

## اثر تمرین هوازی بر بیان ژن‌های *Nf-kB*، *Lin28B*، میکرو RNA *let-7a* و سطوح اینترلوکین-۶ بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان

لیلا انوشه<sup>۱</sup>، محمدرضا کردی<sup>۲</sup>، عباسعلی کاینی<sup>۳</sup>، رضا مهدیان<sup>۴</sup>، زهرا میرآخوری<sup>۵</sup>،  
صادق امانی شلمزاری<sup>۶</sup>

۱. دکترای دانشگاه تهران

۲. دانشیار دانشگاه تهران\*

۳. استاد دانشگاه تهران

۴. استادیار انستیتو پاستور ایران

۵. عضو هیات علمی دانشگاه صنعتی امیرکبیر

۶. دکترای دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۱

### چکیده

هدف از پژوهش حاضر، تعیین اثر شش هفته تمرین هوازی بر بیان *Nf-kB*، *Lin28B*، میکرو RNA *let-7a* و اینترلوکین-۶ بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود. تعداد ۲۰ سر موش بلب سی ماده چهار تا پنج هفته‌ای با میانگین وزن ۱۷ گرم، با تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی وابسته به گیرنده استروژن MC4-L2 به سرطان پستان مبتلا شده و به دو گروه ۱۰ تایی تومور - تمرین (TT) و تومور - کنترل (TC) تقسیم شدند. گروه تومور - تمرین به مدت شش هفته، پنج روز در هفته تمرین هوازی با شدتی برابر با ۱۴ تا ۱۸ متر بر دقیقه انجام دادند. موش‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، قربانی شدند و نمونه‌های بافتی، برداشته و در دمای ۷۰- درجه ذخیره شدند. میزان بیان ژن‌های *Nf-kB*، *Lin28B* و میکرو RNA *let-7a* به روش Real time - PCR و *IL-6* به روش الایزا اندازه‌گیری شد. آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر برای بررسی حجم تومور و آزمون تی مستقل برای بررسی *IL-6* به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری *Nf-kB*، *Lin28B* و *let-7a* توسط نرم‌افزار REST انجام شد. حجم تومور، بیان ژن‌های *Nf-kB* و *Lin28B* و سطوح *IL-6* در گروه TT نسبت به گروه TC کاهش یافت؛ اما بیان ژن *let-7a* افزایش معناداری داشت ( $P < 0.05$ ). در سرطان پستان، حلقه باز خوردی مثبت متشکل از *Nf-kB*، *Lin28B*، میکرو RNA *let-7a* و *IL-6* فعال می‌شود. به نظر می‌رسد با توجه به اثر کاهشی تمرین هوازی بر این مدار تنظیمی و حجم تومور، این نوع تمرین می‌تواند به عنوان روش درمانی مکمل در کنار سایر روش‌های درمانی سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن به کار گرفته شود.

**واژگان کلیدی:** سرطان پستان، تمرین هوازی، *Nf-kB*، *Lin28B*، میکرو RNA *let-7a*

## مقدمه

سرطان یکی از مشکلات اصلی بهداشتی در سراسر جهان است و از مهم‌ترین علت‌های مرگ‌ومیر در کودکان و بزرگسالان به‌شمار می‌رود. این بیماری در انواع مختلفی بروز می‌کند و بالغ بر ۲۰۰ بیماری را شامل می‌شود (۱) که سرطان پستان یکی از مهم‌ترین موارد است. امروزه، سرطان پستان مهم‌ترین عامل تهدیدکننده سلامتی در زنان است؛ زیرا، شایع‌ترین نوع سرطان در زنان محسوب می‌شود (۲). سرطان پستان چندین زیرنوع مولکولی اصلی دارد که در یک تقسیم‌بندی آن‌ها را به سرطان‌های وابسته و غیروابسته به گیرنده استروژن طبقه‌بندی می‌کنند. اکثر سرطان‌های پستان، تومورهای اپی-تلیالی هستند که از سلول‌های آستر مجراها و یا لوبول‌های پستان ناشی می‌شوند و اصطلاحاً، گیرنده آلفای استروژن (ER) مثبت نامیده می‌شوند (۳).

مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند بین فعالیت ورزشی و سرطان پستان رابطه نزدیکی وجود دارد؛ اگرچه، کمبود مطالعات تجربی کنترل‌شده که رابطه موجود و سازوکارهای درگیر را آزمایش کرده باشند و نیز نتایج ضدونقیض مطالعات موجود، اساس وجود این رابطه را تضعیف می‌کنند (۴-۶). تامسون و همکارانش (۱۹۹۷) نشان دادند شدت ورزش، مهم‌ترین عاملی است که اثر حمایتی آن را منعکس می‌کند. شدت متوسط تمرینات هوازی برای بیماران سرطانی، شدت مطلوب محسوب می‌شود (۷). صالحیان و همکارانش (۱۳۹۱) گزارش دادند حجم تومور به‌دنبال شش هفته تمرین هوازی در موش‌های BALB/c مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد (۸). درحالی‌که، زیلینسکی<sup>۱</sup> و همکارانش (۲۰۰۴) بیان کردند تمرینات هوازی، چگالی ماکروفاژها و نوتروفیل‌های درون توموری را که در تولید سایتوکاین‌های رگ‌زا نقش دارند کاهش می‌دهند و منجر به کاهش حجم تومور می‌شوند (۵). مورفی<sup>۳</sup> و همکارانش (۲۰۱۱) نیز کاهش حجم تومور را به‌دنبال تمرینات هوازی در موش‌های سرطانی مشاهده کردند و آن را به افت عوامل التهابی نسبت دادند (۶). گفته می‌شود که این کاهش التهاب، احتمالاً در اثر کاهش رهایش سایتوکاین‌ها از قبیل IL-6 در پاسخ به انقباض عضلانی منظم است (۹).

