ORIGINAL ARTICLE

ISSN (Print) 2005-3673
ISSN (Online) 2093-758X

대한간호학회지 제44권 제4호, 2014년 8월

J Korean Acad Nurs Vol.44 No.4, 371-380
http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371

항산화제가 시스플라틴에 의해 유발된 쥐의 뒷다리근 위축 경감에 미치는 영향

김진일[1] · 최명애[2]

[1]기독간호대학교 간호학과, [2]서울대학교 간호대학·오이타현립 간호과학대학

Effects of Antioxidant on Reduction of Hindlimb Muscle Atrophy Induced by Cisplatin in Rats

Kim, Jin il[1] · Choe, Myoung-Ae[2]

[1]Department of Nursing, Christian College of Nursing, Gwangju, Korea
[2]College of Nursing, Seoul National University, Seoul, Korea · Oita University of Nursing and Health Sciences, Oita, Japan

Purpose: The purpose of this study was to examine the effects of Cu/Zn SOD on reduction of hindlimb muscular atrophy induced by cisplatin in rats. **Methods:** Forty-two rats were assigned to three groups; control group, Cisplatin (CDDP) group and cisplatin with Cu/Zn SOD (CDDP-SOD) group. At day 35 hindlimb muscles were dissected. Food intake, activity, withdrawal threshold, muscle weight, and Type I, II fiber cross-sectional area (CSA) of dissected muscles were measured. Relative SOD activity and expression of MHC and phosphorylated Akt, ERK were measured after dissection. **Results:** Muscle weight and Type I, II fiber CSA of hindlimb muscles in the CDDP group were significantly less than the control group. Muscle weight and Type I, II fiber CSA of hindlimb muscles, food intake, activity, and withdrawal thresholds of the CDDP-SOD group were significantly greater than the CDDP group. There were no significant differences in relative SOD activities of hindlimb muscles between the CDDP-SOD and CDDP groups. MHC expression and phosphorylated Akt, ERK of hindlimb muscles in the CDDP-SOD group were significantly greater than the CDDP group. **Conclusion:** Cu/Zn SOD attenuates hindlimb muscular atrophy induced by cisplatin through increased food intake and activity. Increment of phosphorylated Akt, ERK may relate to attenuation of hindlimb muscular atrophy.

Key words: Antioxidant, Cisplatin, Rat, Muscular atrophy, Superoxide dismutase

서 론

1. 연구의 필요성

시스플라틴(cis-Diammineplatinum (II) dichloride [CDDP])은 탁월한 항암효과를 가지고 있어 소아에서 성인까지 광범위하게 사용되는 백금화합물 계열의 항암제이다[1]. 그러나 이러한 탁월한 항암효과에 반해 고용량으로 사용할 경우 부작용이 심하여 투여 용량을 제한하여야 하는 용량제한성(dose-limiting) 독성을 가지고 있다[2]. 시스플라틴을 고용량으로 투여할 경우 위장관 독성을 비롯하여 신독성, 이독성, 신경독성 등 많은 장기에 부작용이 나타나는 것으로 알려져 있다[2-4]. 그 중에서도 말초신경독성은 대표적인 부작용으

주요어: 항산화제, 시스플라틴, 쥐, 근위축

*이 논문은 제1저자 김진일의 박사학위 논문의 수정하여 작성한 것임.
*This article is a revision of the first author's doctoral thesis from Seoul National University.

Address reprint requests to : Kim, Jin il
Department of Nursing, Christian College of Nursing, 6, 70 beon-gil, Baekseo-ro, Nam-gu, Gwangju 503-711, Korea
Tel: +82-62-650-8057 Fax: +82-62-675-5806 E-mail: neoreva@hanmail.net

Received: April 11, 2014 Revised: April 27, 2014 Accepted: June 23, 2014

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution NoDerivs License. (http://creativecommons.org/licenses/by-nd/4.0)
If the original work is properly cited and retained without any modification or reproduction, it can be used and re-distributed in any format and medium.

로 말초 신경세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유발함으로써 발생한다[5,6].

시스플라틴에 의한 말초신경병증은 주로 후근신경절(dorsal root ganglia)과 말초 감각신경 세포체의 손상에 의해 초래되며 발의 감각상실, 감각이상 및 통증 등의 증상을 동반하며[5,6] 말초신경병증으로 유발된 통증은 움직임을 제한하여 활동량이 줄어들게 된다[7]. 그리고 활동이 저하된 경우 초과산화이온(superoxide anion [O_2^-])을 생성하는 xanthine oxidase가 근육 세포질(cytoplasm)에서 증가하게 되어 활성산소종(reactive oxygen species [ROS])의 생성과 항산화물질 생성간의 불균형을 초래하여 산화 스트레스(oxidative stress)가 커진다. 이러한 산화 스트레스에 의해 골격근 세포질에서 활성산소종이 증가하게 되면, 단백분해가 커지고 단백합성이 감소되어 근위축이 유발된다[8]. 또한, 시스플라틴 투여 시 말초신경뿐만 아니라 장관 신경세포에서 산화 스트레스를 증가시켜 장관 신경병증(enteric neuropathy)이 유발되고 이로 인해 식이섭취도 감소된다[9]. Kim과 Choe[10]는 쥐에 시스플라틴을 투여한 결과 식이섭취 저하로 인해 뒷다리근에 근위축이 유발되었음을 보고하였고, Yang과 Choe[7]는 쥐에 시스플라틴을 투여한 결과 신경병증성 통증 및 식이섭취 저하가 발생하여 뒷다리근에 근위축이 초래되었음을 제시하였다.

근위축은 근육의 질량 및 횡단면적이 감소하는 것[11]으로 근위축이 발생하게 되면 허약감, 활동장애가 발생하게 될 뿐만 아니라 기능회복기간이 연장되어, 대상자의 삶의 질을 저하시킬 수 있으므로 근위축을 예방하는 것이 매우 중요하다[12].

세포질에서 초과산화이온의 1차 방어선으로 작용하는 효소인 Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD)는 항산화제로서 초과산화이온을 물과 과산화수소로 바꿈으로써($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$) 활성산소종을 제거하여 산화를 늦추거나 방지하는데 효과적인 것으로 보고되고 있다[13]. Cu/Zn SOD는 근육 세포질의 초과산화이온을 제거하고, 초과산화이온으로부터 신경세포를 보호하는 것으로 알려져 있다[14]. 따라서, 시스플라틴 투여로 인한 근위축이 예견되는 상황에서 Cu/Zn SOD 투여는 산화 스트레스로부터 신경세포 및 위장관 세포를 보호하여 말초신경병증 및 위장관 세포 손상을 경감시킴으로써 시스플라틴 투여에 의한 근위축을 경감시킬 수 있을 것으로 가정된다.

