Archive of SID
نشریه مطالعات کاربردی علوم زیستی در ورزش مقاله پژوهشی
دوره ٦، شماره ۱۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۷ تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۲/۰۵

تاثیر تمرین استقامتی بر بیان miR-133 و SRF عضلات اسکلتی تند و کند انقباض در رت های نر نژاد ویستار

راضیه رضایی[۱]، سعید شاکریان[۲*]، مسعود نیکبخت[۲]، فرانک هادی[۳]

۱. دانشجو دکترای فیزیولوژی ورزش، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۳. استادیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: عوامـل miR-133 و SRF در فرآیندهای مختلف سلولی درگیر می باشند، اما هنوز تأثیر تمرین استقامتی بر بیان آنها در عضلات تند و کند انقباض مشخص نشده است. هدف این تحقیق ارزیابی تاثیر تمرین استقامتی بر بیان miR-133 و SRF عضلات تند و کند انقباض در رت‌های نر نژاد ویستار بود. **روش تحقیق:** در این مطالعه ۱۴ رت با وزن ۲۰±۱۱۳ گرم (۵ هفته سن داشتند) به مدت ۴ هفته تحت شرایط کنترل شده، نگهداری شدند و بعد از دوره آشناسازی به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی (۷ سر رت در هر گروه) تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه تمرین استقامتی ۱۴ هفته ای، هفته ای ۶ جلسه (که به تدریج به ۶۰ دقیقه و سرعت ۳۰ متر بر دقیقه رسید) را روی نوارگردان اجرا نمودند و ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه، همراه با گروه کنترل تشریح شدند. سپس عضله کند انقباض (نعلی) و تند انقباض (بازکننده بلند انگشتان) آنها جدا شد. سطح بیان miR-133 و ژن SRF با استفاده از روش Real time-PCR اندازه گیری شدند. نتایج تحقیق با استفاده از آزمون آماری t تک نمونه و همبسته در سطح p<۰/۰۱ استخراج گردید. **یافته ها:** پس از ۱۴ هفته تمرین استقامتی، بیان miR-133 عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری (p=۰/۰۰۰۱) کاهش پیدا کرد؛ اما بیان miR-133 عضله نعلی افزایش معنی‌داری (p=۰/۰۰۱) نشان داد. همچنین بیان miR-133 عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی نسبت به عضله نعلی همان گروه به طور معنی‌داری (p=۰/۰۰۱) کاهش و میزان بیان ژن SRF عضله بازکننده بلند انگشتان گروه تجربی به طور معنی داری (p=۰/۰۰۹) افزایش یاف. اما بیان این ژن در عضله نعلی تغییر نکرد (p>۰/۰۵). **نتیجه گیری**: تمرین استقامتی باعث القاء تغییراتی در بیان miR-133 و ژن SRF متناسب با خصوصیات تارهای تند و کند انقباض می شود.

واژه های کلیدی: تمرین استقامتی، عضلات تند انقباض، عضلات کند انقباض، ژن SRF، ژن miR-133.

*نویسنده مسئول، آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزش؛
پست الکترونیک: sashakeryan@gmail.com DOI : 10.22077/ jpsbs.2017.471.1182

www.SID.ir

مقدمه

میکرو آر ان ا[1] (miR) ویژه عضله[2] فرآیندهای گوناگون عضله مانند تکثیر، تمایز میوبلاست ها، انقباض پذیری و پاسخ به استرس را تنظیم می کند (نیلسن[3] و دیگران، ۲۰۱۰). به نظر می رسد miR ها وسیله‌ای برای ایجاد تعادل بین فرآیندهای متفاوت رشد و تمایز میوبلاست و تنظیم چرخه رشد و نمو عضلات هستند (صفدر[4] و دیگران، ۲۰۰۹). miR-133 یکی از اعضای این خانواده است که دارای دو هومولوگ می باشد. توالی نوکلئوتید این دو یکسان است و تنها تفاوت آن ها، قرارگیری بر روی دو کروموزوم مجزا است که در مورد رت، به ترتیب کروموزوم ۲ و ۱۸ می‌باشد (چن[5] و دیگران، ۲۰۰۶). miR-133 دارای ۲۲ نوکلئوتید است (ون رویج[6] و دیگران، ۲۰۰۸) که در آپوپتوزیس[7]، هدایت قلبی، میوژنزیس[8] و هایپرتروفی عضله اسکلتی و قلبی نقش دارد (کالیس[9] و دیگران، ۲۰۰۸). مشخص شده که مایومیرها از طریق تأثیر بر روی ژن های هدف خود، اثرات خود را القاء می کنند. به عنوان مثال miR-133 فاکتور پاسخ سرم[10] (SRF)، پروتئین متصل به دستگاه پلی پیریمیدین (nPTB)، Rho[11] و عامل ضروری برای هایپرتروفی[12] (ERG) که کانال پتاسیمی دریچه دار حساس به ولتاژ زیر خانواده Q[13](KCNQ1) را کد می کند، پروتئین کنترل کننده تقسیم سلولی۴۲[14](Cdc42)، کاسپاز ۹[15]، عامل هسته ای درگیر در نمو قلبی[16] (WHSC2/ NELF-A) و ژن های کانال مرکز هدایت قلبی[17] (HCN2 و HCN4) را کنترل می کند (کالیس و دیگران، ۲۰۰۷؛ ون رویج و دیگران، ۲۰۰۸؛ ویلیامز[18] و دیگران، ۲۰۰۹؛ تام و باورساچز[19]، ۲۰۰۹). علاوه بر این miR-133 در سازماندهی اکتین سارکومری (میشیما[20] و دیگران، ۲۰۰۹)، مهار شکل‌گیری چربی قهوه‌ای (ین[21] و دیگران، ۲۰۱۳)، افزایش تمایز به وسیله تنظیم مسیر فاکتور شبه انسولین-۱[22] (IGF-1) از طریق تنظیم کاهشی گیرنده IGF-1 نقش دارد (هانگ[23] و دیگران، ۲۰۱۱).

