فیزیولوژی ورزشی شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۴. صص ۱۳۴-۱۱۹

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

لیلا انوشه[۱]، محمدرضا کردی[۲]، عباسعلی گایینی[۳]، رضا مهدیان[۴]، زهرا میرآخوری[۵]، صادق امانی شلمزاری[۶]

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 دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، تعیین اثر شش هفته تمرین هوازی بر بیان Nf-kB، Lin28B، میکروRNA let-7a و اینترلوکین-۶ بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود. تعداد ۲۰ سر موش بالب سی مادهٔ چهار تا پنج هفته‌ای با میانگین وزن ۱۷ گرم، با تزریق زیرجلدی سلول‌های سرطانی وابسته‌به گیرندهٔ استروژن MC4-L2 به سرطان پستان مبتلا شده و به دو گروه ۱۰تایی تومور ـ تمرین (TT) و تومور ـ کنترل (TC) تقسیم شدند. گروه تومور ـ 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 جلسهٔ تمرین، قربانی شدند و نمونه‌های بافتی، برداشته و در دمای ۷۰- درجه ذخیره شدند. میزان بیان ژن‌های Nf-kB، Lin28B و میکرو let-7a RNA به‌روش Real time – PCR و IL-6 به‌روش الایزا اندازه‌گیری شد. آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر برای بررسی حجم تومور و آزمون تی مستقل برای بررسی IL-6 به‌کار 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،حلقهٔ بازخوردی مثبت متشکل از Nf-kB، Lin28B، میکرو let-7a RNA و IL-6 فعال می‌شود. به‌نظر می‌رسد با توجه به اثر کاهشی تمرین هوازی بر این مدار تنظیمی و حجم تومور، این نوع تمرین می‌تواند به‌عنوان روش درمانی مکمل در کنار سایر روش‌های درمانی سرطان پستان وابسته به گیرندهٔ استروژن به‌کار گرفته شود.

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

* نویسنده مسئول Email: mrkordi@ut.ac.ir

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 تهدیدکنندهٔ 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 گیرندهٔ استروژن طبقه‌بندی می‌کنند. اکثر سرطان‌های پستان، تومورهای اپی-تلیالی هستند که از سلول‌های آستر مجراها و یا لوبول‌های پستان ناشی می‌شوند و اصطلاحاً، گیرندهٔ آلفای استروژن (ER α) مثبت نامیده می‌شوند (۳).

مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان می‌دهند بین فعالیت ورزشی و سرطان پستان رابطهٔ نزدیکی وجود دارد؛ اگرچه، کمبود مطالعات تجربی کنترل‌شده که رابطهٔ موجود و سازوکارهای درگیر را آزمایش کرده باشند و نیز نتایج ضدونقیض مطالعات موجود، اساس وجود این رابطه را تضعیف می‌کنند (۶-۴). تامسون[1] 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، زیلنیسکی[2] و همکارانش (۲۰۰۴) بیان کردند تمرینات هوازی، چگالی ماکروفاژها و نوتروفیل‌های درون‌توموری را که در تولید سایتوکاین‌های رگ‌زا نقش دارند کاهش می‌دهند و منجر به کاهش حجم تومور می‌شوند (۵). مورفی[3] 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 حلقهٔ بازخوردی مثبت نقش اساسی دارد. Nf-kB[4]، پروتئین Lin28B[5]، میکروRNA let-7a[6] 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 فعال‌شدن 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-6مشاهده شده است (۱۰).

Nf-kB یک عامل نسخه‌برداری است که بیان ژن‌های آنتی آپوپتوزیس[1]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 رابطهٔ نزدیکی با انواع سرطان‌ها دارد. Let-7a یکی از اعضای let-7 است که به‌عنوان سرکوب‌کنندهٔ 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 (۱۲،۱۳). همچنین، نشان داده شده است تزریق let-7a به موش‌های مبتلا به سرطان پستان، منجر به کاهش رشد تومور گردیده است (۱۴).

