فیزیولوژی ورزشی شماره ۳۲، زمستان ۱۳۹۵. صص ۱۰۰-۸۵

اثر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن‌های BcL2 و miR-15 و پروتئین BcL2 بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان

اشرف امینی[۱]، عباسعلی گایینی[۲]، سیروس چوبینه[۳]، محمدرضا کردی[۴]، شعبان علیزاده[۵]

۱. استادیار فیزیولوژی ورزش دانشگاه صنعتی امیرکبیر*
۲. استاد فیزیولوژی ورزش دانشگاه تهران
۳. استادیار فیزیولوژی ورزش دانشگاه تهران
۴. دانشیار فیزیولوژی ورزش دانشگاه تهران
۵. دانشیار دانشگاه تهران، دکتری تخصصی هماتولوژی و بانک خون

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۳

چکیده

تمرین هوازی، رشد تومور سرطان پستان را کاهش می‌دهد. پژوهش حاضر، تغییر بیان ژن miR-15 و BcL2 و پروتئین BcL2 را به‌عنوان سازوکارهای مثبت ناشی از تمرین هوازی در سرطان پستان موردبررسی قرار داده است. بدین‌منظور، ۲۰ سر موش بالب سی ماده (پنج تا شش هفته‌ای با میانگین تودهٔ بدنی ۱۷ـ۱۶ گرم) با تزریق سلول‌های سرطانی MC4-L2 به سرطان مبتلا شدند. سپس، به‌صورت تصادفی به دو گروه ۱۰ نفری تمرین و کنترل تقسیم گردیدند. در ادامه و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، قربانی گشتند و نمونه‌های بافتی آن‌ها برداشته شد و در دمای ۷۰- درجه ذخیره گردید. شایان‌ذکر است که میزان بیان miR-15 و BcL2 بافت تومور به روش ریل تایم –پی‌سی‌ار و میزان بیان پروتئین BcL2 با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن و پروتئین BcL2 و نسبت رشد تومور، به‌شکل معناداری (P<0.001) در گروه تمرین درمقایسه با گروه کنترل کاهش یافته است و بیان miR-15 در گروه تمرین، افزایش معناداری را درمقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد (P<0.001). درمجموع، به‌نظر می‌رسد افزایش بیان ژن miR-15 و کاهش بیان ژن و پروتئین BcL2 ناشی از تمرین هوازی، در کاهش نسبت رشد تومور در گروه تمرین مؤثر بوده است.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، تمرین هوازی، miR-15 ، BcL2

* نویسندهٔ مسئول Email: aminiashraf@yahoo.com

مقدمه

سرطان پستان مهم‌ترین عامل نگران‌کنندهٔ سلامتی در زنان محسوب می‌شود؛ زیرا، شایع‌ترین نوع سرطان در آن‌ها می‌باشد و در کشورهای غربی در حدود یک سوم کل سرطان‌های زنان را تشکیل می‌دهد (۱). درمقابل عوامل مستعد ابتلا به سرطان پستان، عوامل معینی ممکن است نقش حفاظتی در برابر آن داشته باشند. پژوهش‌های فراگیر نشان می‌دهند که پس از تشخیص سرطان پستان، تمرین هوازی می‌تواند با کاهش عوارض سرطان و درنهایت، کاهش مرگ‌ومیر همراه باشد (۲). نتایج چند پژوهش نشان می‌دهد که فعالیت ورزشی می‌تواند رشد تومور را در مدل حیوانی سرطان پستان کاهش دهد (۶ـ۳). دراین‌راستا، بتوف[1] (۲۰۱۳) به بررسی تأثیر فعالیت ورزشی هوازی به‌عنوان روشی درمانی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان پرداخت (۴) و نشان داد که رشد تومور در گروه‌هایی که فعالیت ورزشی انجام داده بودند، نسبت به سایر گروه‌ها تا دو برابر کمتر می‌باشد. مورفی و همکاران[2] (۲۰۱۱) نیز کاهش حجم تومور را به‌دنبال فعالیت ورزشی هوازی در موش‌های سرطانی مشاهده کردند و آن را به کاهش عوامل التهابی نسبت دادند (۵). گزارش شده است که این کاهش التهاب، احتمالاً ریشه در کاهش رهایش سایتوکاین‌ها از قبیل اینترلوکین-شش (IL-6)[3] در پاسخ به انقباض عضلانی منظم دارد (۷). پژوهش‌های جدید نشان می‌دهند که شش هفته تمرین هوازی روی نوارگردان، رشد تومور در گروه تمرین را درمقایسه با گروه کنترل در حد معناداری کاهش داده است (۳،۶،۷). این پژوهش‌ها تغییرات رشد تومور ناشی از فعالیت ورزشی هوازی را به تغییرات مشاهده‌شده در برخی از میکرو ار ان ای ها (miRNAs)[4] مانند میر دویست و شش (miR-206)[5]، لت هفت (Let-7)[6] وmiR-21 نسبت داده‌اند. هرچند این نتایج نشان می-دهند که فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند خاصیت ضد توموری در بیماران مبتلا به سرطان پستان داشته باشد، سازوکارهای مولکولی درگیر هنوز به‌شکل کامل روشن نشده و نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. در پاسخ به تحریک خارجی مانند فعالیت ورزشی، بیان ژن می‌تواند از راه سازوکارهای متفاوتی مانند خاموش‌شدن بیان ژن توسط miRNA تنظیم شود (۹،۱۰). بیش از ۵۰ درصد از ژن-های miRNAs در نواحی ژنومیک همراه سرطان قرار گرفته‌اند (۱۱)؛ بنابراین، دیده شده است که miRNAs نقش مهمی در پاتوژنز انواع سرطان‌ها در انسان دارد. miRNAs از راه‌های گوناگون بر