در مورد تأثیر فعالیت بدنی بر فاکتورهای سلولی و مولکولی گوناگون تحقیقات گسترده ای انجام شده است (ابراهیم پور و ایراندوست، ۲۰۱۶؛ قربانیان و قاسم نیان، ۲۰۱۶)، در مورد تأثیر فعالیت بدنی بر بیان miR ها نیز تحقیقاتی انجام گرفته، اما تحقیق های بیشتری در این زمینه مورد نیاز است. نتایج نشان می دهد که مایومیرها تحت تأثیر فعالیت بدنی قرار می گیرند. مشخص شده است که فعالیت استقامتی و مقاومتی، هر دو، باعث تغییر در بیان برخی مایومیر ها می شوند (سان[24] و دیگران، ۲۰۱۳). تغییراتی که در اثر فعالیت بدنی در بیان مایومیرها گزارش شده، پیشنهاد می کند که بیان آن ها ممکن است در سازگاری ناشی از تمرین نقش داشته باشد (الیا[25] و دیگران، ۲۰۰۹؛ کربی و مک کارتی[26]، ۲۰۱۳). تحقیقات نشان داده‌اند که نه تنها مایومیرها به فعالیت بدنی پاسخ می‌دهند، بلکه بر عناصر هدف خود نیز تأثیر می گذارند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). مک کارتی و اسر[27] (۲۰۰۷) در مطالعه ای نشان داده اند که اعمال یک دوره بار عملکردی (قطع عضله همکار) با کاهش بیان miR-1-2 و miR-133 a-1 همراه است و میزان آنزیم های فراوری کننده آن ها نیز تغییر کرد. مطالعات کلر[28] و دیگران (۲۰۰۸)، دراموند[29] و دیگران (۲۰۰۸)، نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و روسل[30] و دیگران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که مایومیرها در اثر فعالیت بدنی تغییر می‌کنند. فعالیت بدنی یک عامل بسیار مهم در تجدید ساختار و تغییر بیان ژن های درگیر در عضله اسکلتی است. این تغییرات تحت عنوان سازگاری های ایجاد شده در اثر تمرینات ورزشی، از طریق مسیرهای گوناگون و با میانجی گری فاکتورهای واسطه ای متفاوت انجام می شود. از جمله این میانجی ها، miR-133 می باشد که این عامل در ارتباط با SRF که یکی از فاکتورهای هدف آن است، می تواند از جمله مسیرهای موثر در سازگاری عضلات اسکلتی باشد. بنابراین بررسی تاثیر تمرینات ورزشی بر miR-133 و SRF می تواند حداقل بخشی از فرآیند

1. microRNA
2. MyomiR
3. Nielsen
4. Safdar
5. Chen
6. Van Rooij
7. Apoptosis
8. Myogenesis
9. Callis
10. Serum response factor
11. Rhodopsin
12. Ether-a-go-gorelated gene
13. Potasium voltage- gated channel subfamily Q member
14. Cell division control protein 42
15. Caspase 9
16. Negative elongation factor A/Wolf- Hirschhorn syndrome candidate 2
17. Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 2
18. Williams
19. Thum & Bauersachs
20. Mishima
21. Yin
22. Insulin-like growth factor 1
23. Huang
24. Sun
25. Elia
26. Kirby & McCarthy
27. Esser
28. Keller
29. Drummond
30. Russell

www.SID.ir

Archive of SID

سازگاری تارهای عضلات اسکلتی با تمرینات ورزشی را روشن سازد.

فعالیت استقامتی به عنوان یک عامل موثر در تکثیر و تمایز عضلات، پروتئین های آنزیمی و ساختار عضله (فرآیند هایی که بازیگر اصلی آنها miR-133 و SRF است) شناخته شده است. اما طبق بررسی های انجام شده تاکنون تحقیقی تأثیر فعالیت استقامتی بلندمدت بر بیان miR-133 و SRF عضلات تند و کند انقباض را مورد مطالعه قرار نداده است. از این رو هدف این تحقیق بررسی تاثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 و SRF عضلات اسکلتی تند و کند انقباض در رت های نر نژاد ویستار بود.

روش تحقیق

آزمودنی های این تحقیق ۲۰ رت نر نابالغ نژاد ویستار (با ۵ هفته سن) بودند که از انستیتو پاستور خریداری شده و تا رسیدن به سن بلوغ (که ۴ هفته طول کشید) در آزمایشگاه حیوانات نگهداری شدند. رت ها در این مدت در ۵ قفس یکسان نگهداری شدند و برای آن ها شرایط مناسب آزمایشگاهی (میانگین دما ۳±۲۲ درجه سانتی گراد، دسترسی آزاد به آب و غذا و شرایط چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت) فراهم شد. یک دوره آشناسازی با تمرین شامل ۵ جلسه دویدن روی نوارگردان با سرعت ۹ متر در دقیقه، به مدت ۵ دقیقه در هر جلسه برای تمام رت ها در نظر گرفته شد. پس از پایان جلسات آشناسازی، رت‌ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل (۱۰ سر) و گروه تمرینی (۱۰ سر) تقسیم شدند. طی اجرای پروتکل ورزشی، تعداد ۳ سر از رت های گروه تمرینی نتوانستند پروتکل تمرینی را به پایان برسانند، لذا از مطالعه خارج شدند و تعداد نهایی به ۷ رت در هر گروه رسید. بر اساس مطالعات (جین[1] و دیگران، ۲۰۰۰؛ سان[2] و دیگران، ۲۰۱۰) یک پروتکل فعالیت استقامتی شامل ۱۴ هفته، هفته‌ای ۶ روز دویدن روی نوارگردان برای رت ها طراحی و اجرا گردید. هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه با هدف گرم کردن شروع می‌شد. در جلسه اول، بخش اصلی پروتکل ۱۲ دقیقه بود، اما به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی پروتکل افزایش یافت (در هفته اول تا سوم، هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی پروتکل اضافه شد)؛ به طوری که در پایان روز بیستم، مدت زمان بخش اصلی پروتکل به ۵۰ دقیقه رسید و با در نظر گرفتن پنج دقیقه برای گرم کردن و ۵ دقیقه نیز برای سردکردن، مدت زمان کل تمرین به ۶۰ دقیقه رسید. تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد و هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه گردید؛ به‌طوری‌که در پایان هفتهٔ ششم به ۳۰ متر در دقیقه رسید. نهایتا در هفته های هفتم تا دهم به تدریج ۵ درجه بر شیب نوارگردان (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) اضافه شد. این پروتکل (۶۰ دقیقه دویدن (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دویدن با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه به‌عنوان بخش اصلی پروتکل و در نهایت ۵ دقیقه دویدن با سرعت ۹ متر در دقیقه به‌عنوان بخش سرد کردن)) تا پایان هفته چهاردهم حفظ شد. پروتکل بین ساعات ۵ تا ۷ بعدازظهر اجرا می‌شد. در انتهای دستگاه نوارگردان، یک شوک الکتریکی برای جلوگیری از توقف حیوان، تعبیه شده بود.