ازآنجایی‌که Nf-kB به‌عنوان پروتئین فعال‌کننده عمل می‌کند، بازداری مستقیم از بیان let-7a غیرممکن به‌نظر می‌رسد. درعوض، گفته می‌شود امکان دارد Nf-kB یک بازدارندهٔ بیان let-7a مانند Lin28B که به‌طور قدرتمند از بیان let-7، هم در مرحلهٔ 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).

بدین‌ترتیب، 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. ازآنجایی‌که IL-6 که یک میانجی اصلی پاسخ التهابی است به‌طور مستقیم توسط let-7a سرکوب می‌شود؛ بنابراین، فعال‌شدن Nf-kB و درنتیجه، سرکوب let-7a توسط آن باعث افزایش چشمگیر و دوفازی[2]IL-6 می‌شود. نشان داده شده است که در سرطان‌های اپی‌تلیالی نظیر کارسینومای[3]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 درنتیجه، افزایش رشد آن می‌شود (۱۷).

باوجوداین‌که نشان داده شده است به‌دنبال تمرینات هوازی، التهاب کاهش می‌یابد؛ اما نتایج موجود به‌خصوص در زمینهٔ سرطان، قاطع نیست. ازطرفی، باتوجه به موارد ذکرشده درموردوجودحلقه‌ی بارخوردی‌مثبت بین Nf-kB، Lin28B، let-7a 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 درنهایت، 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 Nf-kB، Lin28B و let-7a نسبت داد؟ لذا هدف از این پژوهش، بررسی تأثیر یک دوره تمرین هوازی با شدت متوسط بر Nf-kB، Lin28B، let-7a و IL-6 در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌باشد.

روش پژوهش

پژوهش حاضر از نوع مطالعات تجربی و توسعه‌ای می‌باشد که به‌شیوهٔ میدانی و آزمایشگاهی انجام گردیده است. به‌این‌منظور، تعداد ۲۰ سر موش بالب سی[1] ماده (چهار تا پنج هفته‌ای با میانگین تودهٔ بدنی ۱۷ گرم) از مؤسسهٔ پاستور، خریداری و به حیوان‌خانه منتقل شدند. موش‌ها به تعداد محدود و به‌صورت جداگانه در دمای ۲۳_۲۲ درجهٔ 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 به‌صورت آزاد و در اختیار[2] تا پایان پروتکل دردسترس موش‌ها بود.

تمامی موش‌ها به‌مدت یک هفته با شرایط زندگی در حیوان‌خانه و نحوهٔ دویدن روی نوارگردان آشنا شدند. سپس، سلول‌های سرطانی به موش‌ها تزریق شد و پس از ۱۰ روز، موش‌ها به‌شکل تصادفی به دو گروه ۱۰تایی تومور ـ کنترل (TC) که هیچ‌گونه تمرینی انجام نمی‌دادند و تومور ـ تمرین (TT) که مطابق جدول۱ به‌مدت شش هفته، پنج روز در هفته تمرین هوازی با شدت متوسط انجام دادند تقسیم شدند. پروتکل شامل تمرین هوازی به‌صورت دویدن روی نوارگردان بود (۳). دلیل استفاده از این تمرین این بود که در این نوع تمرین، شدت و مدت تمرین به‌راحتی تحت کنترل پژوهشگر می‌باشد. ازآنجاکه پزشکان و متخصصان توصیه نموده‌اند شدت تمرین برای بیماران سرطانی باید مؤثر و ایمن باشد و برنامهٔ 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 درنظر گرفته شد (۷۰-۵۵٪ VO_2max). شدت‌های مختلف تمرین براساس پژوهش آقاعلی‌نژاد و همکارانش (۱۳۸۷) برگرفته از منابع بونن[1] و لو[2] همکارانش (۱۹۹۳) و (۱۹۹۹) می‌باشد (۱۸).

