

مطالعه تغییرات میزان ناقل مونوکربوکسیلات و بیان ژن p53 با تمرین ورزشی تناوبی در کارسینوم تجربی کولون موش

چکیده

دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱ ویرایش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۸ آنلاین: ۱۳۹۷/۰۵/۱۸

زمینه و هدف: امروزه تجویز ورزش در درمان بیماری‌ها مطرح است. هدف پژوهش کنونی تعیین تأثیر هشت هفته تمرین ایستروال هوازی بر میزان پروتیین مونوکربوکسیلات ترانسپورتر ۱ (Monocarboxylate transporter 1, MCT1) و بیان ژن p53 در تومور موش‌های مبتلا به سرطان کولون بود.

روش بررسی: این پژوهش تجربی در دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله از اردیبهشت تا مهر ۱۳۹۳ انجام شد. تعداد ۲۰ سر موش نژاد BALB/c در سن سه هفتهگی با میانگین وزنی $17/6 \pm 1/4$ g انتخاب و به‌طور تصادفی به چهار گروه پنج‌تایی شامل کنترل، تمرین ورزشی، تومور و تمرین ورزشی + تومور تقسیم شدند. سرطان از طریق تزریق زیرجلدی داروی کارسینوژنیک آزوکسی‌متان با دوز (۱۰ mg/kg) هفته‌ای یکبار و به‌مدت سه هفته ایجاد گردید و تمرین ایستروال هوازی به‌مدت هشت هفته، هر هفته پنج روز روی دستگاه نوارگردان اعمال شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین مداخله موش‌ها کشته و کولون خارج شد. اندازه‌گیری میزان پروتیین MCT1 با روش ELISA و بررسی بیان نسبی mRNA ژن p53 با روش Real-time PCR انجام شد. داده‌ها در بخش توصیفی با میانگین و انحراف استاندارد و در بخش استنباطی با Kruskal-Wallis test و Mann-Whitney U test آنالیز شد.

یافته‌ها: در گروه تومور کولون نسبت به سایر گروه‌ها، افزایش معنادار در میزان پروتیین MCT1 ($P < 0/01$) و کاهش معنادار در بیان ژن p53 ($P < 0/001$) مشاهده شد. همچنین کاهش معنادار در میزان پروتیین MCT1 ($P < 0/01$) و افزایش معنادار در بیان ژن p53 ($P < 0/001$) در گروه تمرین و گروه تمرین + تومور نسبت به گروه کنترل و گروه تومور مشاهده شد. **نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که تمرین تناوبی هوازی باعث کاهش محتوای پروتیینی MCT1 و افزایش بیان ژن p53 (به‌عنوان مهارکننده تومور) در تومور موش‌های مبتلا به سرطان کولون شده است.

کلمات کلیدی: نئوپلاسم کولون، تمرینات تناوبی، مونوکربوکسیلات ترانسپورتر ۱، ژن p53.

حسین شیروانی^{*۱}

امین عیسی نژاد^۲

مصطفی رحیمی^۳

بهزاد بازگیر^۱

علی محمد علیزاده^۴

- ۱- مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی، پژوهشکده سبک زندگی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران، ایران.
- ۲- گروه تربیت بدنی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
- ۳- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه علوم انسانی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، میدان ونک، خیابان ملاصدرا، خیابان شیخ بهایی، کوچه نصری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)، مرکز تحقیقات فیزیولوژی ورزشی.
تلفن: ۰۲۱-۸۲۴۸۳۳۹۱
E-mail: shirvani.h2006@gmail.com

مقدمه

جنبه‌های مورد مطالعه در این خصوص، متابولیسم سلول‌های سرطانی است، به‌طوری‌که Warburg مشاهده کرد که در سلول‌های سرطانی در شرایطی که به‌طور کامل اکسیژن وجود دارد، روند گلیکولیز شتاب می‌گیرد و به تشکیل لاکتات بیش از حد منجر می‌شود.^۳ به‌طور کلی در سلول‌های سرطانی پنج مرحله در تشریح افزایش مصرف گلوکز و تولید لاکتات اضافی به هدف مبادله لاکتات بین یا در سلول‌ها شناسایی شده است: ۱- افزایش برداشت لاکتات ۲- افزایش بیان و فعالیت آنزیم‌های گلیکولیتیکی