1. Betof
2. Murphy
3. Interlukin-6
4. Micro RNAs
5. Micro RNA-206
6. Lethal-7a

فرایندهای بیولوژیکی تأثیر می‌گذارند؛ مانند تأثیر بر رشد، تمایز، مرگ سلولی[1]، بقا، پیری، متابولیسم و انتقال سیگنال (۱۵ـ۱۲). علاوه‌براین، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که miRNAs در سرطان‌ها بیان می‌شود و بسیاری از آن‌ها می‌توانند سرکوب‌کنندهٔ تومور یا آنکوژن[2] باشند (۱۶). به‌نظر می‌رسد miRNAs که توسط miR-15 کدگذاری می‌شود، تومور را سرکوب می‌کند؛ به‌طوری‌که حذف یا تنظیم کاهشی آن‌ها با لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)[3]، آدنوماس هیپوفیز[4] و کارسینومای[5] پروستات همراه می‌باشد (۱۷). همچنین، miR-15 می‌تواند از راه هدف قراردادن ژن‌های ضد مرگ سلولی[6] (BcL2) و Mcl-1[7]، آپوپتوز را افزایش دهد (۱۸،۱۹). در ژنوم انسان، چهار عضو خانوادهٔ miR-15 وجود دارد که همگی توالی مکمل 9-bp مانند BCL2 دارند که سازوکار تأثیر آن‌ها بر تنظیم بیان BcL2 را نشان می‌دهند. برنامه‌های نرم‌افزاری جدید بیانگر این هستند که ۲۲ miRNA می‌تواند BcL2 را هدف قرار دهد (۲۲ـ۲۰) که دراین‌میان، miR-15 و miR-16 بالاترین رتبه را دارند. همچنین، miR-15 سرکوب‌کنندهٔ طبیعی BcL2 به‌شمار می‌رود که می‌تواند به‌عنوان درمان تومورهایی که با بیش‌بیانی BcL2 همراه هستند، استفاده شود (۱۹).

BcL2 نقشی مرکزی را در برنامهٔ ژنتیکی رشد و بقای سلول‌های یوکاریوتی از مسیر مهار مرگ سلولی ایفا می‌کند (۲۳)؛ بنابراین، سرکوب‌کننده‌های BcL2 می‌توانند به‌عنوان روشی برای درمان سرطان از راه کاهش تأثیر مهاری BcL2 بر آپوپتوز استفاده شوند (۲۵). BcL2 پروتئین ضدمرگ سلولی است و متعلق به گروهی از پروتئین‌های وابسته به‌هم می‌باشد که تنظیم‌کنندگان اصلی مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول به‌شمار می‌روند (۲۳). با توجه به آثار مثبت فعالیت منظم هوازی بر کاهش رشد تومور، این نکته در ذهن پدیدار می‌شود که آیا فعالیت هوازی می‌تواند بر یکی از نشانگان ویژهٔ سرطان یعنی مرگ سلولی تأثیر داشته باشد؟ همچنین، با توجه به تأثیر مشهود miR-15 و BcL2 در فرایند آپوپتوز، این سؤال مطرح می‌شود که آیا تمرینات منظم هوازی بر بیان miR-15 و BcL2 تأثیر معناداری دارند؟

---

1. Apoptosis
2. Oncogene
3. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)
4. Pituitary Adenomas
5. Carcinoma
6. Antiapoptose
7. Myeloid Cell Leukemia Sequence 1 (BCL2-related): a member of the Bcl-2 family that enhances cell survival by inhibiting apoptosis

روش پژوهش

تعداد ۲۰ سر موش بالب سی[1] (پنج تا شش هفته‌ایی با میانگین تودهٔ بدنی ۱۷ـ۱۶ گرم) از مؤسسهٔ پاستور خریداری شدند و به حیوان‌خانهٔ دانشگاه تهران منتقل گشتند. جهت تطابق فیزیولوژیک موش‌ها، دورهٔ ۱۲ ساعتهٔ تاریکی ـ روشنایی رعایت گردید. دمای اتاق نیز بین ۲۴ـ۲۲ درجهٔ سلسیوس و رطوبت ۴۵ درصد حفظ شد. شایان‌ذکر است که غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود که به‌صورت آزاد و دراختیار[2] تا پایان پروتکل دردسترس موش‌ها قرار داشت.

سلول کارسینومای مجاری پستان گیرندهٔ استروژن مثبت(MC4L2)[3] از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد و در فلاسک T75 در محیطدی ام ایی ام/اف دوازده (DMEM/F-12)[4] با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی‌سلین ۱۰۰ ، استراپتومایسن ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی گرم و اف.بی.اس (FBS)[5] ۱۰ درصد کشت داده شد (۳). روند کشت بدین‌صورت بود که پس از پرکردن ۹۰ درصد از سطح فلاسک به‌وسیلهٔ سلول‌ها، مایع رویی برداشته شد و پس از شسستشو با PBS، در مرحلهٔ بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵ از کف پلیت سلول‌ها جدا گشت و پس از خنثی‌کردن آنزیم با محیط حاوی ۱۰ درصد FBS، کلیهٔ محتویات فلاسک داخل لولهٔ فالکون ریخته شد و در دور ۱۲۰۰ به‌مدت سه تا پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحلهٔ بعد، مایع رویی برداشته شد و پلاک سلولی در داخل محیط حاوی ۱۰ درصد FBS حل گردید. سپس، برای تعیین زنده‌ماندن و شمارش سلولی به‌ترتیب از تریپان‌بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد.

