اثر ورزش سه ماهه بر میزان بیان mRNA اندوتلین۱ در ریه موش سفیدآزمایشگاهی نر

ناصر احمدی اصل*[۱]، سمیه نیک نظر[۲]، صفر فرج نیا[۲]، محمدرضا علیپور[۱]

[۱] مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۲] مرکز تحقیقات کاربردی داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، [۲]

تاریخ دریافت: ۸٦/۱۱/۲۰ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۳/۱۲

Effect of three months exercise on expression of endithelin-1 mRNA in the lung tissue

Ahmadiasl N.[1]*, Niknazar S[2], Farajnia S[2], Alipour M.R[1]

[1]Tabriz Tuberculosis and Lung Disease Center, [2]Drug Applied Research Center Tabriz University of Medical Sience

Received: 2008/2/9, Accepted: 2008/6/1

Objectives: Endothelin-1 (ET-1) is a potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. In the lung, the highest levels of ET-1was secreted by endothelium, smooth muscle airway epithelium and a variety of other cells. Exercise is an important factor that affects ET-1 expression and production. This substance plays an important role in lung disease. In the present study the effects of three months exercise in the expression of ET-1 gene in lungs tissue of male rats were investigated. **Method:** 20 male Wistar rats (235 ± 27) were selected. The rats were randomly divided into two groups (n=10). Exercise rats ran on a treadmill for 60 min at a speed of 25 m/min daily for 3 months. 48 h after the last exercise the lungs were removed and were stored in -70°C. Total RNA was extracted from the lung tissue and the expression of ET-1 mRNA was assessed by RT-PCR. **Results:** the expression of ET-1 mRNA in the lung was significantly higher in the exercise rats than in the control rats (P<0.05). **Conclusion:** The results of this study showed that three months exercise increased the ET-1 expression in the lung and this effect could increase the blood flow of lung.

Key words: *Endothelin-1, Exercise, Lung.*

زمینه و اهداف: اندوتلین۱ یک تنگ کننده قوی عروق می باشد که به وسیله سلولهای اندوتلیال عروقی ترشح میشود ولی ترشح آن در ریه بیشتر به واسطه اندوتلیوم عضلات صاف و اپی تلیوم مجاری هوایی و انواع دیگری از سلولها می باشد. ورزش عامل موثر بر میزان بیان اندوتلین و ترشح آن می باشد. از آنجایی که اندوتلین۱ نقش عمده ای در بیماریهای ریوی دارد در این مطالعه تصمیم گرفته شد تاثیر ورزش سه ماهه بر میزان بیان ژن اندوتلین۱ در بافت ریه موشهای نر مورد بررسی قرار گیرد. **روش ها**: تعداد ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد ویستاربا وزن متوسط ۲۷± ۲۳۵ گرم به صورت تصادفی انتخاب کرده ،آنها را به دو گروه ۱۰تایی تقسیم نمودیم. گروه آزمایش به مدت ۳ ماه روزانه به مدت ٦۰ دقیقه و با سرعت ۳۵ متر در دقیقه دردستگاه ترید میل ورزش کردند. چهل و هشت ساعت بعد از آخرین روز ورزش، ریه ها را خارج کرده و جهت انجماد سریع در دمای ۷۰°C– قرار داده شدند. سپس نمونه ها جهت تشخیص بیان mRNA اندوتلین۱، تحت آزمایش RT-PCR قرار گرفتند. **یافته ها**: ورزش سه ماهه میزان بیان mRNA اندوتلین ۱ در ریه موشهای صحرایی گروه آزمایش را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری افزایش داد(P < ۰/۰۵). **نتیجه گیری**: نتایج بدست آمده ازاین تحقیق نشان داد که ورزش سه ماهه میزان بیان mRNA اندوتلین ۱ درریه را افزایش میدهد و میتواند از این طریق تاثیر مثبت بر جریان خون ریوی داشته باشد.