در تبدیل سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی و پیشرفت سرطان، یک حلقه بازخوردی مثبت نقش اساسی دارد. Nf-kB<sup>۴</sup>، پروتئین Lin28B<sup>۵</sup>، میکروRNA<sup>۶</sup> let-7a و اینترلوکین-۶ (IL-6) اجزای

- 
1. Thompson
  2. Zielinski
  3. Murphy
  4. Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
  5. Lin28 homolog B
  6. Lethal-7a

کلیدی این حلقه می‌باشند (۱۰). درحقیقت، تغییر سلولی با یک پیام التهابی که باعث فعال شدن Nf-kB می‌شود شروع می‌گردد (۱۰). پاسخ التهابی در تومورزایی، پیشروی و متاستاز اغلب سرطان‌ها به‌خصوص سرطان پستان، نقش محوری دارد (۱۱). در بیش از ۵۰٪ از انواع سلول‌های سرطانی، مشخصات مدار تنظیمی التهابی شامل بیش‌بیانی Lin28B، تنظیم کاهش‌ی let-7a و سطوح بالای IL-6 مشاهده شده است (۱۰).

Nf-kB یک عامل نسخه‌برداری است که بیان ژن‌های آنتی آپوپتوزیس را تنظیم کرده و کموکاین‌ها و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را فعال می‌کند. درواقع، Nf-kB یک میانجی کلیدی در سرطان‌زایی توسط التهاب است. Nf-kB مانع بیان let-7 می‌شود. با توجه به این نظریه، ممانعت از بیان Nf-kB منجر به بیان افزایشی let-7 می‌شود (۹). let-7 خانواده‌ای از miRNA است که در ژنوم انسان، ۱۲ عضو داشته و رابطه نزدیکی با انواع سرطان‌ها دارد. Let-7a یکی از اعضای let-7 است که به‌عنوان سرکوب‌کننده تومور عمل می‌کند (۱۱). در تأیید این موضوع مطالعات نشان داده‌اند کاهش بیان ژنی let-7a، با افزایش تومورزایی همراه است؛ درحالی‌که افزایش بیان ژنی آن، باعث کاهش سلول‌های تومور کاشت‌شده و خود تومور می‌شود (۱۳، ۱۲). همچنین، نشان داده شده است تزریق let-7a به موش‌های مبتلا به سرطان پستان، منجر به کاهش رشد تومور گردیده است (۱۴).

از آنجایی‌که Nf-kB به‌عنوان پروتئین فعال‌کننده عمل می‌کند، بازدارنده مستقیم از بیان let-7a غیرممکن به‌نظر می‌رسد. درعوض، گفته می‌شود امکان دارد Nf-kB یک بازدارنده بیان let-7a مانند Lin28B که به‌طور قدرتمند از بیان let-7، هم در مرحله نسخه‌برداری و هم بعد از نسخه‌برداری جلوگیری می‌کند را فعال کند. Lin28 پروتئینی است که به‌صورت دو نوع Lin28A و Lin28B بیان می‌شود و می‌تواند به pre let-7 متصل شده، مانع از تولید let-7 بالغ شود (۱۵).

بدین ترتیب، Nf-kB با استفاده از Lin28B به‌عنوان میانجی، به‌سرعت یک پیام التهابی را به سازوکاری منتقل می‌کند که درنهایت، منجر به ممانعت از بیان let-7a می‌شود. از آنجایی‌که IL-6 که یک میانجی اصلی پاسخ التهابی است به‌طور مستقیم توسط let-7a سرکوب می‌شود؛ بنابراین، فعال شدن Nf-kB و درنتیجه، سرکوب let-7a توسط آن باعث افزایش چشمگیر و دوفازی IL-6 می‌شود. نشان داده شده است که در سرطان‌های اپی‌تلیالی نظیر کارسینوما پستان، IL-6 افزایش می‌یابد (۱). IL-6 سایتوکاینی است که در ریزمحیط تومور، عملکرد پیش‌التهابی داشته و در رگزایی و متاستاز نقش

- 
1. Apoptosis
  2. Biphasic
  3. Carcinoma

دارد (۱۶). رگ‌زایی، به ایجاد عروق جدید گفته می‌شود که در تومور، باعث ازدیاد جریان خون و در نتیجه، افزایش رشد آن می‌شود (۱۷).  
 با وجود این که نشان داده شده است به دنبال تمرینات هوازی، التهاب کاهش می‌یابد؛ اما نتایج موجود به خصوص در زمینه سرطان، قاطع نیست. از طرفی، با توجه به موارد ذکر شده در مورد وجود حلقه‌ی بارخوردی مثبت بین *let-7a*، *Lin28B*، *Nf-kB* و *IL-6*، این سؤال مطرح می‌شود که آیا تمرین هوازی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌تواند با کاهش میزان *IL-6* باعث کاهش فعالیت این حلقه شده و در نهایت، منجر به کاهش التهاب و رشد تومور گردد؟ همچنین، آیا می‌توان بخشی از خواص ضدالتهابی و ضدتوموری تمرینات هوازی را به تأثیر آن بر میزان *let-7a* و *Lin28B*، *Nf-kB* نسبت داد؟ لذا هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی با شدت متوسط بر *Nf-kB*، *let-7a*، *Lin28B* و *IL-6* در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌باشد.

### روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع مطالعات تجربی و توسعه‌ای می‌باشد که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام گردیده است. به این منظور، تعداد ۲۰ سر موش ب‌ب‌سی (چهار تا پنج هفته‌ای با میانگین توده بدنی ۱۷ گرم) از مؤسسه پاستور، خریداری و به حیوان‌خانه منتقل شدند. موش‌ها به تعداد محدود و به صورت جداگانه در دمای ۲۲-۲۳ درجه سلسیوس و رطوبت حدود ۴۵٪ نگهداری شدند (۱۰ موش در هر قفس). ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی (شروع روشنایی شش صبح و شروع خاموشی شش عصر) برای تطابق فیزیولوژیک موش‌ها رعایت شد. غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود که به صورت آزاد و در اختیار، تا پایان پروتکل در دسترس موش‌ها بود.

تمامی موش‌ها به مدت یک هفته با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و نحوه دویدن روی نوارگردان آشنا شدند. سپس، سلول‌های سرطانی به موش‌ها تزریق شد و پس از ۱۰ روز، موش‌ها به شکل تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تومور - کنترل (TC) که هیچ‌گونه تمرینی انجام نمی‌دادند و تومور - تمرین (TT) که مطابق جدول ۱ به مدت شش هفته، پنج روز در هفته تمرین هوازی با شدت متوسط انجام دادند تقسیم شدند. پروتکل شامل تمرین هوازی به صورت دویدن روی نوارگردان بود (۳). دلیل استفاده از این تمرین این بود که در این نوع تمرین، شدت و مدت تمرین به راحتی تحت کنترل پژوهشگر می‌باشد. از آنجاکه پزشکان و متخصصان توصیه نموده‌اند شدت تمرین برای بیماران سرطانی باید مؤثر و ایمن باشد و برنامه تمرینی که برای فرد سالم، شدت کم یا متوسط دارد ممکن است برای بیمار

- 
1. Balb/c Mice
  2. Libitum

مبتلا به سرطان شدید تلقی شود (۳)، در این پژوهش، شدت تمرین متوسط در نظر گرفته شد (۷۰- $VO_2max$  /۵۵٪). شدت های مختلف تمرین بر اساس پژوهش آقاعلی نژاد و همکارانش (۱۳۸۷) برگرفته از منابع بونن و همکارانش (۱۹۹۳) و لو و همکارانش (۱۹۹۹) می باشد (۱۸).

جدول ۱- پروتکل تمرین هوازی روی نوارگردان

دوره تمرین	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحله آشناسازی	۱۰-۶	۲۰	۵
دو هفته اول	۱۴	۲۵	۵
دو هفته دوم	۱۶	۳۰	۵
دو هفته سوم	۱۸	۳۰	۵

برای کشت سلول، سلول کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (MC4-L2) که از پژوهشگری به نام لاناری<sup>۳</sup> از دانشگاه بوینس ایریس آرژانتین گرفته شد مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). سلول های MC4-L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی سلین ۱۰۰ μg/ml، استرپتومایسن ۱۰۰ μg/ml و FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. پس از پر کردن ۹۰٪ از سطح فلاسک به وسیله سلول ها، مایع رویی برداشته شد و پس از شستشو با PBS، در مرحله بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵٪ از کف پلیت سلول ها جدا شده و پس از خنثی سازی آنزیم با محیط حاوی FBS 10٪، همه محتویات فلاسک داخل لوله فالكون ریخته شد و در دور ۱۲۰۰، به مدت سه تا پنج دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، مایع رویی برداشته شد و پلاک سلولی در داخل محیط حاوی FBS 10٪ حل گردید. سپس، برای تعیین زنده مانده و شمارش سلولی، به ترتیب از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد (۳).

برای ایجاد تومور، ابتدا سلول های مورد نظر در محیط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به میزان معینی از سلول، کشت داده شدند و بعد از آن که تعداد سلول به اندازه مورد نیاز رسید، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس، به هر موش بلب سی ماده پس از بی هوشی با مقدار مناسب کتامین<sup>۴</sup> و زایلوزین<sup>۵</sup> (۱۰ میلی گرم به یک میلی گرم)، یک میلیون سلول به صورت زیرجلدی به ناحیه بالای ران سمت راست تزریق شد. در حدود ۱۰ الی ۱۴ روز تومور در

1. Bonen
2. Lu
3. Lanari
4. Ketamine
5. Xylazine

محل تزریق قابل لمس بود. پس از پیدایش تومور، هر هفته دو بعد طول (L) و عرض (W) تومور اندازه گیری شد. برای محاسبه حجم تومور، فرمول جونز و همکاران (۲۰۱۰)  $V = \frac{1}{2} (L^2 \times W)$  مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

برای اندازه گیری IL-6، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش های هر دو گروه پس از بیهوش شدن با محلول زایلانین و کتامین قربانی شدند. سپس، بافت تومور آن ها توسط پنس و قیچی جدا شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکروز شده) حذف شد. قسمت رویی تومور بلافاصله در ازت مایع، فریز گشته و در دمای ۷۰- نگهداری شد. در آزمایشگاه، ۱۰۰-۵۰ میلی گرم بافت تومور به همراه یک سی سی تریزول در لوله هموزن دستی، ریخته و بافت هموزن شد. سوسپانسیون رویی حاصل، به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. میکروتیوپ ها به مدت ۱۰ دقیقه (۱۵۰۰g) و دمای چهار درجه سلسیوس) سانتریفوژ شدند تا اجزای بزرگتر رسوب نمایند. سپس، از محلول رویی برای بررسی IL-6 به روش برادفورد<sup>۳</sup> استفاده شد. اندازه گیری IL-6 به وسیله روش آزمایشگاهی الایزا، طبق دستورالعمل کیت ab100713 ساخت شرکت abcam کشور انگلیس انجام شد.