جدول۱ـ پروتکل تمرین هوازی روی نوارگردان

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

برای کشت سلول، سلول کارسینومای مجاری پستان گیرندهٔ استروژن مثبت (MC4-L2) که از پژوهشگری به‌نام لاناری[3] از دانشگاه بوینس‌ایریس آرژانتین گرفته شد مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). سلول‌های MC4-L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی‌سلین 100 µg/ml، استراپتومایسن 100 µg/ml و FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. پس از پرکردن ۹۰٪ از سطح فلاسک به‌وسیلهٔ سلول‌ها، مایع رویی برداشته شد و پس از شستشو با PBS، در مرحلهٔ بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵ از کف پلیت سلول‌ها جدا شده و پس از خنثی‌سازی آنزیم با محیط حاوی 10% FBS، همهٔ 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 10% FBS حل گردید. سپس، برای تعیین زنده‌مانده و شمارش سلولی، به‌ترتیب از تریپان‌بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد (۳).

برای ایجاد تومور، ابتدا سلول‌های موردنظر در محیط آزمایشگاهی به‌منظور دستیابی به میزان معینی از سلول، کشت داده شدند و بعد از آن‌که تعداد سلول به اندازهٔ موردنیاز رسید، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس، به هر موش بالب سی ماده پس از بی‌هوشی با مقدار مناسب کتامین[4] و زایلوزین[5] (۱۰ میلی‌گرم به یک میلی‌گرم)، یک میلیون سلول به‌صورت زیرجلدی به ناحیهٔ 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 قابل‌لمس بود. پس از پیدایش تومور، هر هفته دو بعد طول (L) و عرض (W) تومور اندازه‌گیری شد. برای محاسبهٔ حجم تومور، فرمول جونز[1] و همکاران (۲۰۱۰) ($V= \pi/2 (L^2 \times W)$) مورد استفاده قرار گرفت (۲۰).

برای اندازه‌گیری IL-6، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسهٔ تمرین، موش‌های هر دو گروه پس از بیهوش‌شدن با محلول زایلازین و کتامین قربانی شدند. سپس، بافت تومور آن‌ها توسط پنس و قیچی جدا شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکروزشده) حذف شد. قسمت رویی تومور بلافاصله در ازت مایع، فریز گشته و در دمای ۷۰- نگهداری شد. در آزمایشگاه، ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم بافت تومور به‌همراه یک سی‌سی تریزول در لولهٔ هموژن دستی، ریخته و بافت هموژن شد. سوسپانسیون رویی حاصل، به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. میکروتیوپ‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه (۱۵۰۰g و دمای چهار درجهٔ سلسیوس) سانتریفوژ شدند تا اجزای بزرگتر رسوب نمایند. سپس، از محلول رویی[2] برای بررسی IL-6 به‌روش برادفورد[3] استفاده شد. اندازه‌گیری IL-6 به‌وسیلهٔ روش آزمایشگاهی الایزا، طبق دستورالعمل کیت ab100713 ساخت شرکت abcam کشور انگلیس انجام شد.

مراحل استخراج RNA براساس پروتکل تریزول[4] ساخت شرکت Life Technology کشور آمریکا انجام شد (۲۱). با این اختلاف که برای استخراج let-7 microRNA پس از اضافه‌نمودن ایزوپروپانول[5] محلول رویی به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری گردید و به‌ترتیب، مراحل بعدی استخراج انجام شد. برای ساخت cDNA، ژن‌های Nf-kB و Lin28B از کیت‌های کیاژن و برای سنتز let-7a cDNA از کیت استراتاژن ساخت شرکت اجیلنت تکنولوژی[6] 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 هرکدام به‌طور جداگانه مشخص شد. برنامهٔ Real Time-PCR روی دستگاه کوربت مدل 5 plex HRM ساخت استرالیا برای ژن‌های Nf-kB و Lin28B شامل: ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه ۴۰ سیکل، ۹۵ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه به‌مدت یک دقیقه و برای let-7a شامل: ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه ۴۵ سیکل، ۹۵ درجه به‌مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه به‌مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت 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 طراحی‌شده و استفاده‌شده در جدول۲ آمده است (۲۲).