واژه های کلیدی: *اندوتلین-۱، ریه، ورزش.*

*نویسنده مسئول: دکتر ناصر احمدی اصل، دانشیار، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۳۳٦٤٦٦٤ – ۰٤۱۱، نمابر: ۳۳٦٤٦٦٤

**Corresponding Author: Dr. Naser Ahmadiasl, Associate Professor, Faculty of medicine, Tabriz University of Medical science, Tel: 0411- 3364664; Fax: 0411- 3364664; E-mail n.ahmadiasl@gmail.com*

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

اندوتلین یک، دو و سه جزء یک خانواده پپتیدی هستند که در دهه گذشته مورد توجه قرار گرفتند (۱). اندوتلین در مکانیسمهای هومئوستاتیک و بیماریهای ریوی نقش دارد (۱). اندوتلین ها یک خانواده از پپتیدهای ۲۱ اسید امینه ای هستند که سه ایزوفرم مجزادارند. اندوتلین درسال ۱۹۹۸از سلولهای اندوتلیوم کشت داده شده آئورت خوک کشف شد (۲). بعد از کشف اندوتلین۱، دو نوع اندوتلین دیگر نیز شناخته شد که اندوتلین ۲ و اندوتلین ۳ نامگذاری شدند (۳). اندوتلین۱ علاوه بر پلاسما در ریه طبیعی نیز وجود دارد و به طور عمده در اندوتلیوم عروق ریوی و سلولهای عضله صاف عروقی و اپی تلیوم مجاری هوایی ترشح می یابد. اندوتلین۲ از نظر عملکرد بیولوژیکی مشابه با اندوتلین۱ می باشد و در میوکاردیوم، کلیه و بافت جنینی یافت می شود. اندوتلین۳ علاوه بر پلاسما در سیستم عصبی مرکزی، دستگاه گوارش، ریه و کبد نیز وجود دارد اگر چه منبع سلولی ان مشخص نیست (۱).اندوتلین ۱ فراوانترین ایزوفرم بوده وبهتر شناخته شده است. دو نوع گیرنده اندوتلین انسانی تا کنون شناخته شده است: گیرنده اندوتلین نوع A (ETA) و گیرنده اندوتلین نوع B (ETB) (۱،۴،۵). فعالیت گیرنده های اندوتلینی A,B در عضلات صاف منجر به انقباض عضله صاف می شود در حالیکه فعالیت گیرنده اندوتلینی B منجر به انقباض برونش میشود. فعالیت گیرنده اندوتلین B در سلولهای اندوتلیال و از طریق افزایش دادن سطح نیتریک اکساید منجر به اتساع عروقی میشود (۶). همچنین مشخص شده است که فاکتور شل کننده مشتق از اندوتلیوم عروق که مشابه نیتریک اکساید می باشد تا حدودی در مشخص کردن توزیع مجدد گردش خون با فتی در حین ورزش دخیل می باشد (۷). ورزش یک فاکتور خارجی است که روی بیان و ترشح mRNAاندوتلین-۱ تاثیر می گذارد. ورزش منجر به توزیع مجدد جریان خون بافتی می شود. و به طور عمده میزان جریان خون در عضلات در حال فعالیت افزایش میابد ولی در گردش خون احشائی (مثل کلیه و روده) و عضلات غیرفعال کاهش می یابد (۸-۱۱)

در حین ورزش، تولید اندوتلین ۱در گردش خون عضلات غیر فعال افزایش می یابد (۱۲). در مطالعات انجام یافته که تعدادشان نیز معدود میباشد نشان داده شده که ورزش کوتاه مدت، تولید اندوتلین ۱ را در ریه به طور غیر محسوسی افزایش میدهد (۱۲) و در مطالعه دیگر به عدم تغییر میزان اندوتلین ۱ در حین ورزش در ریه ها اشاره نموده اند (۱۳). با توجه به اهمیت وجود اندوتلین ۱ در سلامتی ریه ها و با توجه به تناقضات موجود در تاثیر ورزش بر میزان اندوتلین ۱ ما تصمیم گرفتیم اثر ورزش سه ماهه را بر بیان mRNA اندوتلین ۱ در ریه موشهای صحرایی مورد بررسی قرار دهیم.