مراحل استخراج RNA براساس پروتکل تریزول<sup>۴</sup> ساخت شرکت Life Technology کشور آمریکا انجام شد (۲۱). با این اختلاف که برای استخراج let-7 microRNA پس از اضافه نمودن ایزوپروپانول<sup>۵</sup> محلول رویی به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید و به ترتیب، مراحل بعدی استخراج انجام شد. برای ساخت cDNA، ژن های Nf-kB و Lin28B از کیت های کایزن و برای سنتز let-7a cDNA از کیت استراتاژن ساخت شرکت اجیلنت تکنولوژی کشور آمریکا مطابق با پروتکل شرکت استفاده شد.

ابتدا، غلظت مطلوب cDNA و پرایمر مربوط به let-7 microRNA با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص شد. برنامه Real Time-PCR روی دستگاه کوریت مدل 5 plex HRM ساخت استرالیا برای ژن های Nf-kB و Lin28B شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه ۴۰ سیکل، ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت یک دقیقه و برای let-7a شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه ۴۵ سیکل، ۹۵ درجه به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه

- 
1. Jones
  2. Supernatant
  3. Bradford
  4. Trizol
  5. Isopropanol
  6. Agilent Technology

بود. از GAPDH به‌عنوان ژن کنترل **Nf-kB** و **Lin28B** و از U6 به‌عنوان ژن کنترل **let-7a** استفاده شد. پرایمرهای طراحی شده و استفاده شده در جدول ۲ آمده است (۲۲).

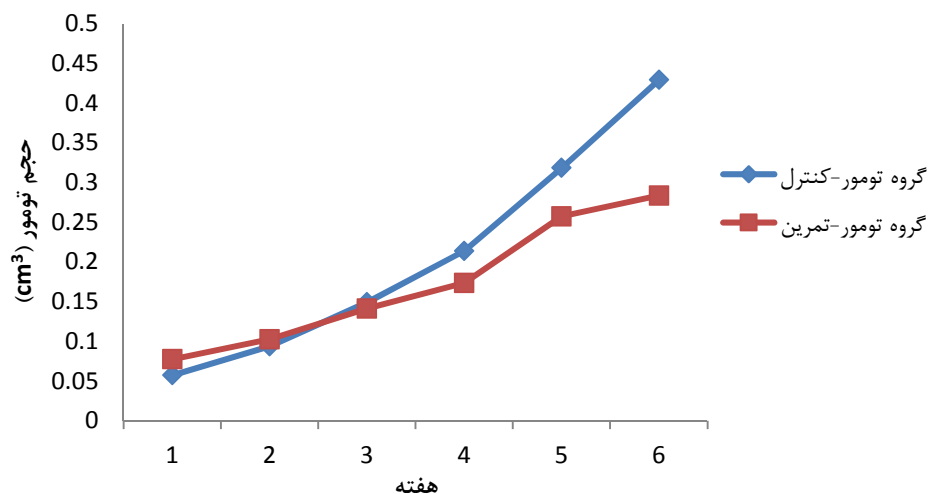
جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده

	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی	NCBI
LET-7A	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	----	NR_029725
U6	GCGCGTCGTGAAGCGTTC	G TGCAGGGTCCGAGGT	NR_003027
NFKB	GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG	NM_008689
lin-28	GTTTCGGCTTCTGTCTATGACC	CTTCCATGTGCAGCTTGCTCT	NM_145833.1
GAPDH	TCAACAGCAACTCCCCTCTTCC	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	NM_008084

از آزمون کولموگروف - اسمیرنف برای بررسی طبیعی بودن متغیرهای وابسته در مراحل مختلف پژوهش استفاده شد. نتایج این آزمون نشان داد توزیع داده‌ها در تمام مراحل پژوهش طبیعی بودند؛ بنابراین، از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. در نرم‌افزار اس.پی.اس. نسخه ۲۰، آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر برای بررسی حجم تومور و آزمون تی مستقل برای تجزیه و تحلیل IL-6 به‌کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل آماری **Nf-kB**، **Lin28B** و **let-7a** توسط نرم‌افزار REST انجام گردید. از نرم‌افزار اکسل برای ترسیم نمودارها و از آمار توصیفی برای توصیف داده‌ها استفاده شد. سطح معناداری، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

## نتایج

نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر نشان می‌دهد بین رشد حجم تومور دو گروه اختلاف معناداری وجود دارد ( $F=9.7$ ،  $P=0.001$ ). روند رشد تومور در شش هفته اجرای پروتکل تمرین در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، میزان نهایی و روند رشد در گروه تومور - کنترل بالاتر از گروه تومور - تمرین بود. حجم تومور هفته‌ی اول، در گروه تومور - تمرین (TT) و گروه تومور - کنترل (TC) تقریباً برابر است؛ ولی میزان رشد نهایی تومور در هفته‌ی ششم، در گروه TT کمتر شده بود.



شکل ۱- روند رشد تومور در گروه‌های پژوهش

نتایج به دست آمده از روش کمی Real-Time PCR با استفاده از نرم افزار رست<sup>۱</sup> REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج، کاهش معنادار Nf-kB به دنبال یک دوره تمرین هوازی را نشان داد. بیان ژن Lin28B نیز به صورت معناداری کاهش یافت. داده‌ها افزایش معنادار بیان let-7a را در گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل نشان دادند. میزان بیان let-7a در گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل، ۲۱/۳۷ بود (جدول ۳).