پس از کشت سلول‌های موردنظر، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس، پس از بی‌هوشی با مقدار مناسب کتامین[6] و زایلوزین[7] (۱۰ میلی‌گرم به یک میلی‌گرم)، یک میلیون سلول به‌صورت زیرجلدی به ناحیهٔ بالای ران سمت راست هر موش تزریق گردید.

در پروتکل تمرین، ابتدا و پیش از تزریق سلول‌های سرطانی، یک هفته آشناسازی با محیط (تمرین روی نوارگردان) انجام شد. سپس، موش‌ها به‌شکل تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تمرین و کنترل تقسیم شدند و تمرینات به‌مدت هشت هفته انجام گرفت؛ بدین‌صورت که تمرینات در هفتهٔ اول با سرعت ۱۶ متر در دقیقه آغاز گردید و درنهایت، در دو هفتهٔ آخر به ۲۲ متر در دقیقه رسید

1. Balb/c Mice
2. Libitum
3. Mammary Cell 4 Lactat2
4. Dulbecco’s Modified Eagle Medium
5. Fetal Bovine Serum
6. Ketamine
7. Xylazine

(۷۰ـ۵۵ درصد توان هوازی موش‌ها) (۳). همچنین، به‌منظور تعیین توان هوازی موش‌ها، آزمون ارزیابی توان هوازی انجام شد. روش تعیین توان هوازی بدین‌صورت بود که بعد از پنج دقیقه گرم‌کردن (۱/۸ متر در دقیقه)، سرعت نوارگردان هر سه دقیقه یک‌بار افزایش می‌یافت تا به حداکثر سرعت بیشینه (زمانی‌که موش‌ها دیگر نتوانستند با یک سرعت ثابت بدوند)رسید (۲۶) (جدول شمارهٔ یک).

جدول ۱ـ پروتکل تمرین هوازی برای گروه تمرین

دورهٔ تمرین	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحلهٔ آشناسازی	۱۰-۱۲	۳۰	۵
دو هفتهٔ اول	۱۶	۳۰	۵
دو هفتهٔ دوم	۱۸	۳۵	۵
دو هفتهٔ سوم	۲۰	۴۰	۵
دو هفتهٔ چهارم	۲۲	۴۵	۵

پس از تزریق سلول‌های سرطانی و پیدایش تومور، هر هفته حجم تومور محاسبه گشت. جهت سنجش حجم تومور از فرمول جونز[1]و همکاران (۲۰۱۰) $[V=1/2(L^2\times W)]$ استفاده شد (۲۷) و بزرگ‌ترین بعد تومور به‌عنوان طول (L)[2] و بعد دیگر (در زاویهٔ ۹۰ درجه) به‌عنوان عرض (W)[3] در نظر گرفته شد.

نسبت وزن قلب به وزن موش‌ها به‌منظور بررسی اثربخشی فیزیولوژیک تمرین هوازی به‌کار گرفته شد. وزن موش‌ها هر هفته و وزن قلب موش‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال، بلافاصله پس از کشتن موش‌ها سنجیده شد.

به منظور هموژنایز[4] بافت تومور، در پایان پروتکل و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، موش‌ها برای سنجش متغیرهای پژوهشی کشته شدند. جهت سنجش متغیرها، بلافاصله بافت تومور برداشته شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکروز) حذف گردید و قسمت رویی تومور در نیتروژن مایع فریز گشت و در دمای ۷۰- درجه نگهداری شد. سپس، در آزمایشگاه، حدود ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم بافت

1. Jones
2. Length
3. Width
4. Homogenize

تومور به‌همراه یک سی‌سی ترایزول در لولهٔ هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. در ادامه، مایع رویی برای استخراج RNA به لولهٔ جدید منتقل شد.

برای استخراج RNA تام، مراحل استخراج براساس دستورالعمل استفاده از ترایزول[1] اجرا شد. ازآن‌جایی‌که در روش مرسوم استخراج RNA با ترایزول، RNAs کوچک به‌خوبی استخراج نمی‌شود، به‌منظوراستخراج RNAs کوچک و miRNAs، پس از اضافه‌نمودن ترایزول، انکوبه‌نمودن در دمای۷۰- درجه به‌مدت یک شبانه‌روز انجام شد. سپس، مراحل بعدی استخراج به‌ترتیب صورت گرفت. قابل‌ذکر است که برای سنتز cDNA ژن BcL2، از کیت کیاژن با سری تولید[2]۲۰۵۳۱۱ استفاده شد و برای ساخت miR-15 cDNA ، کیت استراتاژن[3] با شماره شناسایی ۶۰۰۵۸۳[4] مورداستفاده قرار گرفت.

پروتئین BcL2 با استفاده از کیت الایزای با سری تولید ای.بی.آی.ان۴۱۵۴۰۱[5] از کمپانی آنتی بادی‌آنلاین آمریکا[6] و طبق دستورالعمل کیت انجام شد.

ریل تایم-پی سی ار: ابتدا با استفاده از آزمایش سریال غلظت، میزان غلظت بهینه cDNA و پرایمرهای مربوط به هر ژن به‌طور مجزا مشخص شد. شایان‌ذکر است که برنامهٔ ریل تایم - پی سی آر بر روی دستگاه کوربت برای miR-15 شامل: °۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل °۹۵ به‌مدت ۱۰ ثانیه، °۶۰ به‌مدت ۱۵ ثانیه و °۷۲ به‌مدت ۲۰ ثانیه و نیز برای ژن BcL2 شامل: °۹۵ به‌مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل °۹۵ به‌مدت ۱۵ ثانیه و °۶۰ به‌مدت یک دقیقه بود. از U6 و GAPDH نیز به‌عنوان ژن کنترل استفاده گردید. پرایمرهای طراحی‌شده در جدول شمارهٔ دو آمده است.