۲- مواد و روشها

در این تحقیق تعداد ۲۰ موش صحرایی نر از نژاد ویستار (۳ ماهه) با وزن متوسط ۲۳۵±۲۷ گرم به صورت تصادفی انتخاب شده و در حیوانخانه مرکز تحیقاتی کاربردی دارویی و در شرایط کنترل شده در درجه حرارت ۱ ± ۲۳ درجه سانتیگراد (با سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری گردید. سپس رتها به دو گروه ۱۰ تایی آزمایش و کنترل تقسیم شدند. گروه آزمایش به مدت ۳ ماه و به مدت ۶۰ دقیقه در هر روز با سرعت ۲۵ متر در دقیقه در دستگاه ترید میل ورزش داده شد. در این مدت رتهای گروه کنترل هیچگونه ورزشی انجام ندادند. چهل و هشت ساعت بعد از اتمام آخرین ورزش همه حیوانات را وزن نموده و بعد از بیهوشی به سرعت قفسه سینه حیوان باز شده و ریه را خارج و در ازت مایع قرار داده شدند. بافت های منجمد شده تا شروع کار استخراج RNA در فریزر ۷۰ °C- نگهداری شدند. استخراج RNA با استفاده از معرف RNX-Plus (Fermantas) طبق دستور العمل کار خانه انجام گردید سپس RNA استخراج شده با ۱ میکروگرم پرایمر Oligo dt و آنزیم رونویسی کننده معکوس (AMV reverse transcriptase) و با استفاده از کیت cDNA synthesis (Fermentas) به cDNA تبدیل شد و ۱ میکرو لیتر از cDNA برای واکنش PCR استفاده گردید. پرایمرهای طراحی شده برای ژن اندوتلین۱، شامل پرایمرهای forward، 5′-CTC TGC TGT TTG TGG CTT TC -3 و پرایمر reveres شامل 5′-TCG GAC TTC TTT GTC TGC TTG-3′ بود. پرایمرهای طراحی شده برای ژن β actin بعنوان کنترل شامل پرایمرهای 5′- CCC TAA GGC CAA CCG TGA AAA GAT G - forward 3′ و پرایمر های reveres شامل 5′- GAA CCG CTC ATT GCC GAT AGT GAT G -3 بود. PCR در دستگاه ترمال سایکلر Eppendorf انجام گردید و برنامه PCR شامل درجه حرارت ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه، ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، ۵۴ °C به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۴۵ ثانیه برای ۳۳ سیکل و ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام PCR ، از محصولات PCR حاصله در ژل آگاروز یک درصدالکتروفورز به عمل آمده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید از آنها عکسبرداری گردید (شکل ۱). عکسهای حاصله با استفاده از برنامه (Scion image, scion corporation) آنالیز گردیده و به شکل عددی محاسبه و میانگین اعداد به دست آمده در گروههای آزمایش و کنترل با هم مقایسه شدند.

Archive of SID

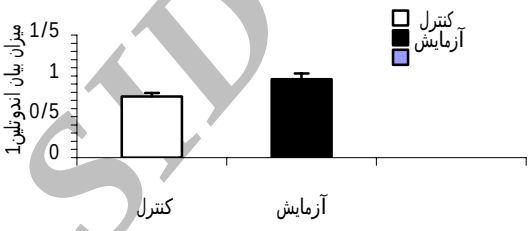
www.SID.ir

۱-۲: روش آماری

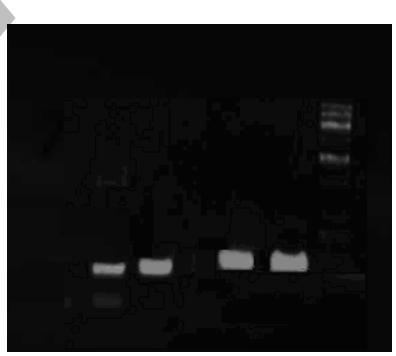
مقایسه نتایج مربوط به بیان ژن اندوتلین ۱ بین گروه کنترل و گروه آزمایش با استفاده از آزمون تی تست صورت گرفت. مقادیر بر حسب میانگین و خطای استاندارد گزارش شده است. مقادیر کمتر از۰/۰۵ معنی دار لحاظ گردید.