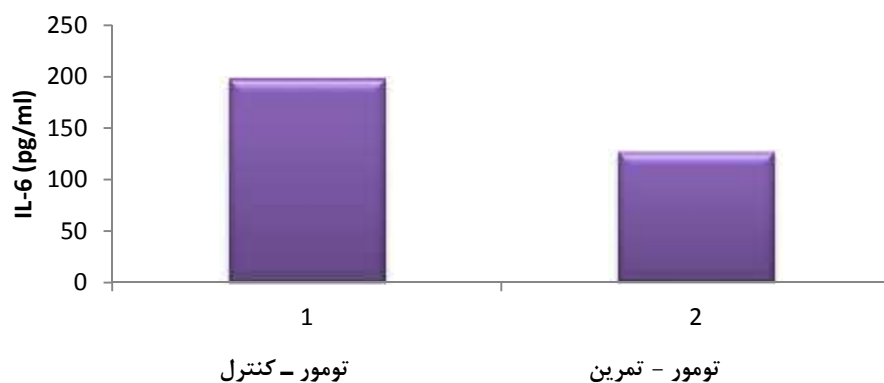
جدول ۳- نتایج نسبت بیان متغیرها در گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل

نتیجه	P	نسبت بیان گروه تومور - تمرین به گروه تومور - کنترل	
کاهش	۰/۰۰۴*	۰/۱۲۸	Nf-kB
کاهش	۰/۰۰۱*	۰/۳۰۵	Lin28B
افزایش	۰/۰۰۰*	۲۱/۳۶۶	Let-7a

\* نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<0.05)



همچنین، نتایج تی مستقل نشان داد بین IL-6 گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل، اختلاف معناداری وجود دارد ( $T=3.11$ ،  $P=0.007$ ). میزان IL-6 در گروه تومور - کنترل، ۱/۶ برابر میزان آن در گروه تومور - تمرین است (شکل ۲).



شکل ۲- سطوح IL-6 در گروه تومور - کنترل و تومور - تمرین

### بحث و نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، کاهش حجم تومور در گروه تومور - تمرین به دنبال یک دوره تمرین هوازی نسبت به گروه تومور - کنترل مشاهده شد. سازوکارهای تأثیر تمرین ورزشی بر حجم تومور، پیچیده و نامشخص می باشد. وضعیت التهابی، یکی از سازوکارهای درگیر در رشد تومور می باشد که نشان داده شده است تمرین هوازی موجب کاهش این وضعیت می شود. در این پژوهش، سطوح IL-6 که در بافت تومور به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی عمل می کند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از یک دوره تمرین هوازی، سطوح این سایتوکاین به طور معناداری کاهش یافت. سایتوکاین IL-6 طیف وسیعی از مسیرهای پیام دهی که منجر به فرایند رگ زایی می شود را فعال می کند. پژوهش ها نشان می دهند این سایتوکاین در بافت تومور باعث فعال سازی مسیرهای پیام رسانی نظیر NF-kB می شود (۱۰) که در نهایت، منجر به تحریک سلول های اندوتلیال عروق شده و باعث رگ زایی و افزایش رشد تومور می گردد (۲۳).

هم راستا با داده های حاصل از حجم تومور در پژوهش حاضر، مطالعات دیگر نیز کاهش حجم تومور به دنبال تمرین منظم ورزشی را گزارش کرده اند (۱۸،۶،۵،۳). مورفی و همکارانش کاهش حجم تومور را پس از ۲۰ هفته تمرین هوازی در موش های سرطانی گزارش کردند که آن را به کاهش

سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند IL-6 نسبت دادند و ارتباط مستقیمی بین سایتوکاین‌های پیش‌التهابی و حجم تومور گزارش نمودند (۶). زیلینسکی و همکارانش (۲۰۰۴) نیز نشان دادند فعالیت شدید، بر رشد تومور با تأثیر بر ریزمحیط تومور اثرگذار است و منجر به تأخیر در رشد تومور می‌شود (۵). ورما و همکاران (۲۰۰۹) کاهش حجم تومور ناشی از تمرین هوازی را با کاهش آنژیوژنز، کاهش بیان VEGF مقادیر ایتروسیت، لاکتات ریزمحیط تومور و افزایش اکسیژن و نیتریک اکساید مرتبط می‌دانند (۲۴).

نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش صالحیان و همکارانش (۱۳۹۱) متناقض است. آن‌ها نشان دادند حجم تومور به‌دنبال شش هفته تمرین هوازی در موش‌های BALB/c مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌یابد. پروتکل تمرینی به‌کارگرفته‌شده در مطالعه آن‌ها شامل تمرین هوازی فزاینده بود که با ۱۰ دقیقه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در هفته اول، شروع شده و به ۴۵ دقیقه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه در هفته ششم می‌رسید. با توجه به برنامه تمرینی مطالعه صالحیان و همکارانش می‌توان این عدم همخوانی نتایج را تا حدودی به تفاوت پروتکل‌های تمرینی نسبت داد. در پژوهش ذکرشده، شدت و مدت تمرین به‌طور هم‌زمان و جهشی، افزایش یافته است که می‌تواند یکی از دلایل افزایش حجم تومور باشد.