جدول ۲ـ پرایمرهای مورداستفاده

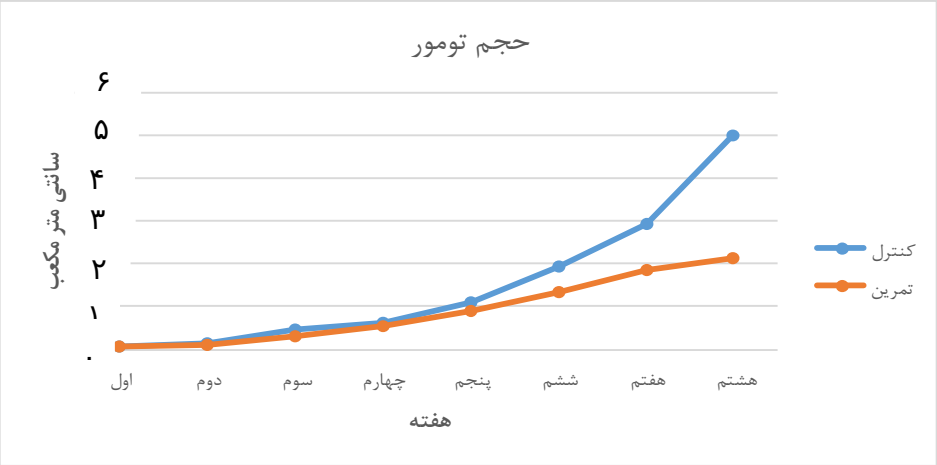
	کد	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی	دمای ذوب
U6	RNU6-1 ID: 26827	GCGCGTCGTGAAGCGTTC	G TGCAGGGTCCGAGGT	60
miR-15	MIR15A ID: 406948	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG		60
BcL2	BCL2 ID: 596	CCTCCCGCCTTCTACAGGT	CACACGGCACAGTAGCGAG	60
GAPDH	GAPDH ID: 2597	TCAACAGCAACTCCCACTCTTCC	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	60

1. Trizol
2. Qiagen Kit
3. Stratagene
4. Stratagene Kit, CAT No: 600583
5. Elisa Kit, CAT NO: ABIN415401
6. Antibodies-Online USA Company

داده‌های خام به‌دست‌آمده از روش ریل تایم- پی سی آر با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید و به‌منظور تجزیه‌وتحلیل آماری و میزان بیان ژن‌های موردنظر از نرم‌افزار اس.پی.اس.اس ۱۶[1] استفاده شد. همچنین، برای مقایسهٔ مقادیر BcL2، نسبت رشد تومور و وزن قلب موش‌ها در دو گروه تمرین و کنترل، آزمون تی مستقل مورداستفاده قرار گرفت. از نرم‌افزار اکسل[2] نیز برای ترسیم نمودارها استفاده شد.

نتایج

نتایج نشان می‌دهند که حجم تومور در هشت هفته در دو گروه افزایش داشته است (شکل شمارهٔ یک)، اما شیب رشد تومور در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل کمتر می‌باشد (P=0.001).



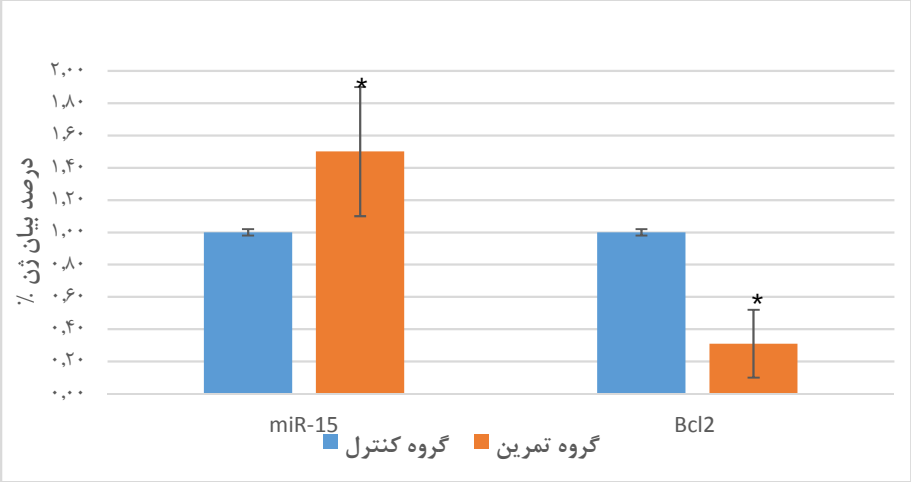
شکل ۱ــ روند رشد تومور در دو گروه پژوهش (سانتی‌متر مکعب)

1. SPSS 16
2. EXCEL

از نسبت وزن قلب به وزن موش‌ها در روز کشته‌شدن به‌عنوان شاخص اثربخشی فعالیت ورزشی هوازی استفاده شد (شکل شمارهٔ دو). نتایج آزمون تی مستقل نشان می‌دهد که اختلاف معناداری بین دو گروه در این شاخص وجود دارد (P<0.009، f=3.983)؛ بنابراین، کارایی فعالیت ورزشی هوازی مشهود می‌باشد. علاوه‌براین، میانگین وزن موش‌ها قبل از شروع پروتکل برابر با (۱۶±۱/۱۵) بوده و پس از اجرای پروتکل در گروه تمرین برابر با (۱۹±۱/۵) و در گروه کنترل برابر با (۲۰/۹۹±۱/۵۷) می‌باشد.

