



اثر تمرین استقامتی بر بیان $miR-196a$, $miR-133a$ و پروتئین UCP-1 در بافت چربی سفید زیر پوستی موش‌های صحرایی نر ویستار

سعید دانش یار^{۱*}، محمدرضا کردی^۲، مهدی کدیور^۲، سمانه افشاری^۲

^۱گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه آیت ... العظمی بروجردی، بروجرد، ایران.

^۲دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳گروه بیوشیمی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۲/۱۷

اصلاح مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۱۳

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۲۴

چکیده

هدف: هدف از این پژوهش، بررسی اثر تمرین استقامتی بر بیان $miR-196a$, $miR-133a$ و UCP-1 در بافت چربی سفید زیر پوستی است.

روش‌ها: شانزده موش صحرایی نر ویستار به صورت تصادفی به دو گروه: کنترل (تعداد: هشت) و تمرین استقامتی (تعداد: هشت) تقسیم شدند. موش‌های گروه‌های تمرینی، به مدت هشت هفته، تحت تمرین استقامتی مداومی روی نوارگردان قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌های هدف از روش Real Time-PCR استفاده شد.

نتایج: داده‌ها نشان داد که بیان نسبی ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک (UCP-1) در گروه استقامتی در قیاس با گروه کنترل به صورت معناداری بیشتر بود ($P < 0.05$). با این حال، تفاوت بیان $miR-133a$ و $miR-196a$ در گروه استقامتی نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معناداری نبود ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی علی‌رغم افزایش در بیان UCP-1، تغییری در بیان $miR-133a$ و $miR-196a$ در بافت چربی سفید زیرپوستی ایجاد نکرد؛ دلالت بر این که افزایش بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک که بر اثر تمرین استقامتی حاصل شده است، با تغییرات بیان $miR-133a$ و $miR-196a$ ناشی از تمرین استقامتی همراستا نیست.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، $miR-196a$, $miR-133a$ ، بافت چربی سفید.

مقدمه

چاقی اختلال در تعادل بین دریافت انرژی و مصرف انرژی است؛ به طوری که مصرف انرژی بدن در قیاس با دریافت انرژی کاهش می یابد که حاصل آن، تجمع لیپید و افزایش وزن است (۱). بخشی از مصرف انرژی در بدن از طریق گرمزایی تطبیقی^۱ حاصل می شود (۲). از سوی دیگر، بخشی از گرمزایی در شرایط تطبیقی و گرمزایی در شرایط متابولیسم پایه، از طریق گرمزایی غیرلرزشی^۲ بروز می یابد (۳). این نوع گرمزایی از طریق پروتئین های گرمزا^۳ یا پروتئین های غیر جفت کننده (UCPs)^۴ حاصل می شود (۴).

پروتئین غیر جفت کننده یک (UCP-1)^۵ یکی از پروتئین های گرمزای مهم محسوب می شود (۵). این پروتئین در غشای داخلی میتوکندری سلول های چربی قهوه ای (۶) و همچنین، سلول های شبه قهوه ای^۶ (بریت^۶ یا بژ^۷) واقع در بافت چربی سفید، قرار دارد (۷، ۸). این پروتئین نقش مهمی در اتلاف انرژی به صورت حرارت دارد (۹). مطالعات بیان گر این واقعیت هستند که پروتئین غیر جفت کننده یک، نقش پیشگیری کننده در مقابل افزایش وزن و چاقی ایفا می کند (۳، ۵، ۱۰-۱۲) و می تواند به عنوان هدف درمانی مهم برای مقابله با افزایش وزن و چاقی منظور شود (۱۳).

مطالعات نشان داده اند، عوامل محیطی، دارویی و تغذیه ای متعددی در القاء بیان پروتئین غیر جفت کننده یک در بافت چربی سفید نقش دارند (۱۴-۱۶). اخیراً، تمرینات ورزشی به عنوان محرک مناسب برای بیان پروتئین غیر جفت کننده یک در بافت چربی سفید مطرح شده است (۱۷-۲۴). چندین مطالعه نقش عوامل تنظیم گر در بیش تنظیمی پروتئین غیر جفت کننده یک ناشی از تمرین ورزش را مورد بررسی قرار داده است و تا کنون نقش آریزین^۹ (۱۸)، گیرنده آلفا-۱ فعال کننده تکثیر پروکسیزومی

گاما (PGC-1α)^{۱۰} (۲۲) و اینترلوکین شش (IL-6) (۲۰) در این سازوکار، مشخص شده است. با وجود این، مطالعات گسترده تر در زمینه کشف و توسعه عوامل دخیل در القاء بیان پروتئین غیر جفت کننده یک ناشی از تمرین، احساس نیاز می شود.