سرطان کولون سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان شایع در زنان در سرتاسر جهان است.^۱ به‌طوری‌که در کشورهای توسعه‌یافته ۶۰٪ از جمعیت در معرض خطر ابتلا به این سرطان قرار دارند و مشخص شده که به‌ترتیب ۱۰٪ و ۱۱٪ از سرطان‌های تازه تشخیص داده شده در مردان و زنان، سرطان کولورکتال است.^۲ یکی از

باعث پایداری ژنومی می‌شود و سرکوب توموری را به‌طور عمده با القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، پیری و مهار رگ‌زایی انجام می‌دهد.^{۱۰} جالب اینکه ارتباط مستقیمی بین عملکرد p53 و بیان MCT1 کشف شده است، به‌طوری‌که در هر دو محیط *In vivo* و *In vitro* تحت شرایط هایپوکسی، کاهش p53 منجر به افزایش بیان MCT1 در نتیجه افزایش شار گلیکولیتیکی و افزایش مبادله لاکتات شده است. p53 به‌طور مستقیم با پروموتور ژن MCT1 ارتباط برقرار می‌کند و تثبیت mRNA MCT1 را دستخوش تغییر می‌نماید.^{۱۱} این پژوهش با هدف بررسی تاثیر تمرین ورزشی تناوبی بر میزان بیان ژن p53 و MCT1 در کارسینوم کولون ایجاد شده در موش‌های نژاد بآلب‌سی انجام پذیرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی و کاربردی در آزمایشگاه مرکز حیوانات علوم آزمایشگاهی دانشگاه بقیه‌الله و آزمایشگاه مرکز تحقیقات سرطان دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. تعداد ۲۰ سر موش نژاد BALB/c در سن سه هفتگی با میانگین وزنی $17/6 \pm 1/4$ g انتخاب و به‌طور تصادفی به چهار گروه کنترل (n=5)، تمرین ورزشی (n=5)، تومور کولون (n=5) و تمرین ورزشی + تومور کولون (n=5) تقسیم شدند. مجوز اخلاق جهت انجام پژوهش کنونی از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) دریافت گردید. سرطان کولون در این مدل حیوانی از طریق تزریق زیرجلدی داروی کارسینوژنیک آزوکسی‌متان با دوز (10 mg/kg) هفته‌ای یک‌بار و به‌مدت سه هفته به‌وجود آمد. سپس جهت ارزیابی و تایید سرطان از آزمایش هیستوپاتولوژی زیر استفاده شد. ابتدا اندام‌های حیاتی در فرمالدئید ۱۰٪ پایدار و در پارافین پاساژ داده و جاسازی شد. سپس بلوک‌های پارافین با ضخامت ۳ μm برای رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-اوتزین (H&E) جدا شدند. اسلایدها با BX51 microscope Olympus (Optical Ltd., Tokyo, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند.

درجه نابهنجاری یا ابترمالیته هیستولوژیک با استفاده از پنج پارامتر زیر به‌صورت امتیازدهی نیمه‌کمی ارزیابی شد: الف) نسبت هسته/سیتوپلاسم (۲ : ۲۵٪، ۱ : ۲۵-۵۰٪، ۰ : ۲۵٪)، ب) طبقه‌بندی اپیتلیال (هیچ‌کدام: ۰، خفیف: ۱، شدید: ۲)، ج) احتیاج هسته‌ای (هیچ‌کدام: ۰، خفیف: ۱، شدید: ۲)، د) تخلیه گابلت (خالی تا خفیف: ۰، متوسط: ۱،

۳- کاهش عملکرد میتوکندریایی ۴- افزایش تولید، تجمع و رهایش لاکتات ۵- تنظیم افزایشی ناقل‌های مونوکربوکسیلات (Monocarboxylate transporters) یک و چهار (MCT1 و MCT4).^۴