۴۸ ساعت (برای اجتناب از تاثیر جلسه پایانی) پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی کامل، عضلات نعلی و بازکننده بلند انگشتان تحت شرایط استریل خارج و بلافاصله در میکروتیوب جاسازی شده و وارد تانک نیتروژن مایع شدند. پس از پایان این مرحله، میکروتیوب‌ها به یخچال ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال داده شدند.

برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر ترایزول[3] (ماده لیز کننده) اضافه شد و ادامه کار طبق دستورالعمل استخراج RNA با استفاده از ترایزول انجام شد. غلظت RNA با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر (شرکت اپندورف[4]) و نسبت طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰

1. Jin
2. Sun
3. Trizol
4. Eppendorff

www.SID.ir

نانومتر ارزیابی شد. غلظت‌های به دست آمده در دامنه ۱/۶ تا ۱/۸ قرار داشتند. برای رونویسی RNA به cDNA[1] از کیت شرکت اگزیکون[2] با شماره محصول ۲۰۳۳۰۰ بهره برداری شد و برای رونویسی RNA به cDNA ژن SRF از کیت شرکت ترموساینتفیک[3] (ساخت کشور آمریکا) با شماره محصول K1621 استفاده شد. تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. ترموسایکلر[4] مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت اپندورف بود.

برای ارزیابی بیان miR-133 و ژن SRF از تکنیک ریل تایم پی سی آر[5] و دستگاه شرکت آپلاید بایوسیستم[6] استفاده شد. قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن SRF طبق دستورالعمل روش ریل تایم پی سی آر، میزان کارآیی[7] ژن رفرنس[8] (GAPDH) و ژن هدف (SRF) بررسی شد و مشاهده گردید که میزان کارآیی برای این دو ژن در بالاترین میزان (عدد یک) است. سایبرگرین مسترمیکس[9] استفاده شده متعلق به شرکت تاکارا[10] با شماره محصول RR0810A (ساخت کشور ژاپن) بود. طبق دستورالعمل کیت، برای یک نمونه ۱۰ میکرولیتری، ترکیبی از مستر میکس (۵ میکرو لیتر) پرایمر (۱ میکرولیتر)، cDNA (۱ میکرولیتر) و آب مقطر (۳ میکرولیتر) در نظر گرفته شد و میزان بیان ژن با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد. در هر دوره[11] (۴۰ سیکلی) یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی مسترمیکس در نظر گرفته شد و کنترل داخلی (GAPDH)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و ژن SRF همزمان در یک دوره ارزیابی شد. ژن رفرنس در این تحقیق ژن GAPDH بود.

اما سایبرگرین مسترمیکس برای miR-133 با شماره محصول ۲۰۳۴۵۰، پرایمر های miR-133 (با توالی UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG) و کنترل آن، یو سیکس (U6)، متعلق به شرکت اگزیکون بود. طبق دستورالعمل کیت، برای یک نمونه ۱۰ میکرولیتری، ترکیبی از مسترمیکس (۵ میکرولیتری)، پرایمر (۱ میکرولیتری) و cDNA (۴ میکرولیتری) رقیق شده استفاده شد. در هر دوره، یک نمونه به عنوان کنترل منفی (برای تعیین آلودگی مسترمیکس) در نظر گرفته شد و کنترل داخلی (یو سیکس)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و miR-133 همزمان در یک دوره ارزیابی شدند. برای ژن SRF و miR-133 نمونه‌ها به صورت دوتایی[12] ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن سی تی[13] (CT) دوتایی برای هر نمونه، میانگین آن‌ها محاسبه شد. بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزاراکسل (Excel) با استفاده از فرمول $۲^{-\Delta\Delta_{ct}}$، میزان بیان miR-133 و ژن SRF محاسبه گردید. $۲^{-\Delta\Delta_{ct}}$ نشان دهنده مرتبه تغییر[14] می باشد (لیواک[15] و دیگران ۲۰۰۱؛ پفاف[16] ۲۰۰۱؛ یوآن[17] و دیگران، ۲۰۰۶). از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ برای استخراج نتایج استفاده شد. ابتدا جهت طبیعی بودن توزیع داده ها از آزمون شاپیرو-ویلک[18] استفاده گردید که مشخص شد توزیع داده ها طبیعی می باشد. به منظور تعیین اختلاف میانگین بین گروه کنترل (شاخص عدد ۱ بود) و تجربی، از آزمون t تک نمونه[19] و برای تعیین اختلاف بین دو عضله از آزمون t همبسته بهره برداری شد. در کلیه موارد، سطح معنی داری $p<۰/۰۱$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

میانگین تعداد سیکل های گروه کنترل و تجربی پس از تمرین استقامتی و همچنین مقادیر بیان miR-133 و ژنSRF برای هر دو بافت (تندانقباض و کندانقباض) در جدول ۱ مشخص شده است.