جدول۲ـ پرایمرهای مورداستفاده

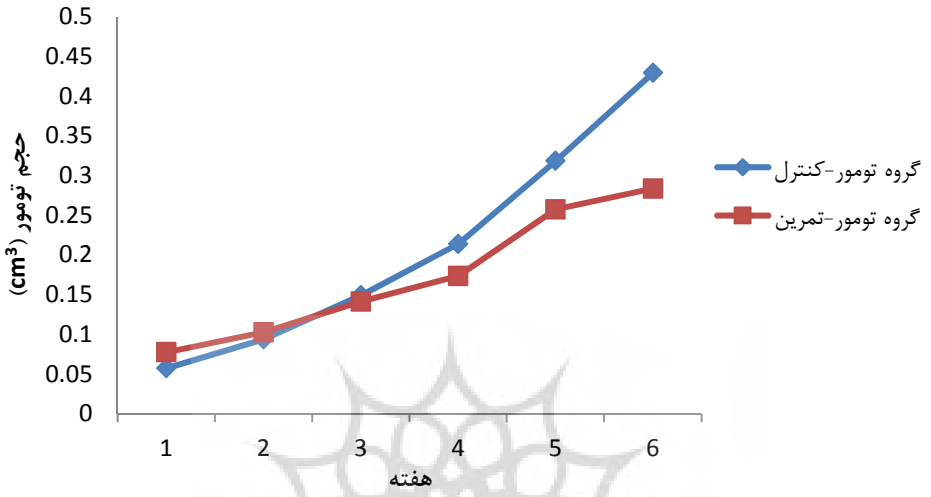
	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی	NCBI
LET-7A	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	----	NR_029725
U6	GCGCGTCGTGAAGCGTTC	G TGCAGGGTCCGAGGT	NR_003027
NFKB	GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC	ATCACTTCAATGGCCTCTGTGTAG	NM_008689
lin-28	GTTCGGCTTCCTGTCTATGACC	CTTCCATGTGCAGCTTGCTCT	NM_145833.1
GAPDH	TCAACAGCAACTCCCACTCTTCC	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC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

از آزمون کولموگروف ـ اسمیرنف برای بررسی طبیعی‌بودن 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.اس نسخهٔ ۲۰[1]، 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 درنظر گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر نشان می‌دهد بین رشد حجم تومور دو گروه اختلاف معناداری وجود دارد (P=0.001، F=9.7). روند رشد تومور در شش هفته اجرای پروتکل تمرین در شکل۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، میزان نهایی و روند رشد در گروه تومور ـ کنترل بالاتر از گروه تومور ـ تمرین بود. حجم تومور هفته‌ی اول، در گروه تومور ـ تمرین (TT) و گروه تومور ـ کنترل (TC) تقریباً برابر است؛ ولی میزان رشد نهایی تومور در هفته‌ی ششم، در گروه TT کمتر شده بود.

1. SPSS 20



شکل۱ـ روند رشد تومور در گروه‌های پژوهش

نتایج به‌دست‌آمده از روش کمی Real-Time PCR با استفاده از نرم‌افزار رست[1] REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج، کاهش معنادار Nf-kB به‌دنبال یک دوره تمرین هوازی را نشان داد. بیان ژن Lin28B نیز به‌صورت معناداری کاهش یافت. داده‌ها افزایش معنادار بیان let-7a را در گروه تومور ـ تمرین نسبت به گروه تومور ـ کنترل نشان دادند. میزان بیان let-7a در گروه تومور ـ تمرین نسبت به گروه تومور ـ کنترل، ۲۱/۳۷ بود (جدول۳).