براساس نظریه بین‌سلولی لاکتات، انتقال لاکتات بین بافت‌های مختلف به‌طور عمده از طریق MCTها صورت می‌گیرد که تاکنون ۱۴ ایزوفرم مختلف از MCTها در موش و ۹ نوع در انسان شناسایی شده‌اند که توزیعی وابسته به بافت دارند.^۵ به‌دلیل بیان شدن MCTها در مکان‌های مختلف بافت‌ها و تفاوت در کینتیک آن‌ها، به MCT1 نقش برداشت‌کننده و به MCT4 نقش آزادکننده لاکتات را نسبت داده‌اند.^{۶،۷} این انتقال دهنده‌ها به‌طور عمده در غشای پلاسمایی وجود دارند، درحالی‌که وجود ذخایر سیتوپلاسمی نیز برای MCT1 گزارش شده است. افزایش در بیان MCT1 و MCT4 در سلول‌های سرطانی در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است.^۶ به‌دلیل اینکه گسترش اولیه تومور و ایجاد فنوتیپ مهاجمی تومور در محیطی فاقد عروق انجام می‌شود، در این مراحل حفظ انجام گلیکولیز بی‌هوازی در سلول امری حیاتی است که به‌وسیله MCTs حمایت می‌شود.^۷ افزایش بیان MCT1 و MCT4 در تومور دارای وظیفه‌ای دوگانه است: در وهله اول افزایش این انتقال دهنده‌ها در غشای پلاسمایی سلول‌های سرطانی سبب نقل و انتقال بیشتر لاکتات بین سلول‌های تومور می‌شود. این وظیفه با برداشت بیشتر لاکتات توسط MCT1 در غشای سلول‌های اکسیداتیو تومور و خروج بیشتر لاکتات از سلول‌های دور از عروق تومور توسط MCT4 غشایی، انجام می‌شود. وظیفه دوم این انتقال دهنده‌ها در تومور، حفظ pH درون سلولی است که در نهایت به زنده ماندن سلول‌های توموری کمک می‌نماید.^{۶،۷} بنابراین MCTs با کمک به نقل و انتقال این سوبسترا به شکل‌گیری و حفظ فنوتیپ مهاجمی سلول‌های سرطانی کمک می‌کنند. به‌همین دلیل مهار فعالیت MCTs در تومور به‌عنوان ابزاری درمانی در سرطان در حال معرفی شدن است. به‌طور نمونه در پژوهش Sonveaux و همکاران مشخص شد که خاموش کردن ژن MCT1 در سلول‌های اندوتلیال منجر به کاهش HIF-1α می‌شود و از رگ‌زایی و گسترش تومور جلوگیری می‌کند.^۸

از سوی دیگر پژوهش‌های جدید، ژن p53 را به‌عنوان معروف‌ترین ژن بازدارنده تومور معرفی می‌کنند که در بیش از ۵۰٪ سرطان‌های کولون جهش‌هایی در این ژن مشاهده می‌شود.^۹ ژن p53

مدت نهایی در اواخر تمرین در نظر گرفته شد. برای استخراج نمونه ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی موش‌ها به وسیله تزریق داخل صفاقی کتامین (Ketaset (۹۰ mg/kg) و زایلازین (Alfasan International BV, Woerden, Netherlands) 5% و زایلازین (Alfazyme 2%, Alfasan International BV, Woerden, (۱۰ mg/kg) Netherlands) بی‌هوش شدند. کولون بلافاصله استخراج و پس از وزن‌کشی در نیتروژن ۸۰- منجمد برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد. گردآوری خون از طریق جدا کردن سر حیوان و گردآوری مستقیم خون از ناحیه گردن انجام شد. برای سنجش بیان ژن ابتدا طراحی پرایمر اختصاصی ژن p53 انجام شد که برای این منظور ابتدا توالی ژن کدکننده p53 (به‌عنوان ژن هدف) و توالی GAPDH (به‌عنوان ژن مرجع) از بانک ژنی (GenBank®, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استخراج گردید. سپس با استفاده از Primer Express Software, version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) اقدام به طراحی جفت پرایمر گردید (جدول ۲).