1. Compiementary DNA
2. Exiqon
3. Thermoscientific
4. Thermocycler
5. Real time PCR
6. Applied BioSystem
7. Efficiency
8. Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
9. SYBR green master mix
10. Takara
11. Run
12. Duplicate
13. Cycle threshold
14. Fold Change
15. Livak
16. Pfaffl
17. Yuan
18. Shapiro-Wilk
19. One sample t test

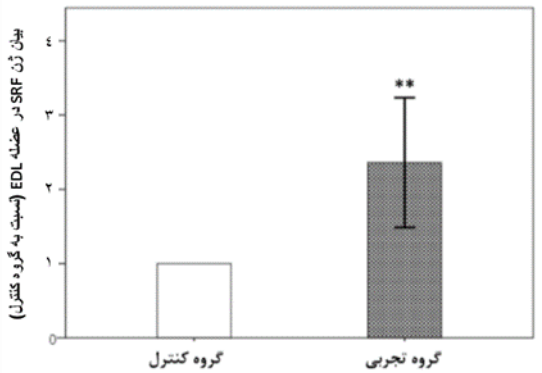
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. توصیف CT (چرخه PCR) فاکتورهای ارزیابی شده گروه های شرکت کننده در تحقیق

شاخص‌ها	گروه	تعداد	میانگین	انحراف استاندارد
ژن SRF عضلهEDL	کنترل	۷	۲۳/۲۱	۰/۷۷
	تجربی	۷	۱۹/۲۳	۰/۸۷
ژن SRF عضله نعلی	کنترل	۷	۲۶/۱۲	۰/۷۹
	تجربی	۷	۲۵/۹	۰/۷۶
ژن GAPDH عضله EDL	کنترل	۷	۱۵/۲	۰/۸۷
	تجربی	۷	۱۶/۱	۰/۸۶
ژن GAPDH عضله نعلی	کنترل	۷	۱۸/۴	۰/۹۹
	تجربی	۷	۱۶/۸۲	۰/۸۱
ژن miR-133 عضله EDL	کنترل	۷	۲۸/۴	۱/۰۶
	تجربی	۷	۲۱/۱	۰/۴۳
ژن miR-133 عضله نعلی	کنترل	۷	۳۰/۸	۱/۰۲
	تجربی	۷	۱۹/۲	۱/۱
ژن U6 عضله نعلی	کنترل	۷	۲۴/۷	۰/۷
	تجربی	۷	۲۲/۴	۱/۲۳
ژن U6 عضله EDL	کنترل	۷	۲۳/۳	۱/۸۰
	تجربی	۷	۲۱/۱	۱/۲

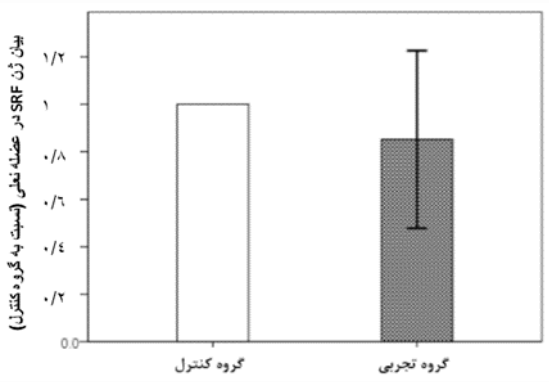
همچنین نتایج آزمون t تک نمونه برای ژن SRF نشان داد که بر اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی، میانگین بیان ژن SRF در عضله تند انقباض باز کننده بلند انگشتان پا گروه تجربی با افـزایش معنـی دار (t=۳/۸۰ و p=۰/۰۰۹) همـراه بوده، در حالی کـه در عضلـه کند انقباض نعلی این تغییر غیر معنی دار (t = -۰/۹۶ و p=۰/۳۷) می باشد (شکل ۱ و ۲). از طرف دیگر، نتایج آزمون t تک نمونه برای miR-133 نشان داد که فعالیت استقامتی اجرا شده موجب کاهش معنی دار (t=-۱۳/۱۰ و p=۰/۰۰۱) بیان miR-133 در عضله تند انقباض باز کننده بلند انگشتان پا نسبت به گروه کنترل شده است (شکل ۳).



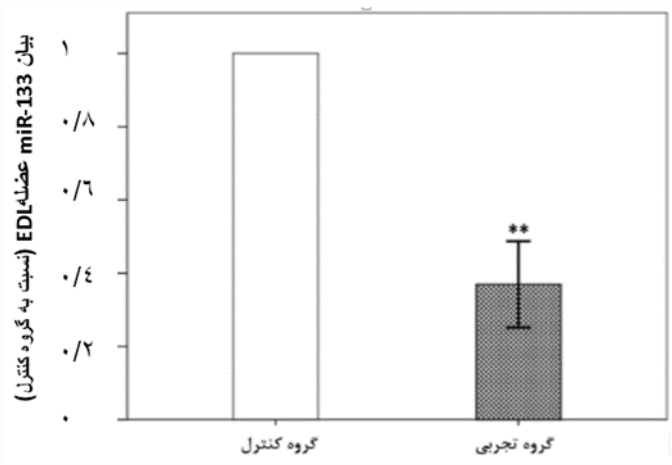
شکل ۱. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن SRF عضله باز کننده بلند انگشتان پا گروه کنترل و تجربی؛

**** نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۹.**

www.SID.ir

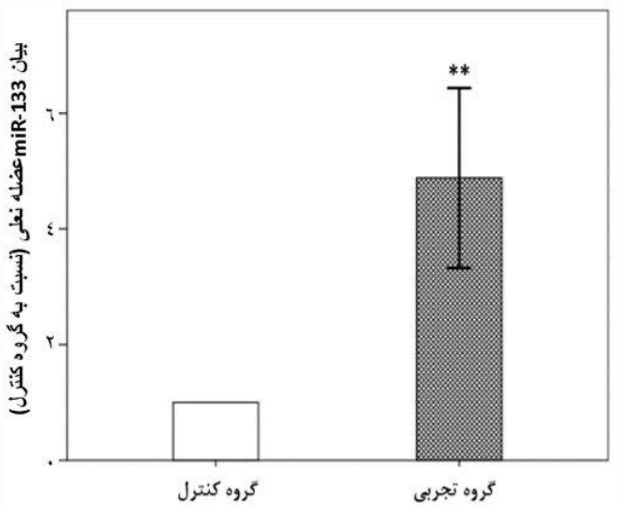


شکل ۲. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن SRF عضله نعلی گروه کنترل و تجربی.