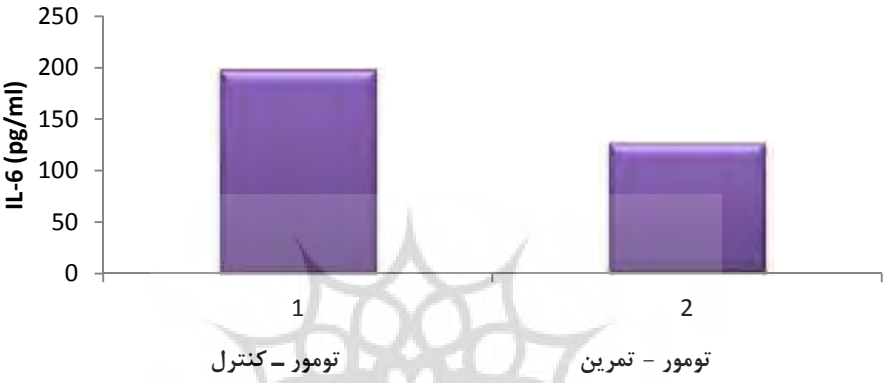
جدول۳ـ نتایج نسبت بیان متغیرها در گروه تومور ـ تمرین نسبت به گروه تومور ـ کنترل

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

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

1. REST

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



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

بحث و نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، کاهش حجم تومور در گروه تومور ـ تمرین به‌دنبال یک دوره تمرین هوازی نسبت به گروه تومور ـ کنترل مشاهده شد. سازوکارهای تأثیر تمرین ورزشی بر حجم تومور، پیچیده و نامشخص می‌باشد. وضعیت التهابی، یکی از سازوکارهای درگیر در رشد تومور می‌باشد که نشان داده شده است تمرین هوازی موجب کاهش این وضعیت می‌شود. در این پژوهش، سطوح IL-6 که در بافت تومور به‌عنوان یک سایتوکاین پیش‌التهابی عمل می‌کند مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد پس از یک دوره تمرین هوازی، سطوح این سایتوکاین به‌طور معناداری کاهش یافت. سایتوکاین IL-6 طیف وسیعی از مسیرهای پیام‌دهی که منجر به فرایند رگ‌زایی می‌شود را فعال می‌کند. پژوهش‌ها نشان‌می دهند این سایتوکاین در بافت تومور باعث فعال‌سازی مسیرهای پیام‌رسانی نظیر NF-kB می‌شود (۱۰) که درنهایت، منجر به تحریک سلول‌های اندوتلیال عروق شده و باعث رگ‌زایی و افزایش رشد تومور می‌گردد (۲۳).

هم‌راستا با داده‌های حاصل از حجم تومور در پژوهش حاضر، مطالعات دیگر نیز کاهش حجم تومور به‌دنبال تمرین منظم ورزشی را گزارش کرده‌اند (۱۸،۶،۵،۳). مورفی و همکارانش کاهش حجم تومور را پس از ۲۰ هفته تمرین هوازی در موش‌های 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[1] و همکاران (۲۰۰۹) کاهش حجم تومور ناشی از تمرین هوازی را با کاهش آنژیوژنز، کاهش بیان VEGF مقادیر اریتروسیت، 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 مطالعهٔ آن‌ها شامل تمرین هوازی فزاینده بود که با ۱۰ دقیقه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه در هفتهٔ اول، شروع شده و به ۴۵ دقیقه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۲۸ متر بر دقیقه در هفتهٔ ششم می‌رسید. با توجه به برنامهٔ تمرینی مطالعهٔ صالحیان و همکارانش می‌توان این عدم هم‌خوانی نتایج را تاحدودی 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 ـ تمرین نسبت به گروه تومور ـ کنترل کاهش معناداری داشت. در زمینهٔ 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[2] و همکارانش (۲۰۰۵)، فعالیت Nf-kB به‌دنبال یک جلسه فعالیت بی‌هوازی فوق‌بیشینه در دوچرخه‌سواران حرفه‌ای به‌صورت معناداری افزایش یافت (۲۴). وایدر[3] 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