شکل ۲ـ نسبت وزن قلب به وزن بدن موش‌ها

براساس یافته‌ها، بیانmiRNA-15 در گروه تجربی، ۱/۵ برابر درمقایسه با گروه کنترل افزایش داشته است. نتایج حاصل از تی مستقل نیز نشان‌دهندهٔ تغییرات معنادار بیان ژن، میزان پروتئین BcL2 و حجم تومور بین دو گروه می‌باشد (P=0.001) (شکل شمارهٔ سه و جدول چهار). علاوه‌براین، گروه تمرین درمقایسه با گروه کنترل با افزایش معنادار miR-15 (P=0.001) و کاهش معنادار BcL2 (P=0.001) همراه بوده است. قابل‌ذکر است که مقادیر پروتئین BcL2 در گروه کنترل برابر با (۵۳۶۹ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) و در گروه تمرین هوازی برابر با (۱۹۴۴/۵۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد. همچنین، نتایج آزمون تی مستقل کاهش معنادار پروتئین BcL2 در گروه تمرین هوازی درمقایسه با گروه کنترل را نشان می‌دهد (t=3.93،P=0.001).



شکل ۳ـ میزان بیان ژن‌های BcL2 و miR-15 در دو گروه پژوهش

جدول ۳ـ میانگین پروتئین BCL2 پیکوگرم بر میلی‌لیتر

گروه ورزش	۱۹۴۴/۵ ۹۰۹±/۸
گروه کنترل	۵۳۶۹/۰۱ ۱۵۵۱±/۰۹

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های حاصل از حجم تومور، پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند روند پیشروی سرطان پستان را کاهش دهد و با توجه به افزایش بیان ژن miR-15 و کاهش بیان ژن و پروتئین BcL2، به‌نظر می‌رسد که حلقهٔ ارتباطی بین این سه عامل تنظیم‌کننده می‌تواند به‌عنوان سازوکاری نوین برای ایجاد آثار مثبت فعالیت ورزشی هوازی بر سرطان پستان شناخته شود. در سال‌های اخیر، در کشورهای پیشرفته حوزه‌های جدیدی در رابطه با فعالیت بدنی شکل گرفته است که با رویکرد درمانی به آن نگاه می‌کنند؛ برای‌مثال، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فعالیت ورزشی منظم می‌تواند به کاهش حجم تومور منجر گردد (۵،۲۸،۳۰) که این امر در پژوهش حاضر نیز تأیید گردید؛ به‌گونه‌ای که رشد تومور به‌شکل معناداری در گروه تمرین کمتر بود (P=0.0001). هم‌سو با پژوهش حاضر، نتایج پژوهش بتوف (۲۰۱۳) نیز نشان داد که فعالیت ورزشی هوازی

به‌عنوان یک روش درمانی می‌تواند رشد تومور را در گروه‌هایی که پس از سرطانی‌شدن، فعالیت ورزشی انجام داده بودند درمقایسه با سایر گروه‌ها تا دو برابر کاهش دهد؛ هرچند که در این پژوهش علت آن ذکر نشده است (۴). زینسکی[1] و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان دادند که فعالیت شدید با اثرگذاری بر ریزمحیط تومور، بر رشد تومور اثر می‌گذارد و به تأخیر رشد آن منجر می‌شود (۲۲). علاوه‌براین، ورما[2] و همکاران (۲۰۰۹) کاهش حجم تومور ناشی از فعالیت ورزشی را با کاهش آنژیوژنز، کاهش بیان VEGF، مقادیر اریتروسیت، لاکتات ریزمحیط تومور و افزایش اکسیژن و نیتریک اکساید مرتبط می‌دانند (۳۱). مورفی و همکاران (۲۰۱۱) نیز عنوان کردند که فعالیت ورزشی روی نوارگردان موجب کاهش معنادار تعداد و حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود (۳). در پژوهش حاضر، علت کاهش نسبت رشد تومور، ریشه در سرکوب بیان ژن BcL2 و افزایش بیان miRNA-15 دارد. این پژوهش بیانگر این است که میزان بیان miRNA-15 در گروه تمرین درمقایسه با گروه کنترل در حد معناداری (P=0.001) افزایش یافته است. miRs، RNAs غیرکدگذار کوچکی است که بیان ژن را به‌شکل منفی در سطح رونویسی، پیش‌ترجمه و پس از ترجمه تنظیم می‌کند (۳۲). بسیاری از میرها با توجه به جایگاه قرارگیری و نیم‌رخ بیان خود، نقش‌های مهمی را در سرطان ایفا می‌کنند (۱۱،۳۳،۳۴). تغییرات ژنتیکی مانند فقدان همیزیگوس و هوموزیگوس در ۱۳کیو ۱۴/۳[3] در بیش از نیمی از موارد سرطان‌های مختلف که شامل تواتر غیرنرمال کروموزومی بودند شناسایی شده است (۳۵،۳۶). بیش از نیمی از تمام miRs در مناطق ژنومی وابسته به سرطان قرار دارند (۳۳،۳۴). منطقه‌ای که به‌طور مکرر در سرطان‌ها دچار تغییر می‌شود، ناشی از جهش یا بیان بی‌مورد در مقادیر miRs می‌باشد (۱۱،۳۷). بیان غیرطبیعی miRs موجب تغییر در بیان ژن‌های کدکنندهٔ پروتئین‌هایی می‌شود که در تومورزایی و سرکوب تومور نقش دارند و سرطان‌های مختلف را به‌وجود می‌آورند (۱۱،۳۸). نتایج حاصل از پژوهش‌هایی که درمورد تومورهای جامد انجام شده‌اند نشان می‌دهد که miR-15 در سلول‌های تومور حذف گشته و یا کاهش یافته است (۳۹،۴۰). پژوهش‌های جدید نشان می‌دهند که miRNA-15 در بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان خون (۴۱)، سرطان پروستات (۴۲)، سارکومای استخوانی (استئوسارکوما)[4] (۴۳)، تومورهای اندروژنیک کراتوسیستیک[5] (۴۴)، ادنوماس هیپوفیز (۳۹،۴۰) و سرطان پستان (۴۵) نقش تنظیم کاهشی دارند. این داده‌ها این فرضیه را پررنگ می‌کنند که miR-15 مانند