شکل ۳. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 عضله باز کننده بلند انگشتان گروه کنترل وتجربی؛
**** نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۱.**

همچنین نتایج آزمون t تک نمونه نشان داد که ۱۴ هفته تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار (t=۶/۱۰ و p=۰/۰۰۱) بیان miR-133 در عضله کند انقباض نعلی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل شده است (شکل ۴).

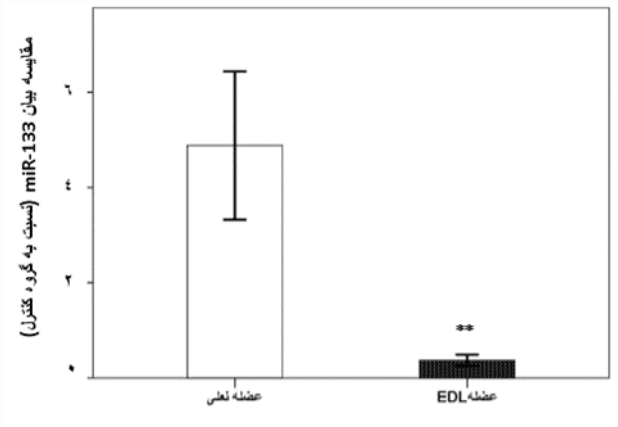


شکل ۴. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 در عضله نعلی گروه کنترل وتجربی؛
**** نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۱.**

www.SID.ir

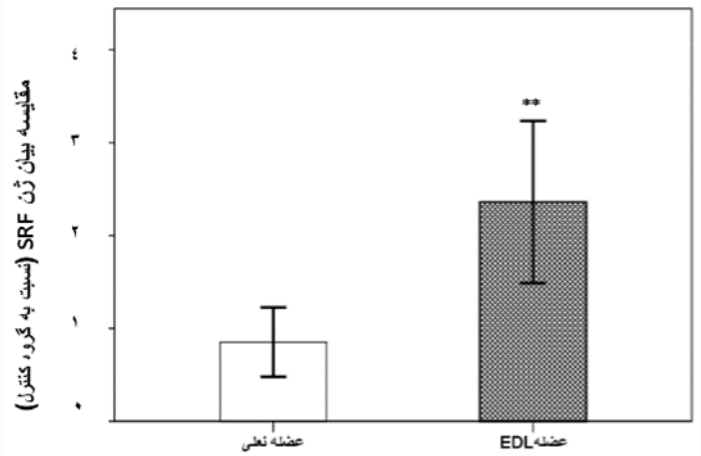
Archive of SID

نتایج آزمون t همبسته در مورد مقایسه میزان بیان miR-133 در عضلات نعلی و باز کننده بلند انگشتان پا نشان داد که تمرین استقامتی باعث کاهش معنی‌دار (t= -۷/۰۹ و p=۰/۰۰۱) بیان miR-133 عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی شده است (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسه تاثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-133 در عضله نعلی و EDL گروه تجربی؛
**** نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p<۰/۰۰۱.**

نتایج آزمون t همبسته در مورد مقایسه میزان بیان SRF در عضلات نعلی و باز کننده بلند انگشتان پا .نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش معنی‌دار (t=۳/۲۶ و P=۰/۰۱) بیان SRF عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی شده است (شکل ۶).



شکل ۶. مقایسه تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان SRF در عضله نعلی و EDL گروه تجربی؛
**** نشانه تفاوت معنی دار با گروه کنترل در سطح p< ۰/۰۱.**

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تمرین استقامتی میانگین بیان miR-133 عضله باز کننده بلند انگشتان را به طور معنی داری کاهش می دهد، در حالی که این شاخص در عضله نعلی افزایش یافت. مقایسه تغییرات دو عضله نیز نشان دهنده کاهش بیان miR-133 در عضله باز کننده بلند انگشتان نسبت به عضله نعلی بود. همچنین نتایج تحقیق در مورد SRF نشان داد که تمرین استقامتی باعث افزایش معنی دار بیان ژن SRF در عضله باز کننده بلند انگشتان شد اما تغییری در بیان عضله نعلی مشاهده نشد. مقایسه تغییرات دو عضله نیز نشان داد که بیان SRF در عضله باز کننده بلند انگشتان افزایش معنی داری نسبت به عضله نعلی داشته است. عملکرد میرها سرکوب بیان ژن از طریق مهار فرآیند ترجمه[1]، جلوگیری از شروع ترجمه mRNA و یا افزایش تجزیه mRNA است. بنابراین کاهش بیان miR منجر به افزایش بیان پروتئین ویا mRNA ژن هدف می شود (نیلسن و دیگران، ۲۰۱۰؛ کربی و مک کارتی ۲۰۱۳). لیویز[2] و دیگران (۲۰۱۲) گزارش کرده اند که بیان مایومیر ها با فعالیت بدنی رابطه عکس دارد؛ به این معنی که افزایش فعالیت بدنی میزان بیان مایومیر ها را کاهش می دهد و بالعکس. به عنوان مثال نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) سرکوب بیان مایومیرها به دنبال تمرین استقامتی را نشان داده اند. کلر و دیگران (۲۰۱۱) نشان داده اند که ۶ هفته دوچرخه‌سواری بیان miR-1 و miR-133 عضله پهن جانبی انسان را کاهش می‌دهد. نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) نیز گزارش کرده اند که بعد از ۱۲ هفته فعالیت استقامتی، بیان تمام مایومیرهای مورد بررسی در بیوپسی های بدست آمده از عضله پهن جانبی در حالت استراحت نسبت به پیش از دوره تمرینی، به طور معنی دار کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر در مورد تأثیر تمرین استقامتی بر miR-133 تار تند انقباض با نتایج مطالعه نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد. موضوع مهمی که باید مورد توجه قرار گیرد، تفاوت هایی است که در ترکیب نوع تار یک عضله در گونه‌های تجربی وجود دارد. عضله مورد مطالعه نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) و کلر و دیگران (۲۰۱۱) عضله پهن جانبی بود که در نمونه‌های انسانی یک عضله بینابینی است؛ یعنی درصد تارهای تند انقباض و کند انقباض در این عضله تقریبا یکسان است (تالماج، ۲۰۰۰). به عبارت دیگر، شاید تفاوت‌های موجود در نتایج مطالعات مختلف، ناشی از تفاوت در نوع تار مورد مطالعه باشد.