또한, 선행 연구에서는 Cu/Zn SOD의 증가에 의해 신호 전달 단백질인 Akt (Protein Kinase B)와 ERK (Extracellular signal-regulated kinase)가 활성화됨을 보고하였다[15,16]. Akt는 PI 3-kinase 의존경로(Phosphoinositide 3-kinase dependent pathway)를 통해 활성화되며 Akt/mTOR 경로를 통해 골격근에서 마이오신 중쇄를 증가시켜 근세관 증식을 촉진함으로써 근육이 비후(hypertrophy)되어 근위축을 경감시키는 것으로 알려져 있고[17], ERK는 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로를 통해 골격근에서 전사인자를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서, Cu/Zn SOD 투여로 인한 근육 세포질의 분자학적 변화를 살펴볼 필요성이 증대되었다.

Cu/Zn SOD 투여가 근육에 미치는 영향을 밝힌 중재 연구로는 비복근(gastrocnemius)에 긴장성 손상(strain-induced damage)을 유발시킨 쥐에 Cu/Zn SOD를 투여한 결과 항산화작용에 의해 근육손상 정도가 경감되었음을 보고한 연구[18]가 거의 유일하였으며, 항산화제가 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축에 미치는 영향을 규명한 연구는 국내·외적으로 거의 찾아보기 어려웠다.

이에 따라 시스플라틴에 의해 뒷다리근 위축이 유발된 쥐에 항산화제인 Cu/Zn SOD를 투여하여 뒷다리근에 미치는 영향을 규명함으로써 시스플라틴에 의해 근위축이 유발된 대상자의 근위축 경감을 위한 중재로서 Cu/Zn SOD를 적용할 수 있는지를 파악하고자 본 연구를 시행하였다.

2. 연구 목적

본 연구의 목적은 시스플라틴에 의해 쥐의 뒷다리근에 근위축이 유발되는지 확인하고, Cu/Zn SOD가 시스플라틴에 의한 뒷다리근의 위축 경감에 미치는 영향을 규명하는 것으로 구체적인 목적은 다음과 같다.

첫째, 시스플라틴에 의해 뒷다리근에 근위축이 유발되는지 확인한다.

둘째, Cu/Zn SOD가 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축 경감에 미치는 영향을 규명한다.

연구 방법

1. 연구 설계

본 연구는 시스플라틴에 의해 쥐의 뒷다리근에 근위축이 유발되는지를 확인하고, 항산화제가 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축 경감에 미치는 영향을 규명하기 위한 무작위 대조군 사후 실험설계이다. 실험동물은 무작위로 세 군에 배정하여 대조군(Control [C])은 시스플라틴 투여군과 동일한 양의 0.9% 생리식염수를 주당 1회씩 총 5주 동안 복강 내 투여 받는 군이고, 시스플라틴 투여군(CDDP)은 시스플라틴 3 ㎎/㎏을 주당 1회씩 총 5주 동안(총 축적용량 15 ㎎/㎏) 복강 내 투여 받는 군이며, 시스플라틴 투여와 동시에 Cu/Zn SOD를 투여 받는 군(CDDP-SOD)은 시스플라틴 3 ㎎/㎏을 주당 1회씩 총 5주 동안 복강 내 투여 받고, Cu/Zn SOD 10,000 U/㎏을 5주간 주 2회 복강 내 투여 받는 군이다.

http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371

실험기간을 정함에 있어 시스플라틴을 5주 간 투여하여 신경병증성 통증 및 장관 신경병증에 의해 뒷다리에 근위축이 발생하였음을 보고한 선행 연구 결과[7]를 토대로 본 연구의 실험기간은 5주로 정하였다.

2. 연구 대상

본 연구는 S대학교 실험동물 자원관리원의 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호: SNU-120601-1)을 받은 후 규정에 따라 2012년 6월 24일부터 7월 28일까지 수행되었다. 본 연구에서 체중 190-219 g의 male Sprague-Dawley 쥐 42마리를 무작위로 C군, CDDP군 및 CDDP-SOD군에 14마리씩 배정하여 실험을 시작하였다. 실험대상 동물의 수는 Mead's resource equation[19]을 이용하여 오차 자유도(error degrees of freedom) 20, 실험간 자유도(treatment degrees of freedom) 2, 블럭 자유도(block degrees of freedom) 0을 유지하는데 필요한 동물의 수는 군당 8마리이나 시스플라틴 투여 후 유발된 근위축을 연구한 선행 연구[7]에서 이용된 동물의 수와 탈락률을 고려하여 군당 14마리로 결정하였다.

실험대상 쥐들은 온도 22±2℃와 습도 50%, circadian rhythm을 위해 12시간은 밝게 12시간은 어둡게 하는 동일한 환경(S대학교 의과대학 실험동물실)에 수용하였고, 모든 연구 대상 쥐들에게 고형사료(Cargill Agri Purina Inc., Seongnam, Korea)와 물은 마음대로 먹을 수 있게 하였다.

3. 실험 방법

1) 시스플라틴 투여

시스플라틴 투여로 유발된 말초신경병증성 통증 모델 중 Authier 등[3]의 방법(시스플라틴 3 ㎎/㎏ 주당 1회 총 5주 동안 투여, 총 축적용량 15 ㎎/㎏)을 이용하여 말초신경병증성 통증을 유발시켰다.

시스플라틴[cis-Diammineplatinum (II) dichloride, Sigma, St. Louis, USA]을 0.9% 생리식염수에 0.15 ㎎/㎖로 희석시켜 CDDP군 및 CDDP-SOD군에 3 ㎎/㎏을 주당 1회씩 총 5주 동안(총 축적용량 15 ㎎/㎏) 복강 내 투여하였다. 투여 시마다 신장손상을 예방하기 위해 투여 전 0.9% 생리식염수 2 ㎖를 피하주사 하였다. C군은 CDDP군이 투여 받은 용량과 동일한 용량의 0.9% 생리식염수를 복강 내 투여하며, 투여 전 0.9% 생리식염수 2 ㎖를 피하주사 하였다.

2) 회피 역치(withdrawal threshold) 검사

시스플라틴 투여로 인해 말초신경병증성 통증이 유발되었는지 확인하기 위해 회피 역치 검사를 시행하였다. 회피 역치는 회피반응을 일으키는 시점의 강도를 의미하며, 회피 역치 검사는 회피반응을 일으키는 최저 강도를 측정하는 것으로 구체적인 방법은 다음과 같다.

쥐를 금속철망(망 간격: 0.5×0.5 ㎝) 위에 놓은 후 투명한 아크릴 상자(8×8×24 ㎝)로 덮어 움직임을 최소화 하였다. 환경 변화에 따른 스트레스를 감소시키기 위해 15분 동안 적응시킨 후 자극 범주 0.356-18 g의 von Frey filament (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, Wood Dale, IL, USA)를 이용하여 철망 사이로 발바닥에 자극을 가해 발의 회피반응이 나타나는 자극의 강도를 측정하였다. von Frey filament를 발바닥에 약 2초 간 자극을 유지시켰을 때 발바닥을 완전히 철망 위로 들어 올릴 경우 회피반응으로 판정하였다[7].