1. Zielinski
2. Verma
3. 13q14.3
4. Osteo Sarcoma
5. Androgenic Keratocystic

سرکوب‌کنندهٔ تومور عمل می‌کند و این کاهش در تومورزایی شرکت دارد. miR-15 در اهداف ژنی گوناگونی که در تکثیر و بقا سلول نقش دارند از جمله سی.سی.ان.دی.یک[1](CCND1) ، ام.آر.ان.ای ونت سه ای (WNTa mRNA)[2], ژن کدکننده سایکلین ای یک[3] (CCNE1) و BcL2 دخالت دارند. حذف miRNA-15 موجب هایپوپلازیا[4] پروستات با تنظیم افزایشی CCND1 و Wnt3a شده است که نشان می‌دهد فقدان miRNA-15 موجب ایجاد حالت پاتولوژیک می‌شود (۳۹). همچنین، miR-۱۵ با اتصال به جایگاه هدف خود در منطقهٔ ترجمه نشدهٔ ۳' (3'-UTR) CCNE1، موجب تنظیم کاهشی CCNE1 در سطح mRNA و پروتئین آن در سلول‌های سرطان پستان وابسته به گیرندهٔ استروژن مثبت می‌شود. درنتیجه، منجر به مهار رشد سلولی، سرکوب مهاجرت و توقف چرخهٔ سلولی می‌گردد (۴۶). علاوه‌براین، بیش‌بیانی miRNA-15 موجب کاهش بیان BcL2 و درنتیجه، آپوپتوز در سلول‌های MCF7 سرطان پستان می‌شود (۴۵). علاوه‌براین، ابزارهای بیوانفورماتیک نشان می‌دهند که توالی miRNA-15 و mRNA BcL2، کاملاً هومولوگ[5] یکدیگر می‌باشد و این امر نشان می‌دهد که BcL2، یکی از اهداف پس‌ترجمه‌ای miRNA-15 است (۱۹). BcL2 نیز آنکوژن مرکزی در برنامهٔ ژنتیکی سلول‌های یوکاریوت می‌باشد که با مهار مرگ سلولی، بقای سلول را افزایش می‌دهد (۲۳). بیش‌بیانی پروتئین BcL2 در سرطان‌های مختلف دیده شده است (۲۴). پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت ورزشی هوازی موجب کاهش معنادار بیان ژن BcL2 و میزان پروتئین آن در سلول‌های سرطان پستان شده است. همچنین، miRNA-15 با تأثیر پس‌ترجمه‌ای بر BcL2 موجب تنظیم کاهشی آن می‌شود (۱۹). کاهش میزان پروتئین BcL2 مشاهده‌شده در پژوهش حاضر می‌تواند ریشه در miRNA-15 داشته باشد که در اثر تمرین هوازی افزایش یافته است. علاوه‌براین، miRNA-15 با تأثیر پس‌ترجمه‌ای بر BcL2 موجب تنظیم کاهشی آن می‌شود (۱۹). شایان‌ذکر است که بیش‌بیانی ژن BcL2 با حذف یا تنظیم کاهشی miRNA-15 در نمونه‌های سرطان‌های مختلف همراه بوده است و به‌نظر می‌رسد که افزایش BcL2 ریشه در کاهش miRNA-15 داشته است و بیان آن‌ها هم‌بستگی معکوسی با یکدیگر دارند (۱۹،۳۲،۴۷). پژوهش‌های حیوانی نشان داده‌اند که تأثیر پس‌ترجمه‌ای miRNA-15 بر BcL2، نقش مهمی را در تنظیم آپوپتوز ایفا می‌کند. در سلول‌های سرطانی فاقد miR-15 ، افزودن miRNA-15 موجب شروع

1. Official HGNC Gene Name
2. Wnt3a MicroRNA
3. Official Cyclin E1 Gene Name
4. Hypoplasia
5. Homolog

آپوپتوز و سرکوب تومورزایی شده است (۱۹)؛ بنابراین، تمرین هوازی با تأثیر کاهشی بر بیان ژن و میزان پروتئین BcL2 که می‌تواند ناشی از اثر افزایشی تمرین هوازی بر بیان miRNA-15 باشد، در کاهش رشد سلول‌های سرطانی نقش دارد. برآیند این تغییرات مسلماً کاهش رشد تومور و یا تأخیر در رشد تومور می‌باشد. با توجه به مطالب ذکرشده مشخص می‌شود که فعالیت ورزشی، آثار مفیدی بر درمان سرطان پستان و یا بیماری‌های ثانویهٔ همراه با سرطان دارد، اما تاکنون پژوهش‌های اندکی سازوکارهای مولکولی و سلولی و اثرات مفید فعالیت ورزشی بر بافت تومور سرطان پستان را بررسی کرده‌اند و اصولاً مسیرهای پیام‌رسانی و سازوکارهای اثربخش فعالیت ورزشی در بهبود سرطان مشخص نمی‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که فعالیت هوازی می‌تواند بر وضعیت آپوپتوزی درون سلول سرطانی اثرگذار باشد؛ به‌طوری‌که فعالیت‌های ورزشی هوازی می‌تواند با اثر افزایشی در بیان miRNA-15 و اثر کاهشی بر بیان ژن و میزان پروتئین BcL2 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان وابسته به هورمون، به‌عنوان سازوکار نوینی در بیان اثرات مثبت فعالیت ورزشی در روش‌های درمانی سرطان پستان در نظرگرفته شود.