مشخص شده که miR-133 تکثیر میوبلاست‌ها را افزایش می‌دهد و حداقل بخشی از این عمل از طریق سرکوب SRF (تنظیم کننده اساسی تمایز عضله و فعال کننده اصلی میوژنز) به انجام می رسد (چن و دیگران، ۲۰۰۶؛ ون رویج و دیگران، ۲۰۰۸). مک کارتی و اسر (۲۰۰۷) گزارش کردند که miR-1 و miR-133 a بعد از ۷ روز افزایش بار عملکردی در موش کاهش می‌یابد، آن‌ها نتیجه گرفتند که کاهش این دو میر برای افزایش بیان ژن هایی که در هایپرتروفی عضله اسکلتی درگیرند، مورد نیاز است. در مقابل، افزایش miR-1 و miR-133 در تثبیت و عدم تغییر در توده عضله اسکلتی درگیرند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). مشخص شده است که تمرینات استقامتی، ظرفیت تبدیل تارها را به سمت کسب خصوصیات تارهای کند انقباض تغییر می دهند. ممکن است افزایش بیان miR-133 که باعث سرکوب بیان SRF (تعیین کننده مهم تمایز) می‌شود، باعث تثبیت تارهای کند انقباض شود. عضله نعلی دارای درصد بالایی از تارهای کند انقباض است و افزایش بیان miR-133 احتمالا نشانه‌ای از تثبیت تارهای کند انقباض در این عضله می باشد؛ به این صورت که افزایش miR-133 باعث جلوگیری از بیان SRF شده و بنابراین مانع انتقال سلول‌ها به فاز تمایز گردیده و آن‌ها را در مرحله تکثیر نگه می‌دارد. اما در عضله بازکننده بلند انگشتان که دارای تارهای کند انقباض به مراتب کمتر و درصد بیشتر تارهای تند انقباض است، کاهش miR-133 باعث افزایش SRF شده و ممکن است تمایز را در این تارها افزایش داده و تارها به سمت خصوصیات کند انقباضی گرایش یابند. تمرین استقامتی توده عضله اسکلتی را بر اساس روش وابسته به فعالیت، حفظ می کند (صفدر و دیگران، ۲۰۰۹). بنابراین هر وهله از تمرین استقامتی، باعث القاء عوامل مایوژنیک می شود و بدین ترتیب تغییر و تجدید ساختار عضله اسکلتی افزایش می یابد (چن و دیگران، ۲۰۰۶). نیلسن و دیگران (۲۰۱۰) گزارش کرده اند که به دنبال یک وهله فعالیت استقامتی، بیان miR-133 در عضله پهن جانبی[3] افزایش می یابد. فرض آنها این بود که وهله های تکراری تمرین استقامتی، منجر

1. Translation
2. Lewis
3. Vastus lateralis

www.SID.ir

Archive of SID

به افزایش این مایومیر در عضله اسکلتی انسان شود. با این وجود همان‌طور که اشاره شد، به دنبال ۱۲ هفته تمرین استقامتی با شدت بالا مایومیرهای بررسی شده کاهش یافتند. البته ممکن است مایومیرها در وهله های زمانی بعدی طی دوره بازیافت نیزکاهش یابند، زیرا یکی از محدودیت های مطالعه ذکر شده این بود که بیان مایومیرها تنها بلافاصله و ۳ ساعت پس از فعالیت استقامتی اندازه‌گیری شد. افزایش miR-1 و miR-133 بلافاصله بعد از فعالیت استقامتی، با افزایش عوامل رونویسی[1] myoD، مایوژنین و MRF4[2] همراه ست که به دنبال فعالیت استقامتی حاد در عضله اسکلتی رخ می‌دهد و مشخص شده که این عوامل در تنظیم بیان مایومیر ها نقش دارند (کادیو[3] دیگران، ۲۰۰۴؛ کافی[4] و دیگران، ۲۰۰۶؛ سوئیت‌من[5] و دیگران، ۲۰۰۸).

پروتکل تمرین مطالعه سوسی[6] و دیگران (۲۰۱۱) بر روی رت ها که شامل ۱۰ هفته تمرین هوازی شنا، به مدت ۶۰ دقیقه، ۵ روز در هفته بود، از لحاظ شدت و مدت تقریبا مشابه پروتکل مطالعه حاضر بود. آن‌ها نشان دادند که تمرین استقامتی با شدت متوسط و بالا، باعث کاهش miR-133 در بطن چپ قلب می‌شود. نتیجه مطالعه حاضر در مورد تأثیر تمرین بر عضله باز کننده بلند انگشتان با مطالعه سوسی و دیگران (۲۰۱۱) همخوانی دارد، اما در مورد miR-133 عضله نعلی چنین نیست. لازم به ذکر است که در مطالعه مذکور تاثیر تمرین بر miR-133 قلب بررسی شده و بدیهی است که بین بافت‌های قلب و عضله اسکلتی در پاسخ به تمرین، تفاوت هایی وجود داشته باشد.