시스플라틴 투여로 말초신경병증성 통증이 유발되었는지 확인하기 위해 회피 역치 검사를 실시한 선행 연구[7]에서 실시한 측정 간격을 참고로 하여 C군, CDDP군 및 CDDP-SOD군 모두 실험시작일에 측정하고, 실험시작일로부터 주 2회 그리고 실험 마지막 날 측정하였다.

3) Cu/Zn SOD 투여

Cu/Zn SOD (superoxide dismutase from bovine erythrocytes, Sigma, St. Louis, USA) 10,000 U/㎏을 0.9% 생리식염수 2 ㎖에 희석하여 CDDP-SOD군에 실험시작일부터 주 2회씩 총 5주간 복강 내 투여하였다.

Cu/Zn SOD 투여 용량 및 방법은 다음의 선행 연구를 토대로 결정하였다. 긴장성 근육손상 유발 쥐에서 초과산화이온 제거에 효과적인 것으로 알려진 용량인 10,000 U/㎏[18]과 SOD의 방사선치료에 의한 치료부위 섬유화 개선효과를 규명한 연구[20]에서 사용한 투여 방법(2회/주)을 참고로 하였다.

4) 체중 및 사료섭취량 측정

체중은 매일 동일한 시간에 electrobalance (HF-2000, A&D, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 사료섭취량은 매일 24시간 전에 제공한 사료의 무게에서 남은 사료의 무게의 차이를 구하여 산출하였다.

5) 활동 측정

사육상자 속의 쥐가 보여주는 활동을 활동성(activity), 몸치장활동(grooming), 비활동성(inactivity)으로 분류하여 1인의 측정자가 실험시작일에 측정하였고, 실험시작일로부터 주 2회 그리고 실험 마지막 날 측정하였다. 활동성은 왕성하게 움직임, 계속적인 이동행동, 앞발을 들고 일어서는 행동을 주로 할 때이고, 몸치장활동은 털 핥기, 세수하기, 긁적거리기 행동을 할 때이며 비활동성은 한곳에 가만히 앉아 있기, 잠자는 듯한 모습을 주로 보일 때로 판정하였다.

각각의 쥐가 15초 동안 보이는 행동을 5분간 20회 관찰하여 이상의 세 가지 행동기준 중 하나로 표시하여, 측정된 활동을 활동성 3점, 몸치장활동 2점 및 비활동성 1점으로 부여하여 각 동물의 활동점수 평균을 산출하였다[11].

6) 뒷다리근 절제 및 근육 무게 측정

실험시작일로부터 34일 경과 후 35일 째에 pentobarbital sodium (50 ㎎/㎏)을 복강 내 주사로 투여하여 마취하였다. 양측 뒷다리에서 가자미근 및 비복근을 절제하여 지방조직과 결체조직은 신중히 잘라내고 생리식염수로 세척한 후 미세저울(FX-300, A&D, Tokyo, Japan)을 이용하여 무게(wet weight)를 1인의 측정자가 측정하였다.

7) Type Ⅰ, Ⅱ 근섬유의 횡단면적 측정

근섬유 형태를 Type I과 Type II로 구분하기 위해 myosin-ATPase (adenosinetriphophatase) 조직화학법을 실시하였다. 염색된 근육표본을 광학현미경(CX-31, Olympus, Tokyo, Japan)으로 보아 어둡게 보이는 근섬유는 Type I, 밝게 보이는 근섬유는 Type II로 분류하고, 각 근섬유의 횡단면적은 100배의 배율 하에 일정면적 내에서 Type I, II 근섬유의 유형별 횡단면적을 1인의 측정자가 산출하였다[11].

8) 뒷다리근의 상대적 SOD 활성도 측정

상대적 SOD 활성도는 xanthine과 xanthine oxidase에 의해 생성된 초과산화이온이 chromagen에 의해 환원되어 수용성의 formazan dye를 형성할 때 세포내에 존재하는 SOD의 양에 따라 생성되는 formazan dye가 감소하는 정도를 의미하며, 세포내에서의 상대적 SOD 활성도를 나타낸다. 본 연구에서는 Superoxide Dismutase Activity Assay kit (Cell Biolabs, San Diego, USA)를 이용하여 상대적 SOD 활성도를 측정하였다. 근육 절제 후 냉동고에 보관한 가자미근 및 족척근을 Lysis Buffer (10mM Tris, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1mM EDTA)에 넣고 균질화하였다. 이 균질물을 원심분리기로 12,000rpm에서 15분 간 원심분리한 후 상층액을 얻은 후, 96-well plate로 옮겼다. 각각의 시료에 1X xanthine oxidase 용액 10 ㎕를 첨가한 후 37℃에서 1시간 동안 배양한 후 배양된 시료를 microplate reader를 이용하여 490 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 본 연구에서 시험 내(intra-assay) 변이계수(Coefficient of variance)는 1.8-2.1%였고, 시험 간(inter-assay) 변이계수는 2.6%였다.

9) 뒷다리근의 Akt, ERK 인산화 발현 측정

면역 blot 방법[11]을 이용하여 뒷다리근의 Akt와 ERK 인산화 발현을 측정하였다. 근육 절제 후 냉동고에 보관한 가자미근 및 족척근을 buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 2mM EDTA, 30mM sodium pyrophosphate, 10mM NaF, 2mM Na_3VO_4, protease inhibitor cocktail)에 넣고 균질화 하였다. 이 균질물을 원심분리기로 4℃, 12,000 rpm에서 15분 간 원심분리한 후 상층액을 얻어 4X Lammlie의 buffer (62.5 mmol/1 Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)을 넣고 100℃에서 5분 간 끓인 후 면역 blot에 사용하였다. 정량된 단백질 시료 30 ㎍을 10% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel (SDS-PAGE) 전기 영동법으로 분리한 후, nitrocellulose paper로 옮겼다.

단백질이 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고, 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)으로 씻은 후 5% 탈지 분유액으로 30분 이상 blocking하였다. 항 pAkt, 항 Akt, 항 pERK 및 항 ERK항체(Cell signaling technology, Massachusetts, USA, 희석배율 1:1,000)와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1시간 동안 반응시켰다(희석비율 1:3,000). 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminiscence (ECL Western Blotting Substrate, Pierce Biotechnology, Rockford, USA)로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 Molecular Imager ChemiDoc XRS+(Bio-Rad, Hercules, Hercules, USA)와 Image LabTM software Version 2.0.1 (Bio-Rad, Hercules, Hercules, USA)을 이용하였다.

10) 뒷다리근의 MHC 발현 측정

뒷다리근의 Akt와 ERK 인산화 발현을 측정하는 방법과 동일한 면역 blot 방법으로 항 myosin heavy chain, 항 β-actin 항체(Cell signaling technology, Massachusetts, USA)를 이용하여 뒷다리근의 MHC 발현을 측정하였다.