۳- نتایج

میزان بیان ژن اندوتلین۱ در گروه آزمایش (۰/۰۴۹±۰/۹۶) در مقایسه با گروه کنترل (۰/۰۷±۰/۷۵) بیشتر بود و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/05$) (نمودار ۱)



نمودار ۱: مقایسه بیان ژن اندوتلین ۱در ریه گروه ورزش باگروه کنترل



۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷

تصویر ۱: الکتروفورز محصولات آرتی پی سی آر میزان بیان ژن اندوتلین۱

۱- no DNA اندوتلین۱
۲- میزان بیان ژن اندوتلین ۱ در گروه کنترل
۳- میزان بیان ژن اندوتلین ۱ در گروه ورزش
٤- β-actin no DNA
٥- میزان بیان ژن β-actin در گروه کنترل
٦- میزان بیان ژن β-actin در گروه ورزش
۷- DNA size marker

٤- بحث

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشانگر اثر ورزش برافزایش میزان بیان mRNA اندوتلین ۱ در ریه بود. گزارش شده است که غلظت اندوتلین۱ در پلاسما به طور شاخصی بعد از ورزش افزایش می یابد (۱۲). همچنین میزان بیان اندوتلین۱ در بافتهای احشایی مثل کلیه و قلب در طی ورزش افزایش می یابد (۱۲و۱۳). ولی برخی مطالعات که تعداد آنها نیز بسیار کم میباشد گزارش نموده اند که تولید اندوتلین۱ در بافت ریه تغییر نکرده و یا افزایش کمی می یابد (۱۲و۱۳). نتایج این مطالعات اکثرا در تناقض با نتایج بررسی ما میباشد. علل این اختلافات میتوانند مربوط به نوع ورزش، مدت زمان ورزش و یا نمونه حیوانی و انسانی باشد. از آنجائیکه در تولید اندوتلین ۱ عوامل مختلف رئولوژیک خون و فاکتورهای نورو هومورال (مثل آنژیو تانسین ۲،آرژنین وازوپرسین)، نقش دارند و عوامل نامبرده نیز تحت تاثیر ورزش میتوانند تغیر یابند (۱٦-۱٤) انتظار این بود که در طی ورزشهای طولانی مدت اثر این عوامل بر میزان بیان اندوتلین ۱ دیده شود. از آنجائیکه بیان گیرنده های نوع B اندوتلیال نیز در طی ورزش افزایش میابد (۱۹-۱۷) بنابراین اثرات گشاد کنندگی عروقی اندوتلین در ریه همرا با افزایش گیرنده های نوع B احتمالا به افزایش جریان خون ریوی کمک می کند.

همچنین اندوتلین۱ باعث القاء گشاد شدگی عروق از طریق گیرنده اندوتلین B سلول اندوتلیال به واسطه تولید مواد گشاد کننده مشتق از اندوتلیوم مثل نیتریک اکساید (NO) میشود(۲۰) که احتمالا به واسطه خنثی نمودن فیزیولوژیک عملکرد منقبض کننده عروقی گیرنده اندوتلین A میباشد (۲۱) به طور کلی به علت زیاد بودن تعداد گیرند ه های B در ریه (۲۲) واحتمال افزایش میزان بیان آنها در ریه حین ورزش می توان گفت که اندوتلین۱ از طریق گیرند ه های B اثر گشاد کنندگی بر عروق ریوی و در نتیجه افزایش جریان خون ریوی دارد. اما اینکه افزایش اندوتلین در چنین ورزشهایی تا چه حد میتواند در پاتوژنز برخی اربیماریهای ریوی موثر باشد نیازمند مطالعات بیشتر است.

٥- نتیجه گیری

نتایج بدست آمده ازاین تحقیق نشان داد که ورزش سه ماهه میزان بیان ژن اندوتلین ۱ درریه را افزایش میدهد و این تغییرات می تواند اثرات مثبت بر جریان خون ریوی داشته باشد.

٦- تشکر و قدر دانی

مطالعه حاضر بخشی از نتایج حاصل از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز سل و ریه تبریز می باشد که بدینوسیله مراتب سپاس و تشکر خود را از مرکز فوق و همچنین مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز اعلام می نماییم.