شدید: ۲)، ه) اختلالات ساختاری (هیچ‌کدام: ۰، خفیف: ۱، شدید: ۲). حداقل پنج بخش برای رتبه‌بندی مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه توسط دو نفر ارزیاب، اسلایدها به‌طور مستقل و بدون دسترسی به فایل‌ها بازخوانی شد که توافق بین نتایج آن‌ها بیش از ۹۰٪ بود و موارد اختلاف‌نظر به‌طور مشترک توسط پاتولوژیست‌ها دوباره ارزیابی و تصمیم‌گیری از طریق اجماع انجام شد. نمره کل هر پارامتر به‌عنوان نمره غیرطبیعی هیستولوژیک در نظر گرفته شد. به‌طور تقریبی برای تمام نمونه‌های سرطان کولون امتیازی بین هشت تا ۱۰ محاسبه شد، درحالی‌که این امتیاز در نمونه‌های طبیعی صفر تا دو بود.^{۱۲} پروتکل تمرین اینتروال هوازی به‌مدت هشت هفته و پنج روز در هفته اعمال شد (جدول ۱). تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه شروع شد و در نهایت در هفته هشتم به ۳۰ متر بر ثانیه رسید. مدت هر جلسه تمرین ۳۰ دقیقه با تناوب‌هایی از فعالیت و استراحت به نسبت دو به یک بود. به‌دلیل شرایط خاص موش‌ها، اعمال مدت‌های طولانی‌تر تمرینی بیشتر از ۳۰ دقیقه امکان‌پذیر نبود و این مدت به‌عنوان

جدول ۱: پروتکل تمرین اینتروال هوازی

هفته‌های تمرین	تناوب فعالیت		تناوب استراحت فعال	
	تعداد نوبت (دو دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)	تعداد نوبت (یک دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)
اول	۱۰	۱۲-۱۰	۱۰	۷-۸
دوم	۱۰	۱۵-۱۳	۱۰	۸-۹
سوم	۱۰	۱۸-۱۵	۱۰	۹-۱۰
چهارم	۱۰	۲۱-۱۸	۱۰	۱۱-۱۰
پنجم	۱۰	۲۴-۲۱	۱۰	۱۲-۱۱
ششم	۱۰	۲۶-۲۴	۱۰	۱۲-۱۳
هفتم	۱۰	۲۸-۲۶	۱۰	۱۳-۱۴
هشتم	۱۰	۳۰-۲۸	۱۰	۱۴-۱۵

جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده جهت همسان‌سازی ژن p53 و GAPDH

پرایمر	توالی پرایمرها	NCBI
p53	F: 5'- CACCTGCACAAGCGCCTCTCC -3/ R: 5'- CTGCTGTCTCCAGACTCCTCTGTAGC -3/	NM_013843
GAPDH	F: 5'- TCAACAGCAACTCCCACTCTTCC -3/ R: 5'- ACCCTGTGTGTAGCCGTATTC -3/	NM_008084

برای تعیین غلظت و خلوص RNA مورد استفاده قرار گرفت. برای ساخت cDNA نیز اولین رشته cDNA از روی RNA استخراج شده در مرحله پیشین با استفاده از آنزیم ترانسکریپتاز معکوس Maxima reverse transcriptase از کیت ساخت cDNA، Maxima® First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, GmbH, Germany) تولید شد.

برای تجزیه و تحلیل داده‌های نتایج *qPCR* از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای بررسی بیان کمی - نسبی ژن p53 به شرح زیر استفاده شد. تمام تجزیه و تحلیل‌ها به‌طور مجزا برای چهار گروه نمونه انجام شد.

$$\text{Relative fold change in gene expression} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

$$\Delta CT = CT_{\text{target gene}} - CT_{\text{reference gene}}$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{test sample}} - \Delta CT_{\text{Control sample}}$$

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین Monocarboxylate transporter (MCT1) در بافت تومور کولون از کیت تجاری (ZellBio GmbH, Ulm, Germany) با حساسیت ۰/۱۰ ng/ml استفاده شد. تمام این کیت‌ها با روش ELISA میزان پروتئین را در بافت تومور کولون موش اندازه‌گیری می‌کنند. بخش اول روش‌های آماری مربوط به توصیف ویژگی‌های آزمودنی‌ها و داده‌های خام پژوهش بود که از طریق آمار توصیفی انجام گردید، پس از آن جهت تعیین تفاوت معناداری متغیرها بین گروه‌های مختلف پژوهش از Kruskal-Wallis test و Mann-Whitney U test در سطح $P \leq 0/05$ استفاده گردید.