همچنین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد بیان Nf-kB به‌دنبال شش هفته تمرین هوازی در گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل کاهش معناداری داشت. در زمینه تأثیر تمرین ورزشی بر فعالیت Nf-kB در سرطان پستان تاکنون پژوهشی انجام نشده است. تنها چند مورد تأثیر یک جلسه فعالیت ورزشی بر فعالیت Nf-kB را در افراد سالم بررسی کرده‌اند (۲۶، ۲۵). در پژوهش کووازو و همکارانش (۲۰۰۵)، فعالیت Nf-kB به‌دنبال یک جلسه فعالیت بی‌هوازی فوق‌بیشینه در دوچرخه‌سواران حرفه‌ای به‌صورت معناداری افزایش یافت (۲۴). وایدرا و همکارانش نیز پس از یک جلسه فعالیت ورزشی با ۸۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی ( $VO_{2max}$ )، افزایش معنادار فعالیت Nf-kB را در ماکروفاژهای خون مشاهده کردند (۲۷). مغایرت نتایج این مطالعات با پژوهش حاضر را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که در هر دوی این پژوهش‌ها تأثیر فقط یک جلسه فعالیت ورزشی بررسی شده؛ درحالی‌که در پژوهش حاضر، تأثیر شش هفته تمرین هوازی بر بیان Nf-kB سنجیده شده است و دیگر این‌که نوع فعالیت ورزشی به‌کارگرفته‌شده در مطالعات نیز کاملاً متفاوت است. در مطالعات

- 
1. Verma
  2. Cuevas
  3. Vider

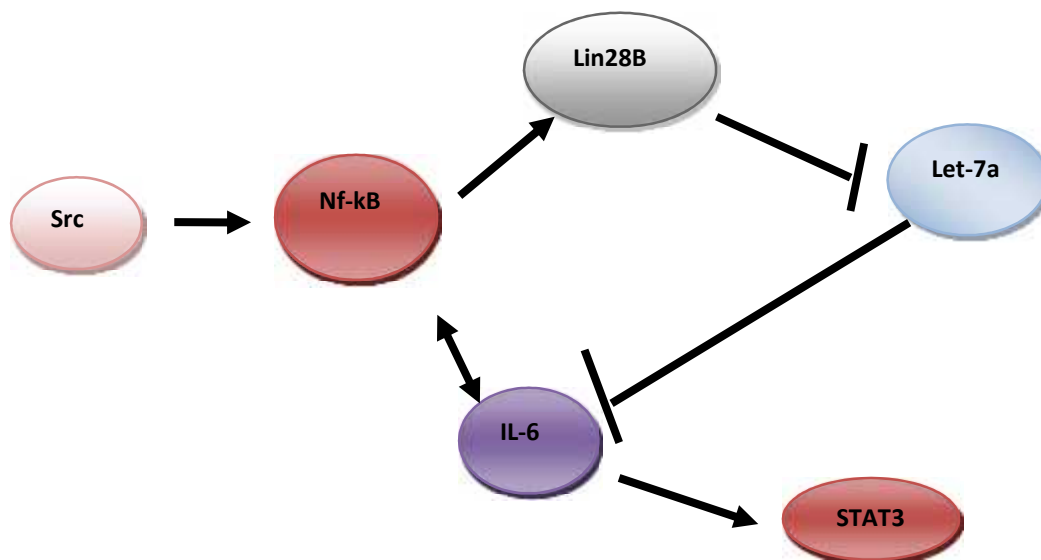
ذکر شده، فعالیت ورزشی بیشینه و فوق‌بیشینه انجام شده؛ ولی در این پژوهش، فعالیت هوازی با شدت متوسط مورد استفاده قرار گرفت.

در پژوهش حاضر، کاهش معنادار بیان **Lin28B** و افزایش معنادار بیان **let-7a** در گروه تومور - تمرین نسبت به گروه تومور - کنترل مشاهده شد. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند در بسیاری از سرطان‌ها، بیان ژنی **let-7a** کاهش می‌یابد. در یک مطالعه مدل حیوانی (موش سرطان پستان)، تزریق **let-7a** باعث تنظیم کاهشی انکوژن‌های **HMGA2** و **Ras** شد (۲۸). گزارش شده است **let-7a** می‌تواند گیرنده استروژن را مورد هدف قرار داده و به شکل بالقوه، مانع پیام‌رسانی استروژن در سرطان‌های پستان گیرنده استروژن مثبت شود. همچنین، نشان داده شده است **let-7a** از طریق سرکوب کردن بیان آنژیوژن، عامل رشد فیبروبلاستی (FGF)، متالوپپتیداز ماتریکسی (MMP) و **IL-6** می‌تواند از رشد تومور، آنژیوژنز و متاستاز در سرطان پستان جلوگیری کند (۲۹). به نظر می‌رسد **let-7a** یک نشانگر مولکولی در سرطان‌های خاص است و این قابلیت را دارد که به عنوان یک روش درمانی در مداوای برخی سرطان‌ها به کار گرفته شود (۳۰).

در زمینه تأثیر فعالیت ورزشی بر **let-7a** و **Lin28B** در سرطان پستان، تا به حال پژوهشی انجام نشده است؛ اما نتایج پژوهش سایمون<sup>۴</sup> و همکارانش (۲۰۰۶) حاکی از این مطلب است که یکی از دلایل کاهش **IL-6** به دنبال تمرین ورزشی در افراد سالم، افزایش **let-7** است (۳۰). **microRNA let-7** می‌تواند به صورت مستقیم و غیرمستقیم، مانع بیان ژنی **IL-6** شود (۱۰). از آنجایی که در پژوهش حاضر نیز میزان **IL-6** کاهش یافته و میزان **let-7** افزایش داشت، می‌توان بخشی از کاهش **IL-6** را به افزایش **let-7a** به دنبال تمرین هوازی نسبت داد.