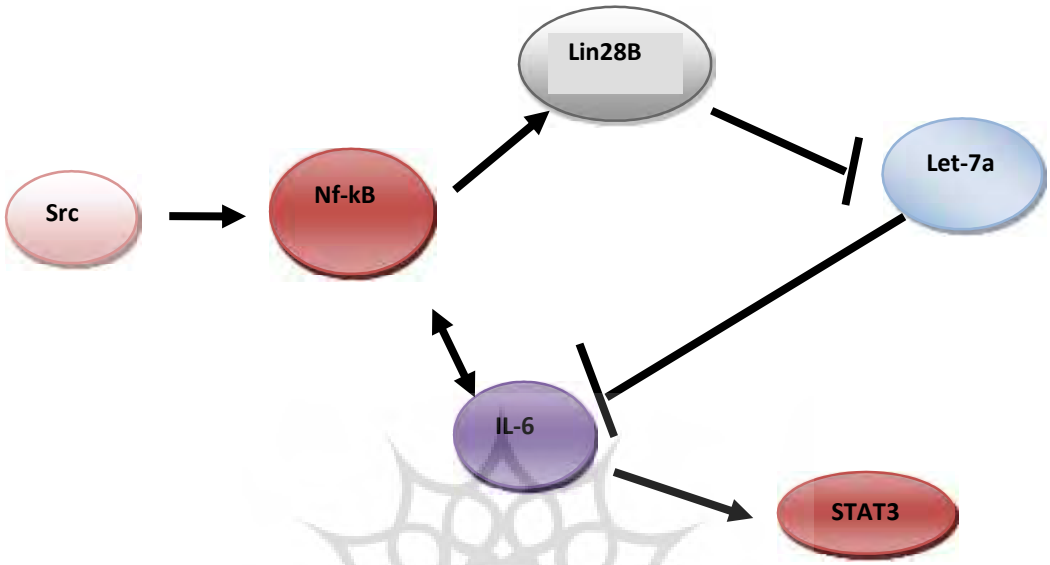
ذکرشده، فعالیت ورزشی بیشینه و فوق‌بیشینه انجام شده؛ ولی در این پژوهش، فعالیت هوازی با شدت متوسط مورد استفاده قرار گرفت.

در پژوهش حاضر، کاهش معنادار بیان Lin28B و افزایش معنادار بیان let-7a در گروه تومور ـ تمرین نسبت به گروه تومور ـ کنترل مشاهده شد. مطالعات فراوانی نشان داده‌اند در بسیاری از سرطان‌ها، بیان ژنی let-7a کاهش می‌یابد. در یک مطالعهٔ مدل حیوانی (موش سرطان پستان)، تزریق let-7a باعث تنظیم کاهشی انکوژن‌های HMGA2[1] و Ras شد (۲۸). گزارش شده است let-7a می‌تواند گیرندهٔ استروژن را مورد هدف قرار داده و به‌شکل بالقوه، مانع پیام‌رسانی استروژن در سرطان‌های پستان گیرندهٔ استروژن مثبت شود. همچنین، نشان داده شده است let-7a از طریق سرکوب‌کردن بیان آنژیوژنین، عامل رشد فیبروبلاستی(FGF)[2]، متالوپپتیداز ماتریکسی(MMP)[3] و IL-6 می‌تواند از رشد تومور، آنژیوژنز و متاستاز در سرطان پستان جلوگیری کند (۲۹). به‌نظر می‌رسد let-7a یک نشانگر مولکولی در سرطان‌های خاص است و این قابلیت را دارد که به‌عنوان یک روش درمانی در مداوای برخی سرطان‌ها به‌کار گرفته شود (۳۰).