4. 자료 분석 방법

수집된 자료는 PASW Statistics 18 프로그램을 이용하여 분석하였다. 세 군의 체중, 사료섭취량, 활동점수, 회피반응역치, 근육무게 및 Type I, II 근섬유 횡단면적은 평균과 표준편차로 나타내었고, 상대적 SOD 활성도, Akt 인산화 비율 pAkt/Akt, ERK 인산화 비율 pERK/ERK 및 β-actin 발현에 대한 마이오신 중쇄(MHC) 발현의 비율 MHC/β-actin은 백분율(%)로 나타냈다. 각 변수별로 Kolmogorov-Smirnov 검정을 통해 정규분포가 확인된 경우 모수검정을 하였고, 정규분포하지 않은 경우 비모수검정을 하였다. 세 군 간의 체중, 활동점수 및 회피반응역치와 실험기간 중의 총 사료섭취량 그리고 근육무게, Type I, II 근섬유 횡단면적, 상대적 SOD 활성도, pAkt/Akt, pERK/ERK 및 MHC/β-actin은 일원분산분석(one-way ANOVA) 또는 Kruskal-Wallis 검정을 이용하여 분석하였고, 사후검정은 일원분

http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371

산분석의 경우 Scheffé's test, Kruskal-Wallis의 경우 Mann-Whitney U test with bonferroni correction을 이용하였다. 모든 통계량의 유의 수준은 $p<.05$에서 채택하였으나 비모수 통계를 이용한 사후검정을 이용하는 경우는 유의 수준을 $p<.017$에서 채택하였다.

연구 결과

1. 체중

세 군의 실험시작 시 체중은 차이가 없었고($F=0.98$, $p=.614$), 근육절제 직전의 체중은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다($F=54.99$, $p<.001$). CDDP군의 체중은 C군에 비해 유의하게 적었고($p<.001$), CDDP-SOD군도 C군에 비해서 유의하게 적었다($p<.001$). CDDP-SOD군의 체중은 CDDP군에 비해 유의하게 많은 것으로 나타났다($p=.003$) (Table 1).

2. 사료 섭취량

세 군 간의 실험기간 중의 총 사료섭취량을 근육절제 직전의 체중으로 나누어 체중 당 섭취량으로 비교한 결과는 세 군 간에 유의한 차이가 없었으나($\chi^2=0.16$, $p=.922$), 실험시작 시부터 종료 시까지 평균 1일 체중 당 사료섭취량을 비교한 결과 세 군 간에 유의한 차이가 있었다($F=41.38$, $p<.001$). CDDP군의 평균 1일 체중 당 사료섭취량은 56.50 ㎎으로 C군의 67.89 ㎎에 비해 유의하게 적은 것으로 나타났고($p=.138$), CDDP-SOD군도 61.82 ㎎으로 C군에 비해 유의하게 적은 것으로 나타났다($p<.001$). CDDP-SOD군의 평균 1일 체중 당 사료섭취량은 CDDP군에 비해 유의하게 많은 것으로 나타났다($p=.001$) (Table 1).

3. 활동 평균점수

세 군의 실험시작 시 활동 평균점수는 차이가 없었으며($F=0.58$, $p=.567$) 실험기간 중의 일일 활동 평균점수는 세 군 간에 유의한 차이가 있었다($F=13.33$, $p<.001$). CDDP군은 C군의 일일 활동 평균점수에 비해 유의하게 낮았고($p<.001$), CDDP-SOD군은 C군과 차이가 없었으며($p=.827$) CDDP-SOD군의 일일 활동 평균점수는 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다($p=.001$) (Table 2).

4. 회피 역치

세 군 간의 실험시작 시 회피 역치는 차이가 없었고, 근육절제 직전의 회피 역치는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다($\chi^2=28.68$, $p<.001$). CDDP군의 회피 역치는 C군에 비해 유의하게 낮았고($U=1.00$, $p<.001$), CDDP-SOD군도 C군에 비해서 유의하게 낮았다

Table 1. Body Weight and Mean Daily Diet Intake per Body Weight of C, CDDP and CDDP-SOD Rats

Groups	Body weight (g) at Day 1	Body weight (g) at Day 35	Mean daily diet intake per body weight (mg/kg)
	M ± SD	M ± SD	M ± SD
C[a]	204.46 ± 8.80	361.61 ± 16.50	67.89 ± 2.70
CDDP[b]	207.04 ± 7.97	247.56 ± 35.08	56.50 ± 4.20
CDDP-SOD[c]	206.85 ± 9.19	288.57 ± 32.34	61.82 ± 2.83
χ^2 or F (p)	0.98 (.614*)	54.99 (<.001†)	41.38 (<.001†)
Post hoc	-	b<c<a	b<c<a

*Kruskal-wallis test analysis; †Significant difference among three groups ($p<.05$); C=Control (n=14); CDDP=Cisplatin (n=14); CDDP-SOD=Cisplatin with superoxide dismutase (n=14).

Table 2. Mean Activity Score and Withdrawal Thresholds of C, CDDP and CDDP-SOD Rats

Groups	Activity score at Day 1	Mean daily activity score	Withdrawal threshold (g) at Day 1	Withdrawal threshold (g) at Day 35
	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
C[a]	2.17 ± 0.57	1.91 ± 0.3	18.00	17.56 ± 1.61
CDDP[b]	2.23 ± 0.48	1.50 ± 0.17	18.00	5.64 ± 3.70
CDDP-SOD[c]	2.35 ± 0.31	1.86 ± 0.21	18.00	9.14 ± 4.26
χ^2 or F (p)	0.58 (.567)	13.30 (<.001†)	-	28.68 (<.001*†)
Post hoc	-	b<a,c	-	b<c<a

*Kruskal-wallis test analysis; †Significant difference among three groups ($p<.05$); C=Control (n=14); CDDP=Cisplatin (n=14); CDDP-SOD=Cisplatin with superoxide dismutase (n=14).

(U = 10.00, p < .001). CDDP-SOD군의 회피 역치는 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다(U = 42.50, p = .011) (Table 2).

5. 근육 무게

세 군 간의 뒷다리근 무게를 비교한 결과, 가자미근과 족척근의 무게 모두 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(가자미근: F = 21.84, p < .001; 족척근: F = 31.44, p < .001).

CDDP-SOD군의 가자미근의 무게는 133.5 ㎎으로 C군의 152.93 ㎎에 비해 유의하게 작았고(p < .001), CDDP군의 가자미근 무게도 120.79 ㎎으로 C군에 비해 유의하게 작았다(p = .001). CDDP-SOD군의 가자미근 무게는 CDDP군에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다 (p = .045).

족척근의 경우 CDDP-SOD군은 325.64 ㎎으로 C군의 416.21 ㎎에 비해 유의하게 작았으며(p < .001), CDDP군의 족척근 무게 또한 276.43 ㎎으로 C군에 비해 유의하게 작았다(p < .001). CDDP-SOD의 족척근 무게는 CDDP군에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다 (p = .031) (Table 3).