یافته‌ها

در جدول ۳ شاخص‌های آماری مربوط میانگین وزن بدن موش‌ها و وزن بافت تومور در گروه‌های مختلف آورده شده است.

همان‌طور که در نمودار ۱ مشخص است نتایج Mann-Whitney U test در میزان MCT1 نشان داد که بین گروه‌های کنترل و تمرین ورزشی ($P=0/008$)، کنترل و تومور کولون ($P=0/008$)، کنترل و تمرین ورزشی + تومور کولون ($P=0/016$)، تمرین ورزشی و تومور

جهت استخراج RNA از بافت کولون توموری، کل RNA از بافت کولون موش‌ها با استفاده از روش پیشنهادی (miRCURY™ RNA Isolation Kit Biofluids, Exiqon Inc., Woburn, MA, USA) ابتدا ۳۰۰ ml از بافر لیزکننده به‌همراه ۱۰ μl مرکاپتواتانول به بافت داخل تیوب اضافه شد.

سپس بافت را در ازت مایع موجود در بوتله‌چینی له کرده و در نهایت ۳۰ mg از بافت له‌شده را به تیوب حاوی ۳۰۰ ml از بافر لیزکننده به‌همراه ۱۰ μl مرکاپتواتانول اضافه گردید. برای لیز بیشتر پنج دقیقه در دمای آزمایشگاه گذاشته شد. در مرحله بعد ۶۰۰ μl آب فاقد آنزیم DNase و RNase به تیوب اضافه شد و در ادامه ورتکس گردید. سپس ۲۰ μl آنزیم پروتئیناز K به تیوب اضافه گردید و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای 55°C نگهداری گردید. تیوب حاوی بافت لیزشده در دور ۱۴۰۰۰ g به‌مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد مایع رویی به تیوب حاوی ۴۵۰ μl الکل اتانول مطلق اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. ستون فیلتردار بر روی تیوب گردآوری قرار گرفت و در نهایت ۶۵۰ μl از لیز سلولی به‌همراه الکل مطلق به ستون فیلتردار منتقل گردید و در دور ۱۴۰۰۰ g به‌مدت یک دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع عبور کرده تخلیه شد و در نهایت ۴۵۰ μl محلول شستشوی کیت بر روی ستون منتقل شده و به‌مدت دو دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. مایع عبور کرده تخلیه و ستون به تیوب جدید منتقل شد و سپس ۵۰ μl بافر شستشو بر روی فیلتر ستون ریخته شد. ستون به‌مدت دو دقیقه در ۲۰۰ g و بعد در ۱۴۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید. RNA به‌دست‌آمده از هر نمونه تا زمان استفاده در یخچال فریزر -70°C ذخیره گردید.

برای تعیین غلظت و خلوص RNA نیز با استفاده از دستگاه Spectrophotometer (Picodrop Limited, Hinxton, UK) به تعیین غلظت و خلوص RNA به‌دست‌آمده از هر نمونه پرداخته شد. برای این منظور ۳ μl از RNA به‌دست‌آمده از هر نمونه در زمان ساخت cDNA

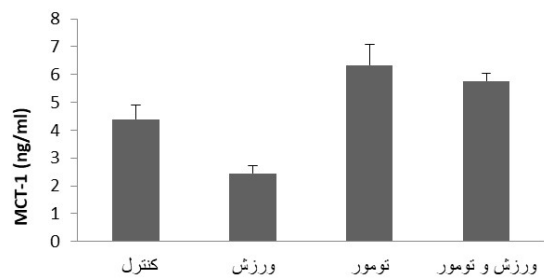
جدول ۳: میانگین و انحراف معیار وزن و وزن بافت تومور

متغیر	کنترل (n=5)	تمرین ورزشی (n=5)	تومور کولون (n=5)	تمرین ورزشی و تومور کولون (n=5)
وزن (g)	۱۷/۶±۱/۲	۱۸/۱±۰/۷۲	۱۵/۱۰±۰/۴۵	۱۶/۱۶±۰/۵
وزن بافت (mg/0.5mL)	۰/۰۳۰±۰/۰۰۴	۰/۰۴۴±۰/۰۱۵	۰/۰۹۲±۰/۰۰۵	۰/۰۵۵±۰/۰۲۴