از طرفی، میکرو ریبونوکلئیک (به صورت اختصار میر^{۱۱} (miRNA))، مولکول های ریبونوکلئیک (RNA) کوچک غیر کدکننده هستند که در تنظیم پس رونویسی بیان ژن (مهار)، ایفاء نقش می کنند (۲۵). نقش برخی از میکرو ریبونوکلئیک در نمو بافت چربی قهوه ای و قهوه ای شدن بافت چربی نشان داده شده است (۲۶، ۲۷). از این بین، نقش میر ۱۹۶-آلفا (miR-196a) و میر ۱۳۳-آلفا (miR-133a) در تنظیم بیان ژن پروتئین غیر جفت کننده یک بیشتر مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۷).

میر ۱۹۶-آلفا، بر اثر القاء سرما و آگونیست بتا آدرنرژیک، در طی نمو سلول های شبه قهوه ای (در بافت چربی سفید)، بیش تنظیم می شود (۲۸). میر ۱۹۶-آلفا برای بیان ژن های چربی قهوه ای ضروری است؛ به گونه ای که در موش های تراخیخته که ژن میر ۱۹۶-آلفا بیش بیان شده بود، بیان ژن های چربی قهوه ای به ویژه بیان ژن پروتئین غیر جفت کننده یک و همچنین خوشه های سلول های شبه قهوه ای افزایش یافتند (دال بر قهوه ای شدن بافت چربی سفید) (۲۸).

میر ۱۳۳-آلفا (میر ویژه عضلانی) به میزان زیاد در ادیپوسایت های قهوه ای و شبه قهوه ای (بریت یا بژ) یافت می شود (۲۶، ۲۷). مطالعات نشان داده اند، میر ۱۳۳-آلفا موجود در بافت چربی قهوه ای و بافت چربی زیرپوستی با قرارگیری در سرما کاهش تنظیمی می یابد (۲۷). میر ۱۳۳-آلفا تولید سلول چربی قهوه ای (در بافت چربی قهوه ای) و تولید-تمایز سلول های چربی شبه قهوه ای در بافت چربی سفید (که موجب قهوه ای شدن بافت چربی سفید

نمونه‌های گروه تمرینی، پس از دو هفته آشناسازی با محیط و نوارگردان به مدت هشت هفته تحت تمرین استقامتی قرار گرفتند.

پروتکل پژوهش

تمرین هوازی تجویز شده در این پژوهش در برگیرنده دویدن بر روی نوارگردان با شیب صفر درجه، به مدت هشت هفته و هفته‌ای پنج جلسه بود. این پروتکل تمرینی بر اساس افزایش تدریجی بارکاری شامل شدت (سرعت) و حجم (مدت) تمرین طراحی شده بود (۳۱، ۳۲)، که جزئیات بیشتر آن در جدول ۱ نشان ارائه شده است.

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی بر روی نوارگردان

مدت (دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)	
۲۰	۱۵	هفته اول
۲۰	۲۰	هفته دوم
۲۵	۲۰	هفته سوم
۲۵	۲۵	هفته چهارم
۲۵	۲۵	هفته پنجم
۳۰	۲۵	هفته ششم
۳۰	۳۰	هفته هفتم
۳۵	۳۰	هفته هشتم

توضیح: شیب نوارگردان صفر درجه بود.

روش‌های آزمایشگاهی

استخراج بافت: ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و پس از یک شب ناشتایی، حیوانات از طریق تزریق درون صفاقی زایلازین (۱۰ میلی گرم/کیلوگرم) و کتامین (۷۵ میلی گرم/کیلوگرم) بی هوش شدند و چربی زیرپوستی ناحیه ران آن‌ها برداشته شد و در داخل میکروتیوب قرار گرفت (۳۳، ۳۴). سپس، میکروتیوب‌ها (حاوی نمونه‌های بافتی) به سرعت در

می‌شود) را مهار می‌کند (۲۶، ۲۷، ۲۹، ۳۰). اگرچه، نقش مهم میر-۱۹۶آلفا و میر-۱۳۳آلفا در میانجی‌گری بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک پس از القاء سرما و محرک بتا آدرنرژیک مشخص شده است. با وجود این، هنوز معلوم نیست که آیا این تنظیم‌گرها (میرها) در بیش‌تنظیمی پروتئین غیر جفت‌کننده یک پس از تجویز تمرین استقامتی نیز دخالت دارند؟ بنابراین، این مسئله طرح می‌شود که آیا بیان میر-۱۹۶آلفا و میر-۱۳۳آلفا که تنظیم‌گرهای مهم برای القاء بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک محسوب می‌شوند، بر اثر تمرین استقامتی دچار تغییر می‌شوند؟ اهمیت این تحقیق اینجاست که در حال بسیاری از محققان به دنبال کشف عوامل دخیل در القاء بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک پس از انجام تمرین استقامتی هستند. از این رو، این مطالعه می‌تواند ارتباط و یا عدم ارتباط بین بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک و بیان میرهای ۱۳۳آلفا و ۱۹۶آلفا را مشخص نماید.