عملکرد دیگر miR-133 تنظیم منفی گیرنده IGF-1 و مسیر پیام دهی PI3K/AKt[7] (تشکیل دهنده مهم فرآیند رشد و نمو عضله اسکلتی) در مدت میوژنزیس عضله اسکلتی است. علاوه بر این، IGF-1 (القاء کننده موثر شکل گیری میوتوب‌ها)، موجب افزایش بیان miR-133 در میوبلاست‌های تمایزی طی مدت تمایز مایوژنیک می شود که احتمالا از طریق افزایش بیان پروتئین مایوژنین، صورت می گیرد (هانگ[8] و دیگران، ۲۰۱۱). به نظر می‌رسد miR-133 پاسخ‌های داخل سلولی مختلف کنترل شده به وسیله مسیر پیام دهی IGF-1R/PI3K/AKt طی میوژنزیس را تنظیم میکند (اسچیافینو و ماموکاری[9] ۲۰۱۱؛ وو[10] و دیگران، ۲۰۱۱). افزایش miR-133 در عضله نعلی، احتمالا بیان پروتئین‌های مسیر ذکر شده را سرکوب می کند. کاهش بیان miR-133 در عضله بازکننده بلند انگشتان نیز احتمالا منجر به تنظیم سنتز پروتئین های این مسیر می‌شود و سرکوب بیان ژن توسط miR-133 را مسدود می‌کند.

از جمله محدودیت های تحقیق حاضر این بود که پروتئین های پایین دست miR-133 ارزیابی و بررسی نشدند؛ لذا پیشنهاد می شود ضمن بررسی مجدد سازگاری ایجاد شده در عضلات اسکلتی، پروتئین‌های هدف miR-133 نیز ارزیابی شود.

نتیجه گیری: بر طبق نتایج، تمرین استقامتی احتمالا تغییراتی را در بیان miR-133 و ژن SRF ایجاد می کند که با نیازها و خصوصیات تارهای تند و کند انقباض متناسب هستند و در ایجاد سازگاری با این تمرینات موثر واقع می شوند. با این وجود، به دلیل اهمیت miR-133 و SRF در فرآیندهای مختلف سلولی و ارتباط آن ها با مسیرهای پیام دهی و تاثیر بر تنظیم پروتئین‌های گوناگون درگیر در این مسیرها، لازم است مطالعات بیشتری صورت گیرد.

قدردانی و تشکر

این مطالعه حاصل رساله دکترای فیزیولوژی ورزش دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید چمران اهواز است، بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده تربیت بدنی شهید چمران اهواز و تمام کسانی که در اجرای آن همکاری کردند قدردانی می‌شود.

1. Myoblast determination protein 1
2. Myogenic regulatory factor 4
3. Kadi
4. Coffey
5. Sweetman
6. Soci
7. Phosphatidylinositol triphosphate/ Protein Kinase B
8. Huang
9. Schiaffino & Mammucari
10. Wu

www.SID.ir

منابع

Callis, T. E., Chen, J. F., & Wang, D. Z. (2007). MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA and Cell Biologyl, 26***(4), 219-225.**

Callis, T. E., Deng, Z., Chen, J. F., & Wang, D. Z. (2008). Muscling Through the microRNA World. *Experimental Biology and Medicine, 233***(2), 131-138.**

Chen, J. F., Mandel, E. M., Thomson, J. M., Wu, Q., Callis, T. E., Hammond, S. M., ... & Wang, D. Z. (2006). The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics, 38***(2), 228-233.**

Coffey, V. G., Shield, A., Canny, B. J., Carey, K. A., Cameron-Smith, D., & Hawley, J. A. (2006). Interaction of contractile activity and training history on mRNA abundance in skeletal muscle from trained athletes. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism, 290***(5), E849-855.**

Drummond, M. J., McCarthy, J. J., Fry, C. S., Esser, K. A., & Rasmussen, B. B. (2008). Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, *295***(6), E1333-1340.**

Ebrahimpour, S., & Irandoust, K. (2016). The effects of aerobic exercise and omega-3 supplementation on plasma ghrelin and appetite levels in obese women. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 4***(7), 33-42. [Persian]**

Elia, L., Contu, R., Quintavalle, M., Varrone, F., Chimenti, C., Russo, M. A., ... & Condorelli, G. (2009). Reciprocal regulation of microRNA-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. *Circulation*, *120***(23), 2377-2385.**

Ghorbanian, B., & Ghasemnian, A. (2016). The effects of 8 weeks interval endurance combined training on plasma TNF-α, IL-10, insulin resistance and lipid profile in boy adolescents. *Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, 4***(7), 43-54. [Persian]**

Huang, M. B., Xu, H., Xie, S. J., Zhou, H., & Qu, L. H. (2011). Insulin-like growth factor-1 receptor is regulated by microRNA-133 during skeletal myogenesis. *PLOS ONE, 6***(12), e29173.**

Jin, H., Yang, R., Li, W., Lu, H., Ryan, A. M., Ogasawara, A. K., … & Paoni, N. F. (2000). Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *American Journal of Physiology -Heart* and *Circulatory Physiology*, *279* **(6), H2994-3002.**

Kadi, F., Johansson, F., Johansson, R., Sjostrom, M., & Henriksson, J. (2004). Effects of one bout of endurance exercise on the expression of myogenin in human quadriceps muscle. *Histochemistry and Cell Biology, 121***(4), 329-334.**

Keller, P., Vollaard, N. B., Gustafsson, T., Gallagher, I. J., Sundberg, C. J., Rankinen, T., … & Timmons, J. A. (2011). A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *Journal* of *Applied Physiology, 110***(1), 46-59.**

www.SID.ir

Kirby, T. J., & McCarthy, J. J. (2013). MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation. *Free Radical Biology* and *Medicine, 64*, **95-105.**

Lewis, A., Riddoch-Contreras, J., Natanek, S. A., Donaldson, A., Man, W. D., Moxham, J., ... & Kemp, P. R. (2012). Downregulation of the serum response factor/miR-1 axis in the quadriceps of patients with COPD. *Thorax, 67***(1), 26-34.**