Archive of SID

www.SID.ir

7- References:

1. Karen A Fagan ., Ivan F McMurtry and David M Rodman., Role of endothelin-1 in lung diseases, Respiratory Research., 2001, 2: 90–101.
2. Yanagisawa M., kurihara H., Kimura S.,Tomobe Y., Kobayashi M., Mitsui Y.,et al. a novel potent vasoconstrictor peptide produced By vascular endothelial cells.Nature.,1998, 332:411 -415.
3. Inoue A .,Yanagisawa M., Kimu S ., Kasuya Y., Miyauchi T.,Goto K., and Masaki T. the human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes (cardiovascular control/vasoconstrictor/vascular endothelium/synthetic peptide/DNA cloning) .proc.,Nati.,AcadSci .,1989,86: 2863-2867.
4. Sakurai T., Yanagisawa M., Takuwa Y., Miyazaki H., Kimura S., Goto K.,et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide selective subtype of the endothelin receptor. Nature., 1990, 348: 732–735.
5. Arai H., Hori S., Aramori I., Ohkubo H., Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. Nature., 1990, 348: 730–732.
6. Michael JR., Markewitz BA., Endothelins and the lung, Am J Respir Crit Care Med., 1996, 154:555–581.
7. Shen, W. M., Lundborg, J., Wang, J. M., Stewart, X., Xu, M., Ochoa, et al. Role of EDRF in the regulation of regional blood flow and vascular resistance at rest and during exercise in conscious dogs, J. Appl. Physiol .,1994, 77: 165-172.
8. Armstrong R. B., Delp M. D., Goljan, E., F and Laughlin ,M. H. Distribution of blood flow in muscles of miniature swine during exercise, J. Appl. Physiol ., 1987, 62: 1285 - 1298.
9. Fixler D. E, Atkins J. M, Mitchell J. H., and Horwitz L. D. Blood flow to respiratory, cardiac, and limb muscles in dogs during graded exercise, Am. J. Physiol., 1976, 231: 1515-1519.
10. Musch T. I., Friedman D. B., Pitetti K. H.,. Haidet G, Stray-Gundersen C, J., Mitchell J. H., and Ordway G. A. Regional distribution of blood flow of dogs during graded dynamic exercise, J. Appl. Physiol .,1987, 63: 2269-2277.
11. Norton K. I. Jones M. T, and Armstrong R. B. Oxygen consumption and distribution of blood flow in rats climbing a laddermill, J. Appl. Physiol .,1990, 68: 241-247.
12. Seiji M., Takashi M., Tsutomu K., Katsutoshi G., and Mitsuo M. Exercise causes tissue-specific enhancement of endothelin-1 mRNA expression in internal organs , J Appl Physiol., 1998,85: 425-431.
13. Seiji M., Takashi M., Satoshi S., Tsutomu K., Motoyuki I., Katsutoshi G., etal. Prolonged exercise causes an increase in endothelin-1 production in the heart in rats, Am J Physiol Heart Circ Physiol., 275: 1998, 2105-2112.
14. Emori T Y., Hirata K., Ohta K., Kanno S., Eguchi T., Imai M.et al. Cellular mechanism of endothelin-1 release by angiotensin and vasopressin, Hypertension 1991,18: 165-170.
15. Rubanyi G M., Polokoff M A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. Pharmacological Reviews .,1994,46: 325-415.
16. Yoshizumi M. H., Kurihara T., Sugiyama F., Takaku M., Yanagisawa T., Masaki.et al Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1989, 161: 859-864.
17. Spier S A., Delp M D., Meininger C J., Donato AJ., Ramsey M.W., Muller-Delp J.M. Effects of ageing and exercise training on endothelium-dependent vasodilatation and structure of rat skeletal muscle arterioles, J. Physiol 2004., 556:947–958.
18. DeSouza CA., Shapiro L F., Clevenger C M., Dinenno F A., Monahan K D ., Tanaka H ., Regular aerobic exercise prevents and restores age-related declines in endothelium-dependent vasodilation in healthy men, Circulation ., 2000,102:1351–1357.
19. Kingwell BA., Sherrard B., Jennings GL., and Dart A., Four weeks of cycle training increases basal production of nitric oxide from the forearm, Am. J. Physiol, Heart Circ. Physiol .,1997, 272: 1070–1077.
20. Suzuki S., Kajikuri J., Suzuki A ., Itoh T. Effects of endothelin-1 on endothelial cells in the porcine coronary artery, Circ Res., 1991, 69: 1361–1368.
21. Nucci G. de., Thomas R., D'Orleans-Juste P., Antunes E., Walder C., Warner T.D., et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol., 1988,85:9797–9800.
22. Rahman shah. Endothelins in health and disease. EuropeanJournal of Internal Medicine, 2007, 18: 272-282.

Archive of SID

www.SID.ir