از طرف دیگر، همان گونه که در شکل یک مشاهده می‌شود، **IL-6** عضوی از یک حلقه بازخوردی مثبت در بروز سرطان پستان است و **Nf-kB**، **Lin28B** و **let-7a** دیگر اعضای آن را تشکیل می‌دهند. با توجه به این که مطالعات نشان می‌دهند **Nf-kB** از طریق فعال کردن مستقیم **Lin28B** مانع بیان **let-7** می‌شود (۱۵)؛ به نظر می‌رسد کاهش **Nf-kB** به دنبال یک دوره تمرین هوازی که در مطالعه حاضر مشاهده شد می‌تواند در کاهش **Lin28B** و در نتیجه، افزایش بیان **let-7a** نقش داشته باشد.

- 
1. High-mobility group AT-hook 2
  2. Fibroblast growth factor
  3. Matrix metalloproteinases
  4. Perikles Simon



شکل ۳- نمای شماتیک حلقهٔ بازخوردی مثبت التهاب در سرطان پستان

در مطالعهٔ ایلئوپولوس<sup>۱</sup> و همکارانش (۲۰۰۹) در تبدیل سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی پستان، Src<sup>۲</sup> یک پیام شروع التهاب را برای حلقه ایجاد می‌کند که منجر به افزایش فعالیت Nf-kB می‌شود. Nf-kB باعث افزایش Lin28B و در نتیجه، منجر به سرکوب بیان let-7a می‌شود. بدین ترتیب، Nf-kB می‌تواند هم به صورت مستقیم و هم از طریق سرکوب بیان let-7a، باعث افزایش IL-6 شود. افزایش IL-6 باعث افزایش بیشتر Nf-kB می‌شود و در نهایت، منجر به فعال شدن STAT3<sup>۳</sup> می‌گردد. STAT3 فاکتور نسخه‌برداری است که باعث فعال شدن انواع ژن‌های رشدی مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)<sup>۴</sup> شده و در تومورزایی سرطان پستان نقش دارد (۳۲، ۳۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد تمرین هوازی منظم می‌تواند نقش مؤثری در کاهش Nf-kB و Lin28B، افزایش میکرو RNA let-7a و در نهایت، کاهش IL-6 داشته باشد و از آنجایی که نشان داده شده است هرگونه اختلال در اجزای این مدار تنظیمی (مهار Nf-kB، Lin28B، IL-6 و یا بیش‌بینایی let-7a) باعث کاهش معنادار رشد تومور و مرگ‌ومیر در سرطان پستان وابسته به گیرندهٔ استروژن می‌شود (۱۰)، می‌توان ادعا نمود تمرین منظم ورزشی می‌تواند حداقل در سرطان‌های پستان وابسته

1. Iliopoulos
2. A family of proto-oncogenic tyrosine kinases
3. Signal transducer and activator of transcription 3
4. Vascular endothelial growth factor

به گیرنده استروژن نقش درمانی داشته باشد (۳۳). درکل، یافته‌های این پژوهش بیان می‌کند 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 توموری در سرطان پستان، مطالعات بیشتری باید انجام شود.

### تقدیر و تشکر

این پژوهش با حمایت مالی دانشکده تربیت‌بدنی دانشگاه تهران و همکاری دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است که بدین‌وسیله از تمامی افرادی که در انجام این پژوهش همکاری نموده‌اند تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین، از دکتر لاناری - اهداکننده رده سلولی از مؤسسه پزشکی آرزانتین - تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

- ۱) فرج‌اللهی معصومه. روش‌های به‌کارگرفته‌شده جهت تسکین شدت خستگی توسط بیماران مبتلا به سرطان تحت شیمی‌درمانی. نشریه پرستاری ایران. ۲۰۰۴؛ ۱۷(۳۸): ۵۸-۶۴.
- 2) Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2013; 63(1): 11-30.
- 3) 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.
- 4) Ligibel J A, Giobbie-Hurder A, Olenczuk D, Campbell N, Salinardi T, Winer E P, et al. Impact of a mixed strength and endurance exercise intervention on levels of adiponectin, high molecular weight adiponectin and leptin in breast cancer survivors. Cancer Causes & Control. 2009; 20(8): 1523-8.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Thompson H J. Effects of physical activity and exercise on experimentally-induced mammary carcinogenesis. Breast Cancer Research and Treatment. 1997; 46(2-3): 135-41.
- ۸) صالحیان امید، سوری رحمان، حسن زهیر. مقایسه تأثیر دو نوع تمرین هوازی استقامتی پیوسته و منقطع بر سطوح پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در موش‌های با تومور سرطان سینه. نشریه فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۱؛ ۴(۱۵): ۲۰-۱۰۹.

- 9) 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.
  - 10) Iliopoulos D, Hirsch H A, Struhl K. An epigenetic switch involving NF- B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation. *Cell*. 2009; 139(4): 693-706.
  - 11) Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*. 2014; 26: 54-74.
  - 12) Ross S A, Davis C D. MicroRNA, nutrition, and cancer prevention. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 2011; 2(6): 472-85.
  - 13) Boyerinas B, Park S M, Hau A, Murmann A E, Peter M E. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer*. 2010; 17(1): 19-36.
  - 14) Esquela-Kerscher A, Trang P, Wiggins J F, Patrawala L, Cheng A, Ford L, et al. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle-Landes Bioscience*. 2008; 7(6): 759.
  - 15) Viswanathan S R, Daley G Q, Gregory R I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*. 2008; 320(5872): 97-100.
  - 16) Hong D S, Angelo L S, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer*. 2007; 110(9): 1911-28.
  - 17) Thompson H J, Jiang W, Zhu Z. Candidate mechanisms accounting for effects of physical activity on breast carcinogenesis. *IUBMB Life*. 2009; 61(9): 895-901.
- (۱۸) آقاعلی‌نژاد حمید، توفیقی اصغر، زهیر محمدحسن، مهدوی مهدی، شاهرخی سمیه. اثر تمرین استقامتی پیوسته بر میزان HSP70 و طول عمر موش‌های مبتلا به تومور سرطان سینه. *نشریه المپیک*. ۱۳۸۷؛ ۱۶(۲): ۸۶-۷۵.
- 19) Lanari C, Lüthy I, Lamb C A, Fabris V, Pagano E, Helguero L A, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: In vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Research*. 2001; 61(1): 293-302.
  - 20) 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.
  - 21) Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *The Journal of Physiology*. 2006; 577(1): 433-43.
- (۲۲) آقاعلی‌نژاد حمید. اثر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان mir-155 و بیان ژن SOCS1 در تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان. *فصلنامه علمی - پژوهشی بیماری‌های پستان*. ۱۳۹۲؛ ۶(۴): ۱۴-۷.
- 23) Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *The Lancet*. 2001; 357(9255): 539-45.
  - 24) 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.
  - 25) Cuevas M J, Almar M, García-Glez J C, García-López D, De Paz J A, Alvear-Órdenes I, et al. Changes in oxidative stress markers and NF- B activation induced by sprint exercise. *Free Radical Research*. 2005; 39(4): 431-9.