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

تعداد شانزده نر موش صحرایی نر نژاد ویستار (در سن هشت هفته و با میانگین وزنی 220 ± 25)، از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها بر اساس دستورالعمل انجمن حمایت از حیوانات آزمایشگاهی برای انجام اهداف علمی و آزمایشگاهی نگهداری شدند؛ نمونه‌ها تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای 22 ± 3 درجه سانتیگراد و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد نگهداری می‌شدند. در طول نگهداری حیوانات، آب و غذا به میزان دلخواه در اختیار آن‌ها گذاشته می‌شد. آزمودنی‌ها پس از همسان‌سازی وزن به صورت تصادفی به دو گروه: (۱) کنترل (هشت سر) و (۲) تمرین استقامتی (هشت سر) تقسیم شدند.

به طور خلاصه: ۵۰ میلی گرم از نمونه بافت چربی، پس از افزودن یک میلی لیتر محلول آر-آن-ایکس (RNX)، از طریق دستگاه هم زن همگون شد. بافت همگون شده در دوره‌های متفاوت سانتریفوژ شد که محصول آن تشکیل رسوب حاوی ریبونوکلیئیک (RNA) بود که پس از اضافه کردن آب دپس (به مدت ۱۰ دقیقه درون دستگاه ترموبلاک (کیاژن-کانادا) در دمای ۵۵ °C آنکوبه شد. در مرحله آخر، کمیت و کیفیت ریبونوکلیئیک (RNA) استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (ترمو آمریکا) تعیین شد (با طیف نوری ۲۶۰/۲۸۰).

سننژ مکمل دِاوکسی ریبونوکلیئیک (cDNA): ریبونوکلیئیک (RNA) استخراج شده در مرحله قبل، به روش رونویسی معکوس، توسط دستورالعمل کیت سننژ مکمل دِاوکسی ریبونوکلیئیک (cDNA) به مکمل دِاوکسی ریبونوکلیئیک (cDNA) تبدیل شد. Real Time- PCR: برای نمایان سازی این واکنش از دو روش سایبرگرین^{۱۹} (به منظور سنجش ریبونوکلیئیک پیام بر (mRNA)) و تگ من^{۲۰} (برای سنجش miRNA) استفاده شد. در روش سایبرگرین، از سایبر پری مکس اکس تگ (اپلیکون، دانمارک)^{۲۱} و آغازگرهای ژن‌های هدف استفاده شد، و در روش تگ من، از مسترمیکس تگ من تاکارا^{۲۲} و مجموعه آغازگرها و پروب استفاده شد.

پس از آماده سازی اولیه، از طریق دستگاه ریل تایم پی سی آر^{۲۲}، با برنامه زمانی ذیل، تکثیر ریبونوکلیئیک پیام بر (mRNA) و میر (miRNA) تحت چرخه‌هایی دمایی مورد پایش قرار گرفت: ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ °C، چرخه ۵ ثانیه در دمای ۹۵ °C و ۴۰ ثانیه‌ای در دمای ۶۴ °C (برای ژن پروتئین غیر جفت کننده (۱) و ۶۰ °C (برای ژن میر-۱۹۶-آلفا) و ۶۲ °C (برای ژن میر-۱۳۳-آلفا) استفاده شد. پس از انجام واکنش تکثیر با Real Time- PCR، داده‌های خام به صورت چرخه

داخل تانک حاوی نیتروژن مایع، قرار داده شدند تا منجمد شوند. نمونه‌های بافتی از طریق آن تانک به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در آزمایشگاه، از تانک به داخل یخچال فریزر (۸۰-) انتقال یافتند.

اندازه گیری: به منظور اندازه‌گیری بیان ژن پروتئین غیر جفت کننده یک (UCP-1)، میر-۱۹۶-آلفا و میر-۱۳۳-آلفا از روش Real Time- PCR استفاده شد که مراحل آن بدین صورت بود: طراحی و سننژ پرایمر، استخراج ریبونوکلیئیک (RNA)، سننژ مکمل دِاوکسی ریبونوکلیئیک (cDNA)، تکثیر و پایش آن توسط دستگاه Real Time- PCR.