در زمینهٔ تأثیر فعالیت ورزشی بر Lin28B و let-7a در سرطان پستان، تابه‌حال پژوهشی انجام نشده است؛ اما نتایج پژوهش سایمون[4] و همکارانش (۲۰۰۶) حاکی از این مطلب است که یکی از دلایل کاهش IL-6 به‌دنبال تمرین ورزشی در افراد سالم، افزایش let-7 است (۳۰). microRNA let-7 می‌تواند به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم، مانع بیان ژنی IL-6 شود (۱۰). ازآنجایی‌که 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 به‌دنبال تمرین هوازی نسبت داد.

از طرف‌دیگر، همان‌گونه که در شکل یک مشاهده می‌شود، IL-6 عضوی از یک حلقهٔ بازخوردی مثبت در بروز سرطان پستان است و Nf-kB، Lin28B و let-7a دیگر اعضای آن را تشکیل می‌دهند. با توجه به این‌که مطالعات نشان می‌دهند Nf-kB از طریق فعال‌کردن مستقیم Lin28B مانع بیان let-7 می‌شود (۱۵)؛ به‌نظر می‌رسد کاهش Nf-kB به‌دنبال یک دوره تمرین هوازی که در مطالعهٔ حاضر مشاهده شد می‌تواند در کاهش Lin28B و درنتیجه، 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 ۳ـ نمای شماتیک حلقهٔ بازخوردی مثبت التهاب در سرطان پستان

در مطالعهٔ ایلیوپولوس[1] و همکارانش (۲۰۰۹) در تبدیل سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی پستان، Src[2] یک پیام شروع التهاب را برای حلقه ایجاد می‌کند که منجر به افزایش فعالیت Nf-kB می‌شود. Nf-kB باعث افزایش Lin28B و درنتیجه، منجر به سرکوب بیان let-7a می‌شود. بدین‌ترتیب، Nf-kB می‌تواند هم به‌صورت مستقیم و هم از طریق سرکوب بیان let-7a، باعث افزایش IL-6 شود. افزایش IL-6 باعث افزایش بیشتر Nf-kB می‌شود و درنهایت، منجر به فعال‌شدن STAT3[3] می‌گردد. STAT3 فاکتور نسخه‌برداری است که باعث فعال‌شدن انواع ژن‌های رشدی مانند فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)[4] 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 let-7a RNA و درنهایت، کاهش IL-6 داشته باشد و ازآن‌جایی‌که نشان داده شده است هرگونه اختلال در اجزای این مدار تنظیمی (مهار Nf-kB، Lin28B، IL-6 و یا بیش‌بیانی 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 گیرندهٔ 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 دانشکدهٔ 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 ـ اهداکنندهٔ ردهٔ سلولی از مؤسسهٔ پزشکی آرژانتین ـ تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱) فرج اللهی معصومه. روش‌های به‌کارگرفته‌شده جهت تسکین شدت خستگی توسط بیماران مبتلا به سرطان تحت شیمی‌درمانی. نشریهٔ پرستاری ایران. ۲۰۰۴؛ ۱۷(۳۸): ۶۴ـ۵۸.

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. مقایسهٔ تأثیر دو نوع تمرین هوازی استقامتی پیوسته و منقطع بر سطوح پروتئین شوک حرارتی ۷۰ در موش‌های با تومور سرطان سینه. نشریهٔ فیزیولوژی ورزشی. ۱۳۹۱؛ ۴(۱۵): ۲۰ـ۱۰۹.

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-κB, 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. نشریهٔ المپیک .۱۳۸۷؛ ۱۶(۲):۸۶ـ۷۵.

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 مادهٔ مبتلا به سرطان پستان. فصلنامهٔ علمی ـ پژوهشی بیماری‌های پستان. ۱۳۹۲؛ ۶(۴) : ۱۴ـ۷.

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-κB 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-κ 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 TGFβ-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[1], M. R. Kordi[2], A.A. Gaeini[3], R. Mahdian[4], Z. Mirakhori[5], S. Amani Shalamzari[6]

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