- 26) Gius D, Spitz D R. Redox signaling in cancer biology. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006; 8(7-8): 1249-52.
- 27) Vider J, Laaksonen D E, Kilk A, Atalay M, Lehtmaa J, Zilmer M, et al. Physical exercise induces activation of NF- B in human peripheral blood lymphocytes. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2001; 3(6): 1131-7.
- 28) Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Vazquez-Martin A, Torres-Garcia V Z, Del Barco S, Martin-Castillo B, et al. Micro (mi) RNA expression profile of breast cancer epithelial cells treated with the anti-diabetic drug metformin: induction of the tumor suppressor miRNA let-7a and suppression of the TGF -induced oncomiR miRNA-181a. *Cell Cycle*. 2011; 10(7): 1144-51.
- 29) Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: An emerging next-generation cancer therapeutic. *Current Oncology*. 2010; 17(1): 70.
- 30) Simon P, Fehrenbach E, Niess A M. Regulation of immediate early gene expression by exercise: Short cuts for the adaptation of immune function. *Exerc Immunol Rev*. 2006; 12(1): 112-31.
- 31) Niu G, Wright K L, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene*. 2002; 21(13): 2000-8.
- 32) Bollrath J, Phesse T J, von Burstin V A, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, et al. GP130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell*. 2009; 15(2): 91-102.
- 33) Paul-Pletzer K. Tocilizumab: Blockade of interleukin-6 signaling pathway as a therapeutic strategy for inflammatory disorders. *Drugs Today (Barc)*. 2006; 42(9): 559-76.

#### ارجاع دهی به روش ونکوور

انوشه لیلا، کردی محمدرضا، گایینی عباسعلی، مهدیان رضا، میرآخوری زهرا، امانی شلمزاری صادق. اثر تمرین هوازی بر بیان ژن‌های **Nf-kB**، **Lin28B**، میکرو **let-7a RNA** و سطوح اینترلوکین-۶ بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان. فیزیولوژی ورزشی. پاییز ۱۳۹۴؛ ۷(۲۷): ۳۴-۱۱۹.

## The effects of aerobic training on Nf-kB, Lin28B and let-7a microRNA expressions and levels of tumor tissue IL-6 in mice with breast cancer

L. Anoosheh<sup>1</sup>, M. R. Kordi<sup>2</sup>, A.A. Gaeini<sup>3</sup>, R. Mahdian<sup>4</sup>,  
Z. Mirakhori<sup>5</sup>, S. Amani Shalamzari<sup>6</sup>

1. Ph.D. of University of Tehran
2. Associate Professor at University of Tehran\*
3. Professor at University of Tehran
4. Assistance Professor at Pasteur Institute of Iran
5. Ph.D. of University of Tehran
6. Ph.D. of University of Tarbiat Modarres

Received date: 2014/08/23

Accepted date: 2014/12/03

---

### Abstract

The aim of this study was to assess the effects of aerobic training on Nf-kB, Lin28B and let-7a microRNA expressions and levels of tumor tissue IL-6 in mice with breast cancer. Twenty BALB/c c mice (4-5 weeks, 17g mass) were cancerous by injection of estrogen-dependent receptor breast cancer cells MC4-L2 and divided into two groups: tumor-training (TT) and tumor-control (TC) group. Then TT group completed aerobic training for 6 weeks, 5 days per week (14-18 m/min). 48 hours after the last exercise subjects were sacrificed. Tissue sampling were collected and stored in -70°. Nf-kB, Lin28B and let-7a microRNA expressions were accounted with Real time-PCR and IL-6 levels was accounted with ELISA Kit. Repeated measures and independent t tests were used to assess tumor size and IL-6, respectively. Statistical analysis of Nf-kB, Lin28B and let-7a were conducted by REST software. Tumor size, Nf-kB, Lin28B and IL-6 levels were significantly decreased in TT group compare with TC group ( $p < 0.05$ ). MicroRNA let-7a was significantly increased in TT against control group respectively ( $p = 0.000$ ). In breast cancer, a positive feedback loop consisting of Nf-kB, Lin28B, microRNA let-7a and IL-6 is activated. It seems that regarding to the depressing effects of aerobic training on this regulatory circuit in mice with breast cancer, this type of training can be used as adjuvant therapy in conjunction with other therapies for estrogen receptor dependent breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer, Aerobic training, Nf-kB, Lin28B, MicroRNA let-7a

---

---

\* Corresponding author

Email: mrkordi@ut.ac.ir