طراحی و سننژ پرایمر: پرایمر ژن پروتئین غیر جفت کننده یک (ژن‌های هدف) و ژن گلیسرآلدئید سه فسفات دهیدروژناز (GAPDH)^{۱۲} به عنوان ژن مرجع^{۱۳} و همچنین پرایمر میر-۱۹۶-آلفا و میر-۱۳۳-آلفا (ژن‌های هدف) و یو شش (U6) (ژن مرجع) توسط شرکت تکاپو زیست سننژ شد که توالی آن بدین صورت است:

UCP-1: F: 5'-CAAAGTCCGCCTCAGATC-3', R:

5'-TGGTGATGGTCCCTAAGAC-3'

GAPDH: F: 5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTTCG-3', R:

5'-GGGGTCATTGATGGCAACA-3'

miR-196a-5p: F: GGCGCTAGGTAGTTTCATG

, Probe: FAM TGTGGCCCTGCGTCCTGCAGTCT
BHQ1

miR-133a-5p: F: CGCAGCTGGTAAAATGG, Probe:

FAM TGTGGCCCTGCGTCCTGCAGTCT BHQ1

U6 snRNA: F: CTCGCTTCGGCAGCACA, R:

AACGCTTACGAATTTGCGT

استخراج ریبونوکلیئیک (RNA): RNAی تام^{۱۴} (شامل ریبونوکلیئیک پیام بر (mRNA) و میر (miRNA)) بافت چربی طبق دستورالعمل کیت آر-آن-ایکس پلاس (فرمنتاز-آلمان)^{۱۵} استخراج شد.

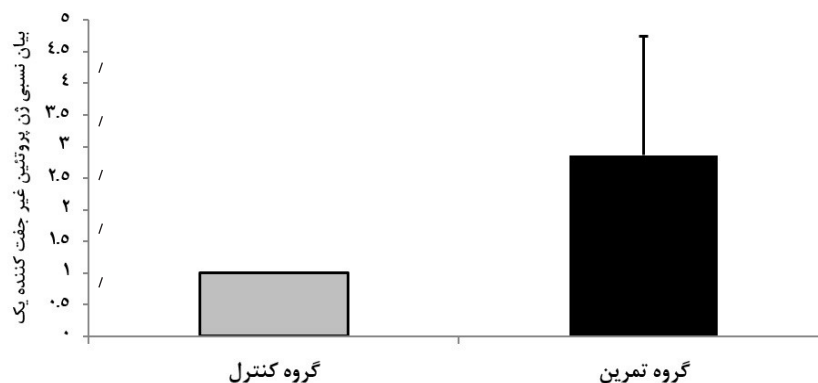
برای تحلیل آماری داده‌های بیان ژن، ابتدا تفاضل چرخه آستانه (ΔCt) ($Ct_{target} - Ct_{con}$) تک تک نمونه‌ها وارد نرم افزار SPSS شد. سپس داده‌ها، توسط آزمون تی مستقل تحلیل شدند. بر اساس برون ده تحلیلی و توصیفی که از آزمون ذکر شده به دست آمد؛ در حقیقت تفاضل چرخه آستانه ($-\Delta\Delta Ct$) مشخص گردید. سپس، از طریق معادله $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ، میزان بیان ژن، محاسبه شد.

سطح معنی داری برای آزمون‌های آماری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

بر اساس کولموگروف اسمیرنوف (K-S) مشخص گردید که داده‌های تمامی متغیرها در گروه‌های پژوهش، توزیع طبیعی دارا هستند. بیان نسبی ژن پروتئین غیر جفت کننده یک در گروه استقامتی به طور معنی داری بیشتر از گروه کنترل بود ($P = 0.042$; $2/86 \pm 1/89$) (شکل ۱).

همچنین مشخص شد؛ تفاوت بیان نسبی ژن میر-۱۹۶ آلفا در گروه تمرین، نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ($P = 0.39$; $1/63 \pm 1/48$) (شکل ۲). تفاوت بیان نسبی ژن میر-۱۳۳ آلفا نیز در گروه تمرین، نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود ($P = 0.52$; $1/34 \pm 1/13$) (شکل ۳).



شکل ۱. بیان نسبی ژن پروتئین غیر جفت کننده یک موش‌های صحرایی در متعاقب تمرین استقامتی داده‌های نمودار به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین ارائه شده اند. * بیان گر معنادار بودن است ($P < 0.05$).

آستانه ژن (Ct)، استخراج شدند.

کمی سازی میزان بیان ژن: پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، چرخه آستانه (Ct) هر نمونه بدست آمد. آستانه ژن‌های هدف (Ct_{target}) هر نمونه از چرخه آستانه ژن خانه گردان (GAPDH) همان نمونه کم شد.

$$A = \Delta Ct = Ct_{\text{خانه گردان}} - Ct_{\text{هدف}}$$

در مرحله بعد، تفاضل چرخه آستانه (ΔCt) هر نمونه تمرین کرده، از تفاضل چرخه آستانه (ΔCt) نمونه کنترل (شاهد) کم شد.

$$B = \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{تمرین کرده}} - \Delta Ct_{\text{کنترل}}$$