6. 뒷다리근의 Type I, II 근섬유 횡단면적

세 군의 뒷다리근 Type I, II 근섬유 횡단면적을 비교한 결과는 가자미근의 Type I 근섬유 횡단면적은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(F = 6.03, p = .005). CDDP-SOD군은 C군과 차이가 없었고(p = .816), CDDP군은 C군에 비해 9% 작았다(p < .001). CDDP-SOD군은 CDDP군에 비해 8% 유의하게 큰 것으로 나타났다(p = .030).

가자미근의 Type II 근섬유 횡단면적은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(F = 14.64, p < .001). CDDP-SOD군은 C군에 비해 8% 유의하게 작았으며(p = .025), CDDP군은 C군에 비해 15% 유의하게 작았다 (p < .001). CDDP-SOD군은 CDDP군에 비해 9% 큰 것으로 나타났다 (p = .048).

족척근의 Type I 근섬유 횡단면적은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(F = 7.92, p = .001). CDDP-SOD군은 C군과 차이가 없었고 (p = .984), CDDP군은 C군에 비해 9% 유의하게 작은 것으로 나타났다(p = .004). CDDP-SOD군은 CDDP군에 비해 10% 큰 것으로 나타났다(p = .007).

족척근의 Type II 근섬유 횡단면적은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(F = 7.20, p = .002). CDDP-SOD군은 C군과 차이가 없었으며 (p = .604), CDDP군은 C군에 비해 10% 유의하게 작았다(p = .003). CDDP-SOD군은 CDDP군에 비해 8% 유의하게 큰 것으로 나타났다 (p = .038) (Table 3).

7. 뒷다리근의 상대적 SOD 활성도

상대적 SOD 활성도 측정을 통해 세 군의 뒷다리근 초과산화이온 함량 비율을 측정한 결과 가자미근의 상대적 SOD 활성도, 즉 초과산화이온의 함량은 세 군 간에 유의한 차이가 있었고(F = 5.83, p = .006), 족척근의 상대적 SOD 활성도는 세 군 간에 유의한 차이가 없었다(χ^2 = 5.07, p = .079).

CDDP-SOD군의 가자미근의 상대적 SOD 활성도는 9.56%로 C군의 7.17%에 비해 유의하게 높았으며(p = .027), CDDP군의 가자미근 상대적 SOD 활성도 또한 C군에 비해 유의하게 높았다(p = .014). CDDP-SOD의 가자미근 상대적 SOD 활성도는 CDDP군과 차이가 없는 것으로 나타났다(p = .963) (Figure 1).

8. 뒷다리근의 Akt, ERK 인산화 발현

뒷다리근의 Akt와 ERK의 인산화 발현을 관찰한 결과 가자미근과 족척근의 pAkt/Akt (가자미근: χ^2 = 36.64, p < .001; 족척근: χ^2 = 36.87, p < .001) 및 pERK/ERK (가자미근: χ^2 = 28.95, p < .001; 족척근: χ^2 = 27.95,

Table 3. Weight of Hindlimb Muscles and Cross-Sectional Area of Hindlimb Muscles in C, CDDP and CDDP-SOD Rats

Groups	Soleus			Plantaris		
	Weight (mg)	CSA (μm^2)		Weight (mg)	CSA (μm^2)	
		Type I	Type II		Type I	Type II
	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD	M ± SD
C[a]	152.93 ± 8.24	6414.71 ± 571.29	6038.79 ± 526.24	416.21 ± 42.89	4879.93 ± 191.43	5257.86 ± 235.39
CDDP[b]	120.79 ± 15.38	5819.29 ± 398.02	5121.29 ± 370.65	276.43 ± 61.50	4427.50 ± 458.72	4717.79 ± 512.08
CDDP-SOD[c]	133.50 ± 14.12	6298.36 ± 457.62	5555.71 ± 435.66	325.64 ± 33.09	4856.93 ± 312.30	5109.36 ± 369.38
F (p)	21.84 (< .001*)	6.03 (.005*)	14.64 (< .001*)	31.44 (< .001*)	7.92 (.001*)	7.20 (.002)*
Post hoc	b < c < a	b < a,c	b < c < a	b < c < a	b < a,c	b < a,c

*Significant difference between CDDP & C (p < .05); C=control (n=14); CDDP=cisplatin (n=14); CDDP-SOD=cisplatin with superoxide dismutase (n=14); CSA=cross-sectional area.

http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371

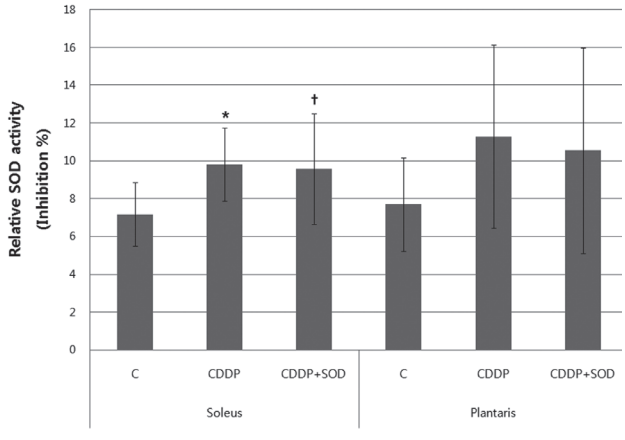
$p<.001$)는 세 군 간에 유의한 차이가 있었다.

CDDP-SOD군의 가자미근의 pAkt/Akt 및 pERK/ERK는 C군에 비해 유의하게 높았다(pAkt/Akt: U=0.00, $p<.001$; pERK/ERK: U=0.00, $p<.001$). CDDP군의 가자미근의 pAkt/Akt는 C군에 비해 유의하게 낮았고(U=0.00, $p<.001$), pERK/ERK는 C군과 차이가 없었다(U=59.00, $p=.077$). CDDP-SOD군의 가자미근의 pAkt/Akt 및 pERK/ERK는 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다(pAkt/Akt: U=0.00, $p<.001$; pERK/ERK: U=0.00, $p<.001$).

CDDP-SOD군의 족척근의 pAkt/Akt 및 pERK/ERK는 C군에 비해 유의하게 높았다(pAkt/Akt: U=0.00, $p<.001$; pERK/ERK: U=0.00, $p<.001$). CDDP군의 족척근의 pAkt/Akt는 C군에 비해 유의하게 낮았고(U=0.00, $p<.001$), pERK/ERK는 C군과 차이가 없었다(U=84.00, $p=.541$). CDDP-SOD군의 족척근의 pAkt 발현 비율 및 pERK 발현 비율은 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다(pAkt/Akt: U=0.00, $p<.001$; pERK/ERK: U=0.00, $p<.001$) (Figure 2).