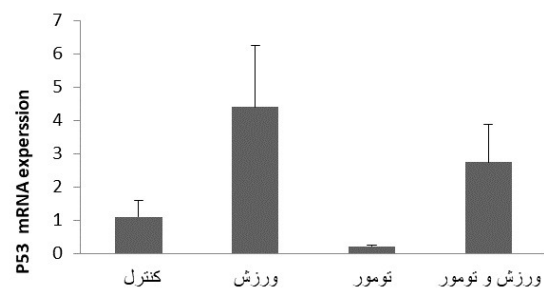
MCT1 در گروه تومور نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار و در گروه تمرین ورزشی+ کولون و گروه تمرین ورزشی نسبت به گروه تومور و گروه کنترل کاهش معنادار پیدا کرده است. به عبارتی مشخص شده که هشت هفته تمرین ایتروال هوازی میزان افزایش یافته پروتیین MCT1 در بافت تومور کولون را کاهش داده و آن را تعدیل می‌نماید. نتایج ما با یافته‌های Aveseh و همکارانشان که کاهش معناداری در وزن تومور و میزان بیان MCT1 را به دنبال تمرین طولانی مدت استقامتی در سرطان پستان در موش‌های BALB/c مشاهده کرده بودند، همخوانی دارد.^{۱۴،۱۳}

در واقع یافته‌ها نشان می‌دهد که MCTs نقش مهمی در نقل و انتقال لاکتات در شاتل درون و بین سلولی لاکتات در بافت‌های مختلف ایفا می‌کنند.^۵ به عنوان نمونه در پژوهشی که توسط Sonveaux و همکاران انجام گرفت خاموش کردن ژن MCT1 در سلول‌های اندوتلیال منجر به کاهش HIF- α گردید و از آنژیوژنز و گسترش تومور جلوگیری به عمل آمد.^۸ به این دلیل کاهش معنادار در بیان MCT1 در گروه تمرینی پژوهش کنونی می‌تواند به عنوان یک مکانیسم سلولی در تاثیر مفید تمرین در کاهش وزن تومور مشاهده شده در گروه تمرینی پژوهش کنونی ارایه شود. به احتمال، این اثر MCT1 در کاهش وزن تومور به وسیله کاهش آنژیوژنز تومور انجام می‌شود چراکه در پژوهش Sonveaux نشان داده شد که خاموش کردن MCT1 منجر به کاهش آنژیوژنز تومور گردید عملی که با کاهش در بیان VEGFR2- گیرنده عامل رشد عروقی VEGF است که اثرات آنژیوژنیک VEGF از طریق آن واسطه‌گری می‌شود- انجام می‌گردد. با کاهش آنژیوژنز تومور سلول‌های هم‌جوار عروق مجبور به استفاده بیشتر گلوکز گردیده و مقادیر کمتری از این سوستر را در اختیار سلول‌های دور از عروق قرار می‌گیرد که در نهایت می‌تواند تامین انرژی و حیات این سلول‌ها را به خطر بیندازد.

نتایج ما همچنین نشان داد که پس از هشت هفته تمرین ایتروال هوازی، بین بیان ژن p53 بافت کولون در گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت معنادار وجود دارد، بدین صورت که بیان ژن p53 در گروه تومور نسبت به گروه کنترل، کاهش معنادار و در گروه تمرین ورزشی+ کولون و گروه تمرین ورزشی نسبت به گروه تومور و کنترل، افزایش معنادار داشته است. به عبارتی مشخص شده که هشت هفته تمرین ایتروال هوازی بیان ژن p53 در بافت کولون سالم و



نمودار ۱: مقایسه تغییرات میزان MCT1 در گروه‌های مختلف



نمودار ۲: مقایسه تغییرات در بیان ژن p53 در گروه‌های مختلف

کولون ($P=0/008$) و تمرین ورزشی و تمرین ورزشی+ تومور کولون ($P=0/008$) تفاوت معناداری وجود داشت.