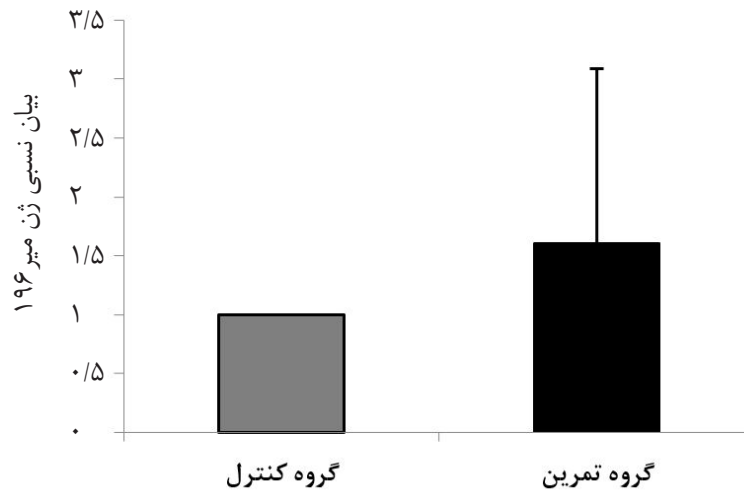
در مرحله آخر، منفی عدد بدست آمده تفاضل چرخه آستانه ($-\Delta\Delta Ct$) را به نمای دو رسانده و بدین ترتیب بیان نسبی ژن‌های هدف بدست آمد.

$$C = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

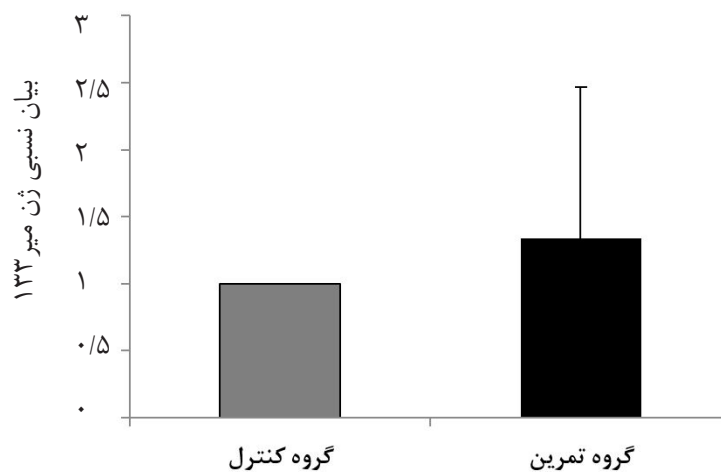
تحلیل آماری

از آمار توصیفی برای دسته بندی داده‌های خام استفاده شد (اکسل-۲۰۱۳) ^{۲۵}. از آزمون کولموگروف اسمیرنوف (K-S) برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها و از آزمون تی مستقل (t-test)، برای مقایسه متغیرهای وزن و بیان ژن در گروه‌های تحقیق استفاده شد (SPSS-۲۳) ^{۲۶}.

★



شکل ۲. بیان نسبی میو-۱۹۶ آلفا موش‌های صحرایی نر متعاقب تمرین استقامتی داده‌های نمودار به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین ارائه شده اند.



شکل ۳. بیان نسبی میو-۱۳۳ آلفا موش‌های صحرایی متعاقب تمرین استقامتی داده‌های نمودار به صورت میانگین \pm خطای استاندارد از میانگین ارائه شده اند.

بحث و نتیجه گیری

یافته اول این مطالعه، هم سو با یافته‌های پژوهش‌های مشابه در گذشته است؛ که افزایش بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک پس از هشت هفته تمرین استقامتی در بافت چربی پشت صفاقی موش‌های صحرایی (۱۹)، پس از هشت هفته تمرین هوازی در بافت چربی سفید احشائی منطقه

یافته‌های این مطالعه نشان داد؛ متعاقب هشت هفته تمرین استقامتی، بیان ژن پروتئین غیر جفت‌کننده یک را بیش از دو برابر افزایش داد. با این حال، این تمرین، تغییری معناداری در بیان میو-۱۹۶ آلفا و میو-۱۳۳ آلفا ایجاد نکرد.

میر-۱۳۳ آلفا، مهارکننده بیان پروتئین دارای ناحیه تنظیمی مثبت (PRDM16) محسوب می‌شود. با کاهش بیان میر-۱۳۳ آلفا، بیان پروتئین دارای ناحیه تنظیمی مثبت (عامل تمایز سلول چربی قهوه‌ای) در سلول‌های اجدادی سفید و سلول‌های چربی قهوه‌ای افزایش می‌یابد که به ترتیب موجب تقویت تمایز سلول‌های شبه قهوه‌ای و سلول‌های قهوه‌ای می‌شود (۲۶، ۲۷، ۳۵). در این مطالعه، افزایشی در بیان میر-۱۳۳ آلفا پس از هشت هفته تمرین استقامتی، مشاهده نشد. این یافته دلالت بر این دارد که افزایش بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک که پس از تمرین استقامتی حاصل می‌شود، با تغییرات بیان میر-۱۳۳ آلفا (ناشی از تمرین استقامتی) هم سو نیست.