9. 뒷다리근의 MHC 발현

뒷다리근의 β-actin 발현에 대한 마이오신 중쇄 발현의 비율(MHC/β-actin)을 관찰한 결과 가자미근과 족척근의 MHC/β-actin은 세 군 간에 유의한 차이가 있었다(가자미근: $\chi^2=36.61$, $p<.001$; 족척근: $\chi^2=36.60$, $p<.001$). CDDP-SOD군의 가자미근과 족척근의 MHC/β-actin은 C군에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났고(가자미근: U=0.00, $p<.001$; 족척근: U=0.00, $p<.001$), CDDP군에 비해서도 유의하게 큰 것으로 나타났다(가자미근: U=0.00, $p<.001$; 족척근: U=0.00, $p<.001$). CDDP군의 가자미근과 족척근의 MHC/β-actin은 C군에 비해 유의하게 작은 것으로 나타났다(가자미근: U=0.00, $p<.001$; 족척근: U=0.00, $p<.001$) (Figure 2).



*Significant difference between CDDP & C ($p<.05$); †Significant difference between CDDP-SOD & C ($p<.05$); C=control (n=14); CDDP=cisplatin (n=14); CDDP-SOD=cisplatin with superoxide dismutase (n=14).

Figure 1. Relative SOD activity of three groups.

논 의

시스플라틴 투여요법을 받는 대상자는 항암요법으로 인해 말초신경병증성 통증 및 장관신경병증과 같은 부작용을 경험하게 되고, 이로 인해 근위축이 발생할 수 있는 것으로 밝혀지고 있다. 이에 시스플라틴에 의한 부작용을 경감시키기 위한 중재로 항산화제를 이용하여 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축 경감에 미치는 영향을 규명하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

시스플라틴 투여로 근위축이 유발되었는지 확인한 결과 CDDP군의 가자미근, 족척근의 근육무게 및 Type I, II 근섬유 횡단면적이 C군에 비해 유의하게 감소하여 근위축이 유발되었음이 확인되었

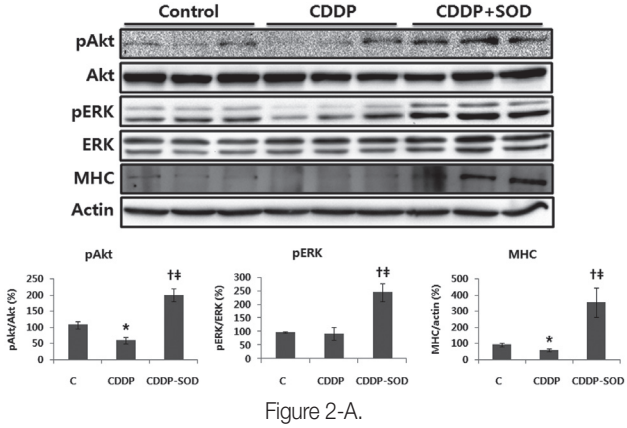


Figure 2-A.

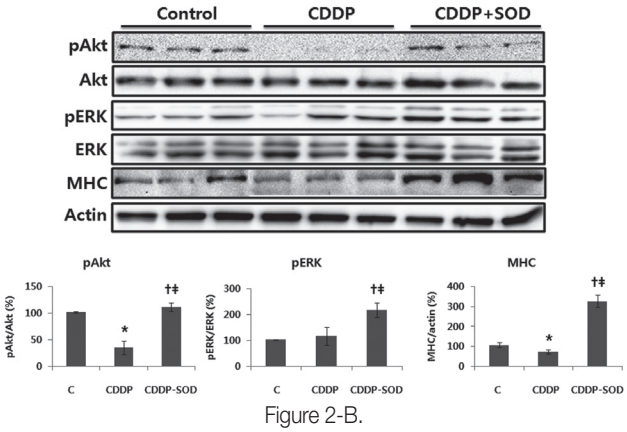


Figure 2-B.

*Significant difference between CDDP & C ($p<.05$);†Significant difference between CDDP-SOD & CDDP ($p<.05$);‡Significant difference between CDDP-SOD & C ($p<.05$); C=control (n=14); CDDP=cisplatin (n=14); CDDP-SOD=cisplatin with superoxide dismutase (n=14).

Figure 2. A. Expression of phosphorylated Akt, phosphorylated ERK and expression of MHC of soleus in C, CDDP and CDDP-SOD rats. B. Expression of phosphorylated Akt, phosphorylated ERK and expression of MHC of plantaris in C, CDDP and CDDP-SOD rats.

다. 이는 쥐에 시스플라틴을 투여한 결과 뒷다리근에 근위축이 유발되었음을 보고한 선행 연구 결과[7,10]의 연구 결과와 부합하였다.

본 연구에서 CDDP군의 회피 역치와 활동 평균 점수가 C군에 비해 낮았고, CDDP군의 식이섭취량은 C군에 비해 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 쥐에 시스플라틴을 투여 후 회피 역치가 감소하고 활동이 감소하여 근위축이 발생하였음을 보고한 선행 연구 결과[7]와 시스플라틴 투여로 유발된 식욕부진에 의해 뒷다리근에 근위축이 유발되었음을 제시한 선행 연구보고[10]와 일치하였다. 활동 및 식이섭취 저하는 근위축을 유발시키므로[7,10] 본 연구에서 활동과 식이섭취 저하가 근위축에 영향을 미친 것으로 볼 수 있다.

또한, 시스플라틴 투여한 CDDP군의 Akt 인산화 발현 정도가 C군에 비해 유의하게 작은 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 근육에서 Akt 경로 활성화는 단백 합성에 결정적인 인자이고, 시스플라틴은 Akt 경로를 억제하여 autophagy-lysosome 경로를 활성화시키므로[17,21] 본 연구에서 뒷다리근의 위축은 Akt 경로 억제를 통한 단백합성 억제와 autophagy-lysosome 경로 활성화에 의한 것이라고 설명된다.

이상의 결과를 토대로 본 연구에서 CDDP군의 가자미근, 족척근의 근육무게 및 TypeI, II 근섬유 횡단면적이 대조군에 비해 유의하게 감소한 것은 시스플라틴 투여로 인한 Akt 경로 억제 및 말초신경병증성 통증에 따른 활동저하와 식이섭취 저하에 의한 것임을 알 수 있다.

항산화제인 Cu/Zn SOD가 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축 경감에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 Cu/Zn SOD을 투여한 결과 CDDP-SOD군의 근육무게 및 TypeI, II 근섬유 횡단면적이 CDDP군에 비해 유의하게 큰 것으로 나타났다.

이와 같이 CDDP-SOD군의 뒷다리근 근위축이 경감된 것은 식이섭취량 증가에 의한 것으로 볼 수 있다. 근육의 단백합성은 식이섭취량에 따라 변화하므로[22] 본 연구에서는 식이섭취량 증가에 의해 근육의 단백합성이 증가하여 근육무게 및 TypeI, II 근섬유 횡단면적이 커진 것으로 설명할 수 있다. 또한, CDDP-SOD군의 사료섭취량이 CDDP군에 비해 많은 것은 Cu/Zn SOD의 항산화 작용에 의해 식욕부진과 같은 위장관계 부작용이 개선되어 나타난 결과로 설명될 수 있다.