پیام مقاله: یافته‌های این پژوهش بیان می‌کنند که تمرین منظم هوازی می‌تواند به‌عنوان یک روش درمانی مکمل در کنار سایر روش‌های درمانی سرطان پستان به‌کار گرفته شود، اما برای درک بهتر سازوکارهای مولکولی و سلولی درگیر در ارتباط با اثرات مفید تمرینات منظم ورزشی بر بافت تومور در سرطان پستان، مطالعات بیشتری موردنیاز می‌باشد. ذکر این نکته ضرورت دارد که سنجش پروتئین Bcl2 از ویژگی‌های برجستهٔ این مقاله می‌باشد.

منابع

1. Kruk J, Aboul-Enein H Y. Psychological stress and the risk of breast cancer: A case–control study. Cancer Detection and Prevention. 2004; 28(6): 399-408.
2. Na H K, Oliynyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. Annals of the New York Academy of Sciences. 2011; 1229(1): 176-83.
3. Amani-Shalamzari S, Aghaalinejad H, Alizadeh S, Kazemi A, Saei M A, Minayi N, et al. The effect of endurance training on the level of tissue IL-6 and VEGF in mice with breast cancer. Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences. 2014; 16(2): 10- 21. (In Persian).
4. Betof A S, Dewhirst M W, Jones L W. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression:A translational perspective. Brain, Behavior, and Immunity. 2013; 30(Suppl): 75-87.
5. Murphy E A, Davis J M, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. Cytokine. 2011; 55(2): 274-9.
6. Mirakhori Z, Kordi M R, Gaeini A A, Alizadeh SH, Anoosheh L, Amani S, et al. The effect of aerobic training on plasma estradiol and miR-206 and ERα expression in mice

with breast cancer. Iranian Quarterly Journal of Breast Diseases. 2015; 7(4): 23-32. (In Persian).
7.Woods J A, Vieira V J, Keylock K T. Exercise, inflammation, and innate immunity. Immunology and Allergy Clinics of North America. 2009; 29(2): 381-93.
8. Anoosheh L, Kordi M R, Gaeini A A, Mahdian R, Mirakhori A, Amani S, et al. The effects of aerobic training on microRNA let-7a expression and levels of tumor tissue IL-6 in mice with breast cancer. 2014, 7(3): 12-9. (In Persian).
9. Fernandes-Silva M M, Carvalho V O, Guimarães G V, Bacal F, Bocchi E A. Physical exercise and microRNAs: New frontiers in heart failure. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2012; 98(5): 459-66.
10. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst J L, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Research. 2004; 14(10a): 1902-10.
11. Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers. Nature Reviews Cancer. 2006; 6(11): 857-66.
12. Inui M M G, Piccolo S. MicroRNA control of signal transduction. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010; 11(4): 252-63.
13. Chivukula R R, Mendell J T. Circular reasoning: MicroRNAs and cell-cycle control. Trends in Biochemical Sciences. 2008; 33(10): 474-81.
14. He L, Hannon G J. MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation. Nature Reviews Genetics. 2004; 5(7): 522-31.
15. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004; 431(7006): 350-5.
16. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: Short RNAs go a long way. Cell. 2009; 136(4): 586-91.
17. Aqeilan R, Calin G, Croce C. miR-15 a and miR-16-1 in cancer: Discovery, function and future perspectives. Cell Death & Differentiation. 2010; 17(2): 215-20.
18. Calin G A, Cimmino A, Fabbri M, Ferracin M, Wojcik S E, Shimizu M, et al. miR-15 a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2008; 105(13): 5166-71.
19. Cimmino A, Calin G A, Fabbri M, Iorio M V, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005; 102(39): 13944-9.
20. Lewis B P, Burge C B, Bartel D P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005; 120(1): 15-20.
21. Krek A, Grün D, Poy M N, Wolf R, Rosenberg L, Epstein E J, et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nature Genetics. 2005; 37(5): 495-500.
22. John B, Enright A J, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks D S. Human microRNA targets. PLoS Biology. 2004; 2(11): 363.
23. Cory S, Adams J M. The BcL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer. 2002; 2(9): 647-56.
24. Sánchez-Beato M, Sánchez-Aguilera A, Piris M A. Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas. Blood. 2003; 101(4): 1220-35.

25. Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl-2 as a chemosensitizer for cancer therapy. Cancer. 2004; 101(11): 2491-502.
26. Hoydal M A, Wisloff U, Kemi O J, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training. European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. 2007; 14(6): 753-60.
27. Jones L W, Viglianti B L, Tashjian J A, Kothadia S M, Keir S T, Freedland S J, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. Journal of Applied Physiology. 2010; 108(2): 343-8.
28. Aghaalinejad H, Tofighi A, Zahir M H, Mahdavi M, Shahrokhi S. The effect of continuous aerobic trainning on HSP70 levels in mice with breast cancer.Olampic. 2008; 16(2): 75-86. (In Persian).
29. Zielinski M R, Muenchow M, Wallig M A, Horn P L, Woods J A. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. Journal of Applied Physiology. 2004; 96(6): 2249-56.
30. Amani-shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib Z K, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2014; 17(4): 231-6. (In Persian).
31. Verma V K, Singh V, Singh M P, Singh S M. Effect of physical exercise on tumor growth regulating factors of tumor microenvironment: Implications in exercise-dependent tumor growth retardation. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2009; 31(2): 274-82.
32. Xia L, Zhang D, Du R, Pan Y, Zhao L, Sun S, et al. MiR-15b and miR-16 modulate multidrug resistance by targeting BCL2 in human gastric cancer cells. International Journal of Cancer. 2008; 123(2): 372-9.
33. Sevignani C, Calin G A, Siracusa L D, Croce C M. Mammalian microRNAs: A small world for fine-tuning gene expression. Mammalian Genome. 2006; 17(3): 189-202.
34. Calin G A, Sevignani C, Dumitru C D, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2004; 101(9): 2999-3004.
35. Chiorazzi N, Rai K R, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. New England Journal of Medicine. 2005; 352(8): 804-15.
36. Dong J T, Boyd J C, Frierson H F. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. The Prostate. 2001; 49(3): 166-71.
37. Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. Nature Reviews Cancer. 2006; 6(4): 259-69.
38. Noguchi S, Mori T, Hoshino Y, Maruo K, Yamada N, Kitade Y, et al. MicroRNA-143 functions as a tumor suppressor in human bladder cancer T24 cells. Cancer Letters. 2011; 307(2): 211-20.
39. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15 a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nature Medicine. 2008; 14(11): 1271-7.

40. Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli M C, Degli Uberti E C. MiR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. Journal of Cellular Physiology. 2005; 204(1): 280-5.
41. Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvalli V K, Wierda W G, et al. Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2012; 119(5): 1162-72.
42. Musumeci M, Coppola V, Addario A, Patrizii M, Maugeri-Sacca M, Memeo L, et al. Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15 a and miR-16 in prostate cancer. Oncogene. 2011; 30(41): 4231-42.
43. Cai C K, Zhao G Y, Tian L Y, Liu L, Yan K, Ma Y L, et al. miR-15a and miR-16-1 downregulate CCND1 and induce apoptosis and cell cycle arrest in osteosarcoma. Oncology Reports. 2012; 28(5): 1764-70.
44. Diniz M G, Gomes C C, de Castro W H, Guimarães A L S, De Paula A M B, Amm H, et al. miR-15 a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors. Cellular Oncology. 2012; 35(4): 285-91.
45. Yang J, Cao Y, Sun J, Zhang Y. Curcumin reduces the expression of Bcl-2 by upregulating miR-15 a and miR-16 in MCF-7 cells. Medical Oncology. 2010; 27(4): 1114-8.
46. Luo Q, Li X, Li J, Kong X, Zhang J, Chen L, et al. miR-15 a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. International Journal of Oncology. 2013; 43(4): 1212-8.
47. Cittelly D M, Das P M, Salvo V A, Fonseca J P, Burow M E, Jones F E. Oncogenic HER2Δ16 suppresses miR-15 a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. Carcinogenesis. 2010; 31(12): 2049-57.

استناددهی

امینی اشرف، گایینی عباسعلی، چوبینه سیروس، کردی محمدرضا، علیزاده شعبان. اثر هشت هفته تمرین هوازی بر بیان ژن‌های BcL2 و miR-15 و پروتئین BcL2 بافت تومور موش های مبتلا به سرطان پستان. فیزیولوژی ورزشی. زمستان ۱۳۹۵؛ ۸(۳۲): ۸۵-۱۰۰.

Amini. A, Gaeini. A, Chobineh. S, Kordi. M. R, Alizadeh. S. The Effects of Aerobic Training on Expression of BcL2 and miR-15 and BcL2 Protein in Tumor Tissue in Mice with Breast Cancer. Sport Physiology. Wintre 2017; 8 (32): 85-100.

The Effects of Aerobic Training on Expression of Bcl-2 and miR-15 and Bcl-2 Protein in Tumor Tissue in Mice with Breast Cancer

A. Amini[1], A. Gaeini[2], S. Chobineh[3], M.R. Kordi[4], S. Alizadeh[5]

1. Assistance Professor, Amirkabir University of Technology*
2. Professor, University of Tehran
3. Assistance Professor, University of Tehran
4. Associated Professor, University of Tehran
5. Assistance Professor, University of Tehran

Received: 2015/09/07 **Accepted: 2016/01/13**

Abstract

Aerobic training reduces breast cancer tumor growth. This study evaluated the expression of Bcl-2, miR-15, and Bcl-2 protein as a positive mechanism induced by aerobic training. Twenty BALB/c mice (5–6 weeks, 16–17 g) were injected with MC4-L2 mammary cancer cells. Then, they were randomly divided to exercise and control groups (n=10) and 48 hours after the last exercise session, they were scarified and blood and tissue samples were collected and stored in -70°C. Expression of miR-15 and Bcl-2 were analyzed with Real- time PCR and ELISA. The expression level of Bcl-2 gene and protein as well as and tumor growth were significantly decreased in exercise group compared with control group (P<0.001). Also, miR-15 expression increased significantly in exercise group compared with control group (P<0.001). Overall, it seems that overexpression of miR-15 and decreased expression of Bcl-2 gene and protein induced by aerobic exercise training was effective in reducing tumor growth rate.

Keywords: Breast Cancer, Aerobic Training, MiR-15, Bcl-2

* Corresponding Author Email:aminiashraf@yahoo.com