پژوهش‌های گذشته نشان داده اند؛ سرما و آگونیست بتا آدرنرژیک قادر هستند، بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا را در سلول‌های شبه قهوه‌ای واقع در بافت چربی سفید، بیش تنظیم نمایند (۲۷، ۲۸). از سوی دیگر، مشخص شده است که تحریک آدرنرژیکی که با افزایش نوراپی نفرین گردش خون مشخص می‌شود، در حین فعالیت ورزشی حاد افزایش می‌یابد (۳۶-۳۸). در نتیجه، تمرین هوازی-استقامتی به شکل مزمن موجب تجمع اثرات آدرنرژیکی یا هورمون‌های کاتاکولامینی در بیشتر بافت‌های بدن از جمله بافت چربی سفید می‌شود. بر این اساس نیز انتظار می‌رفت بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا در بافت چربی سفید، از طریق تمرین استقامتی متأثر شود. اما دلایل احتمالی عدم تغییر بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا ناشی از تمرین استقامتی (در این مطالعه) احتمالاً مربوط به موارد ذیل است: اول- تحریک آدرنرژیکی ناشی از تمرین استقامتی (تجویز شده) احتمالاً در حدی نیست که بتواند بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا را در بافت چربی سفید القأ نماید. دوم- میزان خون‌رسانی یا جریان خون

اپیدیدمال موش‌ها (۲۳)، پس از پنج هفته تمرین استقامتی در بافت چربی احشائی موش (۲۲)، پس از شش هفته تمرین شنا در بافت چربی زیرپوستی (۲۴)، پس از سه هفته تمرین روی چرخ دوار در بافت چربی زیرپوستی موش (۱۸)، و پس از هشت هفته تمرین هوازی در بافت چربی زیرپوستی موش‌های صحرائی (۱۷) گزارش نموده اند.

سرما و محرک آدرنرژیک منجر به افزایش بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا می‌شود. میر-۱۹۶ آلفا نیز به صورت مستقیم بیان ژن هوکس پروتئین سی-هشت (HOXC8) را مهار می‌کند. هوکس پروتئین سی-هشت با هدف قرار دادن ژن پروتئین اتصالی به عنصر پاسخی AMP حلقوی (C/EBP β)^{۲۷}، باعث سرکوبی بیان ژن آن می‌شود. پروتئین اتصالی به عنصر پاسخی AMP حلقوی نیز به عنوان عامل مهم رونویسی در تنظیم بیان ژن‌های چربی قهوه‌ای (از جمله پروتئین غیر جفت‌کننده یک) عمل می‌کند. بنابراین، بیش تنظیمی میر-۱۹۶ آلفا ناشی از هر محرکی، موجب القاء بیان ژن‌های قهوه‌ای (از جمله پروتئین غیر جفت‌کننده یک) و نمو سلول‌های شبه قهوه‌ای در بافت چربی سفید می‌شود (۲۸). در این مطالعه، پس از هشت هفته تمرین استقامتی تغییری در بیان میر-۱۹۶ آلفا مشاهده نشد. این یافته دلالت بر این دارد که افزایش بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک که پس از تمرین استقامتی حاصل می‌شود، با تغییرات بیان میر-۱۹۶ آلفا (ناشی از تمرین استقامتی) هم سو نیست.

میر-۱۳۳ آلفا با قرارگیری در سرما در بافت چربی قهوه‌ای و بافت چربی زیرپوستی کاهش تنظیمی می‌یابد (۲۷). در واقع، سرما با تحریک بتا آدرنرژیک، موجب افزایش آدنوزین منو فسفات حلقوی (cAMP)^{۲۸} می‌شود، که منجر به کاهش بیان عامل تقویت‌کننده میوسیت (MEF2C)^{۲۹} و متعاقب آن کاهش تنظیمی میر-۱۳۳ آلفا می‌شود. از آن جا که،

- ¹⁰ Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha (PGC-1 α)
- ¹¹ Micro RNA
- ¹² Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
- ¹³ House Keeping
- ¹⁴ Total RNA
- ¹⁵ RNX-pluse: Fermentase, German
- ¹⁶ Kiagen Tech, Canada
- ¹⁷ Thermo, USA
- ¹⁸ ViVANTis, Malaysia
- ¹⁹ Sybr Green
- ²⁰ TaqMan
- ²¹ SYBR®Premix Ex Tag TM; Ampliqon, Denmark
- ²² TaKaRa Premix Ex Taq (probe qPCR)
- ²³ RG-6000, Corbett, Australia
- ²⁴ Threshold cycle
- ²⁵ EXCEL2013
- ²⁶ SPSS23
- ²⁷ cAMP Response Element Binding Protein
- ²⁸ Cyclic adenosine monophosphate
- ²⁹ Myocyte Enhancer Factor 2C