همان‌طور که در نمودار ۲ مشخص است نتایج Mann-Whitney U test در میزان بیان ژن p53 نشان داد که بین گروه‌های کنترل و تمرین ورزشی ($P=0/008$)، کنترل و تومور کولون ($P=0/008$)، کنترل و تمرین ورزشی+ تومور کولون ($P=0/016$)، تمرین ورزشی و تومور کولون ($P=0/008$) و تومور و تمرین ورزشی+ تومور کولون ($P=0/008$) تفاوت معناداری وجود دارد.

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که پس از هشت هفته تمرین ایتروال هوازی، بین میزان پروتیین MCT1 بافت کولون در گروه‌های مختلف پژوهش تفاوت چشمگیری وجود دارد، بدین صورت که میزان پروتیین

نشان می‌دهد که در صورت وجود، p53 می‌تواند به‌عنوان عامل سرکوب‌کننده بیان MCT1 عمل کند. به‌تازگی در یک حالت مشابه تنظیم متابولیسم در جهت زنده ماندن بیشتر، گزارش شده که پایداری mRNA آن در غیاب p53 افزایش می‌یابد.^{۱۸} در پژوهش‌های مختلف که با روش‌های متنوع ژن p53 را غیرفعال یا خاموش کرده بودند، مشاهده کردند که MCT1 در شرایط هیپوکسی به‌طور چشمگیری دچار تنظیم مثبت می‌شود.

در مجموع نتایج پژوهش کنونی نشان داد که این نوع مدل‌های تمرین تناوبی هوازی باعث کاهش بافت تومور کولون موش‌های سرطانی می‌گردد و این عمل با کاهش محتوای پروتئینی MCT1 در تومور موش‌های مبتلا به سرطان کولون همراه بوده است و نیز این مداخله تمرینی باعث افزایش بیان ژن p53 (به‌عنوان مهارکننده تومور) در بافت تومور گردیده است. این عوامل بخشی از مکانیسم‌های درگیر در متابولیسم سلول می‌باشند که تمرین تناوبی هوازی به‌وسیله آن‌ها اثرات درمانی خود را در سرطان کولون اعمال می‌کند.

سپاسگزاری: این مقاله بخشی از طرح تحقیقاتی تحت عنوان "بررسی تاثیر فعالیت تناوبی هوازی در پیشگیری و درمان سرطان کولون در مدل حیوانی: با تاکید بر بیان و سطح آنزیم‌های کلیدی متابولیکی مصوب دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج)" در سال ۱۳۹۳ به کد ۳۸-۴۰۷-۱۳۹۳ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) اجرا شده است.

توموری افزایش می‌دهد یعنی هشت هفته تمرین ایستروال هوازی می‌تواند کاهش بیان ژن p53 در بافت تومور کولون را افزایش داده و آن را تعدیل می‌نماید.

پروتئین سرکوب‌کننده تومور p53 مانع پیشرفت سرطان از طریق مکانیسم‌های مختلف، از جمله القای آپوپتوز و توقف چرخه سلولی برای حفظ ثبات ژنوم می‌شود. به‌تازگی ارتباط بین p53 و متابولیسم تومور نیز مورد بررسی قرار گرفته است.^{۱۹} به‌طور ویژه، مشخص شده که p53 تعادل متابولیکی بین گلیکولیز و فسفوریلاسیون اکسیداتیو (OXPHOS) از طریق ژن‌های القاکننده p53 به‌نام TIGAR و SCO2 را تنظیم می‌کند.^{۱۶،۱۷} درحالی‌که بیان TIGAR مهار گلیکولیز را افزایش می‌دهد، بیان SCO2 باعث افزایش مصرف اکسیژن میتوکندری می‌شود. در نتیجه، از دست دادن p53، گلیکولیز را تحریک می‌کند و تنفس میتوکندریایی را دچار اختلال می‌کند، در نتیجه باعث افزایش تولید ATP از OXPHOS به گلیکولیز می‌شود. همچنین نشان داده شده است که کمبود p53 بیان MCT1 را تحت شرایط هیپوکسی افزایش می‌دهد و بنابراین رهاش لاکتات را از طریق افزایش شار گلیکولیتیکی تسهیل می‌کند. برعکس، هنگامی که p53 فعال است، تصویر آینه با سرکوب بیان MCT1 مشاهده می‌شود و تسهیلات کمتری برای تغییر متابولیسم اکسیداتیو به مسیر گلیکولیتیک فراهم می‌شود. به‌طور مکانیکی مشخص شده که فقدان p53 با تثبیت پروتئین MCT1 mRNA در پاسخ به هیپوکسی همراه بوده و این