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ method. *Methods, 25***(4), 402-408.**

McCarthy, J. J., & Esser, K. A. (2007). MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology*, *102***(1), 306-313.**

Mishima, Y., Abreu-Goodger, C., Staton, A. A., Stahlhut, C., Shou, C., Cheng, C., ... & Giraldez, A. J. (2009). Zebrafish miR-1 and miR-133 shape muscle gene expression and regulate sarcomeric actin organization. *Genes & Development*, *23***(5), 619-632.**

Nielsen, S., Scheele, C., Yfanti, C., Akerstrom, T., Nielsen, A. R., Pedersen, B. K., & Laye, M. (2010). Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *The Journal of Physiology, 588***(20), 4029-4037.**

Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research, 29***(9), e45.**

Russell, A. P., Lamon, S., Boon, H., Wada, S., Guller, I., Brown, E. L., ... & Wadley, G. D. (2013). Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. *The Journal of Physiology, 591***(18), 4637-4653.**

Safdar, A., Abadi, A., Akhtar, M., Hettinga, B. P., & Tarnopolsky, M. A. (2009). miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57Bl/6J Male Mice. *PLOS ONE*,*4***(5), e5610.**

Schiaffino, S., & Mammucari, C. (2011). Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skeletal Muscle, 1***(1), 4.**

Soci, U. P. R., Fernandes, T., Hashimoto, N. Y., Mota, G. F., Amadeu, M. A., Rosa, K. T., ... & Oliveira, E. M. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 43***(11), 665-673.**

Sun, C. Y., She, X. M., Qin, Y., Chu, Z. B., Chen, L., Ai, L. S., ... & Hu, Y. (2013). miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF. *Carcinogenesis, 34***(2), 426-435.**

Sun, L., Shen, W., Liu, Z., Guan, S., Liu, J., & Ding, S. (2010). Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients. *Life* Sciences, *86***(1-2), 39-44.**

Sweetman, D., Goljanek, K., Rathjen, T., Oustanina, S., Braun, T., Dalmay, T., & Munsterberg, A. (2008). Specific requirements of MRFs for the expression of muscle specific microRNAs, miR-1, miR-206 and miR-133. *Developmental Biology, 321***(2), 491-499.**

www.SID.ir

Talmadge, R. J. (2000). Myosin heavy chain isoform expression following reduced neuromuscular activity: potential regulatory mechanisms. *Muscle & Nerve, 23***(5), 661-679.**

Thum, T., Bauersachs, J. (2009). MicroRNAs in cardiac hypertrophy and failure. Drug Discovery Today: *Disease Mechanisms*, *5***(3-4), e279-e283.**

van Rooij, Eva, Liu, Ning, Olson, Eric N. (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*, *24***(4), 159-166.**

Williams, A. H., Liu, N., van Rooij, E., & Olson, E. N. (2009). MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology*, *21***(3), 461-469.**

Wu, M., Falasca, M., Blough, E. R. (2011). Akt /protein kinase B in skeletal muscle physiology and pathology. *The Journal* of *Cellular Physiology, 226***(1), 29-36.**

Yin, H., Pasut, A., Soleimani, V. D., Bentzinger, C. F., Antoun, G., Thorn, S., Rudnicki, M. A. (2013). MicroRNA-133 controls brown adipose determination in skeletal muscle satellite cells by targeting Prdm16. *Cell Metabolism*, *17***(2), 210-224.**

Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. N., Jr. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *Bioinformatics*, *7*, **85.**

www.SID.ir

Archive of SID

Abtract

The effect of endurance training expression on of miR-133 and SRF gene in slow and fast witch skeletal muscles of Wistar rats

Raziyeh Rezaei[1], Saeed Shakeriyan[2]*, Masoud Nikbakht[2], Faranak Hadi[3]

1. Ph.D Student of Exercise Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. Associate Professorof Exercise Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
3. Assistant of Molecular Genetic, Lorestan university, Khoramabad, Iran.

Background And Aim: MicroRNA-133 and SRF is involved in various cellular processes, but the effect of endurance training on gene expression of this factors in fast and slow twitch muscles has still remained unclear. The aim of this study was to evaluate the effect of endurance training on miR-133 and SRF gene expression in fast and slow twitch muscles in male Wistar rats. **Materials and Methods**: In this study, 14 rats weighing 113±20 grams (5 weeks age) were housed under controlled conditions, after familiarization protecols they were randomly assigned into control (7 rats) and experimental (7 rats) groups. The experimental group performed 14 weeks, 6 session per week endurance training program (that gradually reached to 60 min and 30 m/min) on treadmill and 48 hours after the end of the last session, both groups were sacrificed. The soleus and EDL muscles were removed. The gene expression level of miR-133 and SRF were measured using real- time RT-PCR. Data were analysd by sample t-test. **Results**: After 14 weeks of endurance training the gene expression of miR-133 of fast twitch muscle (EDL) in experimental group significantly decreased (p=0.001) than control group .But the miR-133 gene expression of slow twitch muscle (soleus) in experimental group was significantly increased (p=0.001) than control group. Also miR-133 gene expression of EDL of experimental group was significantly decresed (p=0.001) than soleus muscle of the same group; the rate of SRF gene expression of EDL of experimental group increased significantly (p=0.009) but it did not effect on SRF gene expression in soleus. **Conclusion:** Endurance training induced differences in gene expression of miR-133 and SRF gene consistent to specification of fast and slow twitch muscles.

Keywords: Endurance training, Fast twitch muscle, Slow twitch muscle, SRF gene, miR-133 gene

Journal of Practical Studies of Biosciences in Sport, vol. 6, no. 12, Fall & Winter 2018/2019
Received: Jan 4, 2017 Accepted: Apr 25, 2017

***Corresponding Author, Address: Department of Exercise Physiology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran;**
Email: sashakeryan@gmail.com **DOI: 10.22077/ jpsbs.2017.471.1182**

www.SID.ir