본 연구에서 CDDP-SOD군의 실험기간 중의 총 활동 평균점수는 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다. CDDP-SOD군의 활동점수가 증가한 것은 Cu/Zn SOD의 항산화 효과에 따른 말초신경독성 감소로 활동이 증가된 것으로 생각될 수 있다. 활동이 증가할 경우 근육의 단백합성이 증가하여 근육비후(hypertrophy)가 일어난다는 선행 연구보고[23]를 토대로 활동증가가 뒷다리근 근위축 경감에 관여한 것으로 볼 수 있다.

본 연구 결과 CDDP-SOD군의 가자미근의 SOD 활성도는 CDDP군과 차이가 없었고 C군에 비해 증가하였으며, 족척근의 경우 CDDP군 및 C군과 차이가 없었다. Cu/Zn SOD를 투여한 군의 가자미근의 SOD 활성도가 높게 나타난 결과는 비복근에 긴장성 손상을 유발시킨 쥐에 Cu/Zn SOD를 투여한 결과 혈장의 SOD 활성도가 증가한 반면, 비복근의 손상정도가 감소하였다는 선행 연구 결과[18]와 유사하였다. 그러나 CDDP군에서도 SOD 활성도가 증가하였으며 SOD 활성도 증가가 생체 내 방어기전에 의한 것인지는 확인하지 못하였다. 따라서, Cu/Zn SOD에 의해 가자미근의 SOD 활성도가 증가한 것은 Cu/Zn SOD의 초과산화이온 제거 능력에 의해 가자미근 세포질의 초과산화이온이 감소한 것에 의한 것으로 생각할 수 있다. 그러나 생체내에서 항산화 작용의 증가는 초과산화이온 증가에 따른 방어기전에 의한 것일 수도 있고, 외부에서 투여한 항산화제에 의한 것일 수 있으므로[24] 해석에 신중을 기해야 한다.

본 연구에서는 근육 세포질의 초과산화이온의 함량을 간접적인 방법인 SOD 활성도로 측정하였다. 근육의 산화 스트레스를 직접 측정하여 SOD의 활성산소 제거 효과를 직접 관찰하지 못한 점과 면역 blot을 통해 Cu/Zn SOD가 근육내로 전달되었는지 확인하지 못한 점은 본 연구의 제한점으로 생각된다. 따라서, 추후 연구를 통해 Cu/Zn SOD가 산화 스트레스 감소에 미치는 영향과 Cu/Zn SOD의 근육내 전달 여부를 규명하는 연구가 이루어져야 할 것으로 본다.

족척근에서의 SOD 활성도가 CDDP군 및 C군과 차이가 없었던 본 연구 결과는 Cu/Zn SOD가 족척근에 미치는 영향을 관찰한 연구를 찾아보기 어려워 직접 비교는 어렵지만 트레드밀을 이용한 고강도 운동으로 산화 스트레스를 유발한 쥐에 에스트로겐을 투여하여 항산화 효과를 관찰한 결과 족척근에서 SOD와 glutathione peroxidase의 활성도에 변화가 없었음을 보고한 선행 연구 결과[25]와 유사하였다. 이처럼 Cu/Zn SOD 투여로 족척근의 SOD 활성도에 변화가 없었던 것은 족척근이 산화 스트레스에 상대적으로 저항성이 있기 때문[26]으로 설명될 수 있다.

본 연구에서 Cu/Zn SOD이 가자미근과 족척근의 Akt와 ERK의 인산화 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 CDDP-SOD군의 Akt 인산화 발현 및 ERK 인산화 발현이 CDDP군에 비해 유의하게 높은 것으로 나타났다.

SOD가 Akt의 인산화를 증가시키는 원인은 명확히 밝혀지지 않았으나, 이와 같이 Akt 인산화 발현이 높게 나타난 결과는 뇌허혈을 유발한 마우스에 Cu/Zn SOD의 생성을 증가시킨 결과 Akt의 활성화가 증가하였음을 보고한 선행 연구 결과[15]와 유사하였다. 또한, CDDP-SOD군의 인산화 ERK 발현이 증가한 것은 생체 내 실험은 아니지만 인간 제대정맥 내피세포에 방사선을 조사하여 산화 스트레스를 증가시키기 전·후로 Cu/Zn SOD를 투여한 결과 ERK의 인

http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371

산화가 증가하여 세포 생존율 및 혈관신생이 증가하였다는 연구보고[27]와 유사한 결과라고 생각한다.

이처럼 Akt와 ERK 인산화 발현이 모두 골격근에서 증가한 본 연구 결과는 Cu/Zn SOD 투여에 의한 뒷다리근의 근위축 경감에 신호전달 단백인 Akt와 ERK의 활성화가 관여함을 알 수 있다. 그러나 쥐에서 Cu/Zn SOD 생성을 억제한 결과 근력은 감소되었으나 Akt 활성화는 증가하였고 근위축은 유발되지 않았다는 선행 연구 결과[28]도 보고되고 있기 때문에 근위축 경감에는 본 연구에서 밝혀지지 않은 다른 요인들이 관여하고 있음을 배제할 수 없다.

이상으로 시스플라틴 투여에 의해 위장관계 부작용 및 말초신경계 손상 등 다양한 부작용이 유발될 뿐만 아니라 근위축도 초래된다는 연구 결과들이 보고되는 상황에서 본 연구는 Cu/Zn SOD투여가 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근 위축을 경감시킬 수 있다는 것을 밝혔다는 점에서 의의가 있다고 본다. 그러나 시스플라틴 투여에 의한 근위축을 경감시키기 위한 방안으로 Cu/Zn SOD 사용 시에는 항산화제에 의한 항산화 작용이 과다한 경우 세포의 재생과 증식을 억제할 수 있을 뿐 아니라[29] 암 세포 증식에도 영향을 미칠 수 있다는 점[30]을 고려해야 한다.

결 론

CDDP군의 체중, 총 사료섭취량, 회피 역치, 일일 활동 평균점수, 가자미근의 상대적 SOD 활성도, 가자미근과 족척근의 근육무게 및 Type I, II 근섬유 횡단면적이 C군에 비해 유의하게 작아 시스플라틴 투여로 뒷다리근에 근위축이 유발되었음을 확인하였다. 그리고 CDDP-SOD군의 체중, 총 사료섭취량, 회피 역치, 일일 활동 평균점수, 가자미근과 비복근의 근육무게 및 Type I, II 근섬유 횡단면적은 CDDP군에 비해 유의하게 큰 것으로 나타나 Cu/Zn SOD 투여가 식이섭취와 활동을 증가시켜 시스플라틴에 의해 유발된 뒷다리근의 근위축을 경감시켰음을 규명하였다. 또한, Cu/Zn SOD의 근위축 경감에 Akt와 ERK의 인산화가 관여하고 있음을 제시하고 있다. 본 연구는 간호연구 측면에서 시스플라틴에 의해 유발된 근위축을 경감시키는 방안 개발의 실증적인 근거를 제공한다는 점에서 의의가 있다고 본다.