به بافت چربی سفید کم است (۳۹)، از این رو، میزان نوراپی نفرین گردش خون که در بافت چربی سفید توزیع می‌یابد، احتمالاً در حدی نیست که قادر باشد در القاء بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا نقش محسوس ایفا کند. سوم-تعداد گیرنده‌های بتا آدرنرژیک در سلول‌های بافت چربی سفید احتمالاً در مقایسه با بافت‌های دیگر بدن کم است (۴۰)، بنابراین، تصور می‌شود، پیام‌های مربوط به این هورمون‌ها (کاتاکولامین‌های گردش خون) به خوبی به درون سلول مخابره نمی‌شود تا بتواند در القاء بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا اثر گذار باشد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تمرین استقامتی، ممکن است در افزایش بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک، نقش داشته باشد با این حال، احتمالاً تأثیری در بیان ژن میر-۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا در بافت چربی زیرپوستی ندارد. به عبارتی، به دنبال تمرین استقامتی، بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک به طور بارزی افزایش می‌یابد، ولی بیان میرهای ۱۳۳ آلفا و ۱۹۶ آلفا بدون تغییر قابل توجه باقی خواهند ماند. این یافته نشان می‌دهد، احتمالاً افزایش بیان پروتئین غیر جفت‌کننده یک که با تمرین استقامتی حاصل شد، با تغییرات بیان میرهای ۱۹۶ آلفا و میر-۱۳۳ آلفا ناشی از تمرینات استقامتی همسو نیست.

منابع

1. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001;104(4):531-43.
2. Donahoo WT, Levine JA, Melanson EL. Variability in energy expenditure and its components. *Curr Opin Clin Nutr*. 2004;7(6):599-605.
3. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diab tologia*. 2001;44(8):946-65.
4. Schrauwen P, Walder K, Ravussin E. Human uncoupling proteins and obesity. *Obes Res*. 1999;7(1):97-105.

پی‌نوشت‌ها

- ¹ Adaptive thermogenesis
- ² Non Shivering
- ³ Thermogenin
- ⁴ Uncoupling protein
- ⁵ Uncoupling protein 1
- ⁶ Brown-like Adipocyte
- ⁷ Brite
- ⁸ Beige
- ⁹ Irisin

5. Arechaga I, Ledesma A, Rial E. The mitochondrial uncoupling protein UCP1: a gated pore. *IUBMB life*. 2001;52(3-5):165-73.
6. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology*. 2011;2:85.
7. Walden TB. Regulatory factors that reveal three distinct adipocytes : the brown, the white and the brite. Stockholm: The Wenner-Gren Institute, Stockholm University, 2010.
8. Walden TB, Hansen IR, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Recruited vs. nonrecruited molecular signatures of brown, "brite," and white adipose tissues. *Am J Physiol-Endoc M*. 2012;302(1):E19-E31.
9. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757(5-6):480-5.
10. Dalgaard L, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and Type II diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(8):946-65.
11. Kopecky J, Clarke G, Enerbäck S, Spiegelman B, Kozak L. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *J Clin Invest*. 1995;96(6):2914.
12. Feldmann HM, Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality. *Cell metabolism*. 2009;9(2):203-9.
13. Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:339-63.
14. Brondani LA, Assmann TS, Duarte GC, Gross JL, Canani LH, Crispim D. The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(4):215-25.
15. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1831(5):969-85.
16. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev*. 2013;27(3):234-50.
17. Ringholm S, Grunnet Knudsen J, Leick L, Lundgaard A, Munk Nielsen M, Pilegaard H. PGC-1alpha is required for exercise- and exercise training-induced UCP1 up-regulation in mouse white adipose tissue. *PloS one*. 2013;8(5):e64123.
18. Knudsen JG, Murholm M, Carey AL, Bienso RS, Basse AL, Allen TL, et al. Role of IL-6 in exercise training- and cold-induced UCP1 expression in subcutaneous white adipose tissue. *PloS one*. 2014;9(1):e84910.

19. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
20. Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ. Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes*. 2015;64(7):2361-8.
21. Xu X, Ying Z, Cai M, Xu Z, Li Y, Jiang SY, et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced metabolic and vascular dysfunction, and increases adipocyte progenitor cell population in brown adipose tissue. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2011;300(5):R1115-25.
22. Reisi j, H R, K G, S-M M, M-R D. Effect of 8 weeks resistance training on plasma irisin protein level and muscle FNDC5 and adipose tissue UCP1 genes expression in male rats. *Sport Physiology*. 2016;7(28):117-30.
23. Reisi J, Ghaedi K, Rajabi H, Marandi SM. Can Resistance Exercise Alter Irisin Levels and Expression Profiles of FNDC5 and UCP1 in Rats? *Asian J Sports Med*. 2016;7(4):e35205.
24. Daneshyar S, Kordi MR, Gaeini AA, Kadivar M, Afshari S. The Effect of Endurance Training on Gene Expression of Uncoupling Protein 1(UCP-1) in Retroperitoneal White Adipose Tissue of Male Wistar Rats. *Razi Journal of Medical Sciences*. 2015;22(136):35-45. [Persian]
25. Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, et al. A PGC1-alpha-dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 2012;481(7382):463-8.
26. Ketting RF. microRNA Biogenesis and Function. *Regulation of microRNAs: Springer*; 2010. p. 1-14.
27. Zhou JY, Li L. MicroRNAs are key regulators of brown adipogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(11):1590-5.
28. Hilton C, Neville MJ, Karpe F. MicroRNAs in adipose tissue: their role in adipogenesis and obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2013;37(3):325-32.
29. Chen J, Deng S, Zhang S, Chen Z, Wu S, Cai X, et al. The role of miRNAs in the differentiation of adipose-derived stem cells. *Curr Stem Cell Res T*. 2014;9(3):268-79.
30. Trajkovski M, Lodish H. MicroRNA networks regulate development of brown adipocytes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013;24(9):442-50.
31. Mori M, Nakagami H, Rodriguez-Araujo G, Nimura K, Kaneda Y. Essential role for miR-196a in brown adipogenesis of white fat progenitor cells. *PLoS biology*. 2012;10(4):e1001314.
32. Trajkovski M, Ahmed K, Esau CC, Stoffel M. MyomiR-133 regulates brown fat differentiation through Prdm16. *Nat Cell Biol*. 2012;14(12):1330-5.

33. Liu W, Bi P, Shan T, Yang X, Yin H, Wang Y-X, et al. miR-133a regulates adipocyte browning in vivo. *PLoS Genet.* 2013;9(7):e1003626.
34. De Matteis R, Lucertini F, Guescini M, Polidori E, Zeppa S, Stocchi V, et al. Exercise as a new physiological stimulus for brown adipose tissue activity. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD.* 2013;23(6):582-90.
35. Kraemer WJ, Rogol AD. *The Endocrine System in Sports and Exercise.* International Olympic Committee, 2006.
36. Zouhal H, Jacob C, Delamarche P, Gratas-Delamarche A. Catecholamines and the effects of exercise, training and gender. *Sports Med.* 2008;38(5):401-23.
37. Cousineau D, De Champlain J, Nadeau R. Plasma norepinephrine response to exercise before and after training in humans. *Journal of Applied Physiology.* 1981;51(4): 812-815
38. Rosell S, Belfrage E. Blood circulation in adipose tissue. *Physiol Rev.* 1979;59(4):1078-104.
39. Berkowitz DE, Nardone NA, Smiley RM, Price DT, Kreutter DK, Fremeau RT, et al. Distribution of β 3-adrenoceptor mRNA in human tissues. *Eur J Pharmacol.* 1995;289(2):223-8.



Shahid Beheshti University

Sport and Exercise Physiology

Spring & Summer 2019/ No.1/ Vol. 12/ Pages:1-12

The effect of endurance training on expression of miR-196a , miR-133a and UCP-1, in subcutaneous white adipose tissue of male wistar rats

Saeed Daneshyar^{1*}, Mohammad Reza Kordi², Mehdi Kadivar³, Samane Afshari²

¹Department of Physical Education, Faculty of Humanities, University of Ayatollah Ahozma Boroujerdi, Boroujerdi, Iran.

²Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Tehran University, Tehran, Iran.

³Department of Biochemistry, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

Received: 14/05/2017

Revised: 23/04/2017

Accepted: 08 /03/2018

Abstract

Purpose: The aim of current study was to investigate the effect of endurance training on expression of miR-196a and miR-133a and UCP-1 in subcutaneous white adipose tissue (WAT).

Methods: Sixteen wistar rats were divided into two groups included: 1) Control (n=8) and 2) Endurance Training (n=8). The subjects of training group underwent continuous endurance training on treadmill for eight weeks. The gene expression of target genes was measured by Real Time-PCR method.

Results: Data showed that gene expression of UCP1 was significantly higher in trained group than control ($P < 0.05$). However, the expression of miR-196a and miR-133a were not significantly different between trained and control groups ($P > 0.05$).

Conclusion: The results of this study showed that the endurance training despite the increase in the UCP1 expression, did not change the expression of miR-196a and miR-133a in subcutaneous WAT, indicating that the increase of UCP1 expression occurred by the endurance training did not correspond to change of miR-196a and miR-133a expression induced by the endurance training.

Keywords: Endurance training, miR-196a, miR-133a, White adipose tissue.

*Corresponding Author: Saeed Daneshyar, Tel: 09188192118, E-mail: s.daneshyar@abru.ac.ir