운동(YE: 하루 45-60분, 15 m/min; OE: 하루 20~30분, 4 m/min)을 실시 하였다. 항산화 유전자 발현을 알아 보기 위하여, 간, 근육 조직의 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현 정도를 RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction) 방법을 이용하여 알아 보았다.

결과: 젊은군(OC)의 경우 노령군(YC)에 비하여 간 조직에서 catalase mRNA 발현이 감소 되어 있었으며, glutathione peroxidase의 mRNA 발현에는 별다른 변화가 없었다. 가자미근에서의 catalase와 glutathione peroxidase mRNA의 발현은 노령군(OC)의 경우 젊은군(YC)에 비하여 발현이 유의하게 감소되었으며, 운동을 통해 노령군(OE)과 젊은군(YE) 모두 catalase와 glutathione peroxidase의 mRNA 발현이 유의하게 증가하였다.

결론: 장기적인 운동이 노화에서 감소된 항산화 유전자 발현을 회복시키며, 이는 장기적인 운동이 노화에 따른 대사 이상을 일부 회복시킬 가능성을 시사한다.

중심단어: 노화, 운동, 활성산소종(ROS), Catalase, Glutathione peroxidase

참 고 문 헌

1. Marcell TJ. Sarcopenia: Causes, consequences, and pre-ventions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003;58:M911-6.
2. Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, et al. Absence of CuZn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy. *Free Radic Biol Med* 2006;40:1993-2004.
3. Roubenoff R, Castaneda C. Sarcopenia-understanding the dynamics of aging muscle. *JAMA* 2001;286:1230-1.
4. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* 2001; 44:1-11.
5. Aldhahi W, Hamdy O. Adipokines, inflammation, and the endothelium in diabetes. *Curr Diab Rep* 2003;3:293-8.
6. Borges RL, Ribeiro-Filho FF, Carvalho KM, Zanella MT. Impact of weight loss on adipocytokines, C-reactive protein and insulin sensitivity in hypertensive women with central obesity. *Arq Bras Cardiol* 2007;89:409-14.
7. Bruunsgaard H, Skinhøj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol* 2000;121: 255-60.
8. Lee CE, McArdle A, Griffiths RD. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clin Nutr* 2007;26:524-34.
9. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer M, Sacks F, Lepage S, Braunwald E. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2149-53.
10. Volpato S, Leveille SG, Corti MC, Harris TB, Guralnik JM. The value of serum albumin and high-density lipoprotein cholesterol in defining mortality risk in older persons with low serum cholesterol. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49:1142-7.
11. Kang ZH, Park HS. Comparisons of the exercise types on leg muscle strength, balance and walking ability in elders. *J Korean Geriatr Soc* 2004;8:215-22.
12. Dekany M, Nemeskeri V, Gyore I, Harbula I, Malomsoki J, Pucsok J. Antioxidant status of interval-trained athletes in various sports. *Int J Sports Med* 2006;27:112-6.
13. Zhang SJ, Sandström ME, Lanner JT, Thorell A, Westerblad H, Katz A. Activation of aconitase in mouse fast-twitch skeletal muscle during contraction-mediated oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C1154-9.
14. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghasakadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 2004;52:794-804.
15. Melov S. Therapeutics against mitochondrial oxidative stress in animal models of aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:330-40.
16. Shibanuma M, Kuroki T, Nose K. Stimulation by hyd-

- rogen peroxide of DNA synthesis, competence family gene expression and phosphorylation of a specific protein in quiescent Balb/3T3 cells. *Oncogene* 1990;5:1025-32.
17. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* (2008), doi:10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.006
 18. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. *Exp Cell Res* 2008;314:1918-22.
 19. Fujieda M, Takao N, Kiri M, Mizuochi S, Kaneki H, Ide H. Age-dependent decline in bone nodule formation stimulating activity in rat serum is mainly due to the change in the corticosterone level. *J Cell Biochem* 2001;81:547-66.
 20. Greenlund LJ, Nair KS. Sarcopenia: Consequences, mechanisms, and potential therapies. *Mech Ageing Dev* 2003; 124:287-99.
 21. Luhtala TA, Roecker EB, Pugh T, Feuers RJ, Weindruch R. Dietary restriction attenuates age-related increases in rat skeletal muscle antioxidant enzyme activities. *J Gerontol* 1994;49:B231-8.
 22. Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R, Ji LL. Aging and exercise training in skeletal muscle: Responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 1994;267:R439-45.
 23. Gianni P, Jan KJ, Douglas MJ, Stuart PM, Tarnopolsky MA. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging in human skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2004;39: 1391-400.
 24. Gore M, Fiebig R, Hollander J, Leeuwenburgh C, Ohno H, Ji LL. Endurance training alters antioxidant enzyme gene expression in rat skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1998;76:1139-45.
 25. Pansarasa O, Bertorelli L, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic Biol Med* 1999;27:617-22.
 26. Pansarasa O, Castagna L, Colombi B, Vecchiet J, Felzani G, Marzatico F. Age and sex differences in human skeletal muscle: Role of reactive oxygen species. *Free Radic Res* 2000;33:287-93.
 27. Ji LL, Dillon D, Wu E. Alteration of antioxidant enzymes with aging in rat skeletal muscle and liver. *Am J Physiol* 1990;258:R918-23.
 28. Matsuo M, Gomi F, Dooley MM. Age-related alterations in antioxidant capacity and lipid peroxidation in brain, liver, and lung homogenates of normal and vitamin E-deficient rats. *Mech Ageing Dev* 1992;64:273-92.
 29. Rikans LE, Hornbrook KR. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. *Biochim Biophys Acta* 1997;1362: 116-27.