이러한 결론을 토대로 임상적으로 시스플라틴 항암제를 투여하는 환자에게 발생한 근위축을 항산화제 투여로 경감시킬 수 있는지를 규명하는 중개연구가 수행되어야 함을 제언한다.

REFERENCES

1. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: Current status. Cancer Treatment Reviews. 2004;30(1):53-81. http://dx.doi.org/10.1016/s0305-7372(03)00139-7
2. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB. Mechanisms of Cisplatin nephrotoxicity. Toxins. 2010;2(11):2490-2518. http://dx.doi.org/10.3390/toxins2112490
3. Authier N, Gillet JP, Fialip J, Eschalier A, Coudore F. An animal model of nociceptive peripheral neuropathy following repeated cisplatin injections. Experimental Neurology. 2003;182(1):12-20.
4. Yakabi K, Sadakane C, Noguchi M, Ohno S, Ro S, Chinen K, et al. Reduced ghrelin secretion in the hypothalamus of rats due to cisplatin-induced anorexia. Endocrinology. 2010;151(8):3773-3782. http://dx.doi.org/10.1210/en.2010-0061
5. Gill JS, Windebank AJ. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. The Journal of Clinical Investigation. 1998;101(12):2842-2850. http://dx.doi.org/10.1172/jci1130
6. Yoo YS, Cho OH. Relationship between quality of life and nurse-led bedside symptom evaluations in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Asian Nursing Research. 2014;8(1):36-41. http://dx.doi.org/10.1016/j.anr.2013.11.002
7. Yang GS, Choe MA. Effect of anorexia and neuropathic pain induced by cisplatin on hindlimb muscles of rat. Journal of Korean Academy of Nursing. 2013;43(3):361-369. http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2013.43.3.361
8. Powers SK, Smuder AJ, Judge AR. Oxidative stress and disuse muscle atrophy: Cause or consequence? Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2012;15(3):240-245. http://dx.doi.org/10.1097/MCO.0b013e328352b4c2
9. Vera G, Castillo M, Cabezos PA, Chiarlone A, Martín MI, Gori A, et al. Enteric neuropathy evoked by repeated cisplatin in the rat. Neurogastroenterology and Motility. 2011;23(4):370-378. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01674.x
10. Kim JI, Choe MA. A comparison between effects of anorexia induced by consecutive low-dose cisplatin and high-dose cisplatin on hindlimb muscles of rats. Journal of Korean Biological Nursing Science. 2012;14(1):49-56.
11. Choe MA, An GJ, Koo BS, Jeon S. Effect of DHEA on recovery of muscle atrophy induced by parkinson's disease. Journal of Korean Academy of Nursing. 2011;41(6):834-842. http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2011.41.6.834
12. Castaneda C. Muscle wasting and protein metabolism. Journal of Animal Science. 2002;80(Suppl 2):E98-E105.
13. Hart PJ, Balbirnie MM, Ogihara NL, Nersissian AM, Weiss MS, Valentine JS, et al. A structure-based mechanism for copper-zinc superoxide dismutase. Biochemistry. 1999;38(7):2167-2178. http://dx.doi.org/10.1021/bi982284u
14. Kim W, Kim DW, Yoo DY, Chung JY, Hwang IK, Won MH, et al. Neuroprotective effects of PEP-1-Cu,Zn-SOD against ischemic neuronal damage in the rabbit spinal cord. Neurochemical Research. 2012;37(2):307-313. http://dx.doi.org/10.1007/s11064-011-0613-0
15. Noshita N, Sugawara T, Lewen A, Hayashi T, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. Stroke. 2003;34(6):1513-1518. http://dx.doi.org/10.1161/01.str.0000072986.46924.f4
16. Widegren U, Ryder JW, Zierath JR. Mitogen-activated protein kinase

signal transduction in skeletal muscle: Effects of exercise and muscle contraction. Acta Physiologica Scandinavica. 2001;172(3):227-238. http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-201x.2001.00855.x
17. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, Rossman R, Nunez L, Stitt TN, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. Nature Cell Biology. 2001;3(11):1009-1013. http://dx.doi.org/10.1038/ncb1101-1009
18. Li G, Feng X, Wang S. Effects of Cu/Zn superoxide dismutase on strain injury-induced oxidative damage to skeletal muscle in rats. Physiological Research. 2005;54(2):193-199.
19. Mead R. The design of experiments : Statistical principles for practical applications. 9th ed.. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1988. 587.
20. Baillet F, Housset M, Michelson AM, Puget K. Treatment of radiofibrosis with liposomal superoxide dismutase. Preliminary results of 50 cases. Free Radical Research Communications. 1986;1(6):387-394.
21. Fanzani A, Zanola A, Rovetta F, Rossi S, Aleo MF. Cisplatin triggers atrophy of skeletal C2C12 myotubes via impairment of Akt signalling pathway and subsequent increment activity of proteasome and autophagy systems. Toxicology and Applied Pharmacology. 2011;250(3):312-321. http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2010.11.003
22. Caso G, Garlick PJ, Ballou LM, Vosswinkel JA, Gelato MC, McNurlan MA. The increase in human muscle protein synthesis induced by food intake is similar when assessed with the constant infusion and flooding techniques. The Journal of Nutrition. 2006;136(6):1504-1510.
23. Munoz KA, Aannestad A, Tischler ME, Henriksen EJ. Skeletal muscle protein content and synthesis after voluntary running and subsequent unweighting. Metabolism. 1994;43(8):994-999.
24. Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. The Analyst. 2002;127(1):183-198.
25. Tiidus PM, Bombardier E, Hidiroglou N, Madere R. Estrogen administration, postexercise tissue oxidative stress and vitamin C status in male rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1998;76(10-11):952-960.
26. Rush JW, Green HJ, Maclean DA, Code LM. Oxidative stress and nitric oxide synthase in skeletal muscles of rats with post-infarction, compensated chronic heart failure. Acta Physiologica Scandinavica. 2005;185(3):211-218. http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-201X.2005.01479.x
27. Tominaga T, Hachiya M, Shibata T, Sakamoto Y, Taki K, Akashi M. Exogenously-added copper/zinc superoxide dismutase rescues damage of endothelial cells from lethal irradiation. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 2012;50(1):78-83. http://dx.doi.org/10.3164/jcbn.11-15
28. Zhang Y, Davis C, Sakellariou GK, Shi Y, Kayani AC, Pulliam D, et al. CuZnSOD gene deletion targeted to skeletal muscle leads to loss of contractile force but does not cause muscle atrophy in adult mice. FASEB Journal. 2013;27(9):3536-3548. http://dx.doi.org/10.1096/fj.13-228130
29. Salganik RI. The benefits and hazards of antioxidants: Controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. Journal of the American College of Nutrition. 2001;20(5 Suppl):464S-472S.
30. Akan Z, Garip AI. Antioxidants may protect cancer cells from apoptosis signals and enhance cell viability. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2013;14(8):4611-4614.

http://dx.doi.org/10.4040/jkan.2014.44.4.371