References

1. Van Vulpen JK, Velthuis MJ, Steins Bisschop CN, Travier N, Van Den Buijs BJ, Backx FJ, et al. Effects of an exercise program in colon cancer patients undergoing chemotherapy. *Med Sci Sports Exerc* 2016;48(5):767-75.
2. Ghafari M, Mohammadian M, Valipour AA, Mohammadian-Hafshejani A. Physical activity and colorectal cancer. *Iran J Public Health* 2016;45(12):1673-4.
3. San-Millán I, Brooks GA. Reexamining cancer metabolism: lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis* 2017;38(2):119-33.
4. Seyfried TN, Flores RE, Poff AM, D'Agostino DP. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. *Carcinogenesis* 2014;35(3):515-27.
5. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 1999;343(Pt 2):281-99.
6. Hao JL, Cozzi PJ, Khatri A, Power CA, Li Y. CD147/EMMPRIN and CD44 are potential therapeutic targets for metastatic prostate cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2010;10(3):287-306.
7. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Azevedo-Silva J, Casal M, Schmitt FC, Baltazar F. Role of monocarboxylate transporters in human cancers: state of the art. *J Bioenerg Biomembr* 2012;44(1):127-39.
8. Sonveaux P, Copetti T, De Saedeleer CJ, Végran F, Verrax J, Kennedy KM, et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One* 2012;7(3):e33418.
9. Markowitz SD, Bertagnolli MM. Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;361(25):2449-60.
10. Li XL, Zhou J, Chen ZR, Chng WJ. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol* 2015;21(1):84-93.
11. Boidot R, Végran F, Meulle A, Le Breton A, Dessy C, Sonveaux P, et al. Regulation of monocarboxylate transporter MCT1 expression by p53 mediates inward and outward lactate fluxes in tumors. *Cancer Res* 2012;72(4):939-48.

12. Alizadeh AM, Khaniki M, Azizian S, Mohaghheghi MA, Sadeghi-zadeh M, Najafi F. Chemoprevention of azoxymethane-initiated colon cancer in rat by using a novel polymeric nanocarrier-curcumin. *Eur J Pharmacol* 2012;689(1-3):226-32.
13. Aveseh M, Nikooie R, Aminaie M. Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. *J Physiol* 2015;593(12):2635-48.
14. Aveseh M, Nikooie R, Aminaie M. Lactate transporters expression in tumor of Balb/c mice bearing breast cancer after endurance training. *Armaghane Danesh* 2014;19(7):602-13.
15. Alizadeh AM, Heydari Z, Rahimi M, Bazgir B, Shirvani H, Alipour S, et al. Oxytocin mediates the beneficial effects of the exercise training on breast cancer. *Exp Physiol* 2018;103(2):222-235.
16. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, et al. TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell* 2006;126(1):107-20.
17. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, et al. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 2006;312(5780):1650-3.
18. Donahue JM, Chang ET, Xiao L, Wang PY, Rao JN, Turner DJ, et al. The RNA-binding protein HuR stabilizes survivin mRNA in human oesophageal epithelial cells. *Biochem J* 2011;437(1):89-96.

Changes in monocarboxylate transporter 1 and p53 gene expression by aerobic interval training in the experimental colon carcinoma of mouse

Abstract

Received: 31 Jan. 2018 Revised: 07 Feb. 2018 Accepted: 30 Jul. 2018 Available online: 09 Aug. 2018

Hossein Shirvani Ph.D.^{1*}
Amin Isanejad Ph.D.²
Mostafa Rahimi Ph.D.³
Behzad Bazgir Ph.D.¹
Ali Mohammad Alizadeh Ph.D.⁴

1- Exercise Physiology Research Center, Life Style Institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Department of Physical Education, Shahed University, Tehran, Iran.

3- Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

4- Cancer Research Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran.

* Corresponding author: Exercise Physiology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Nosrati alley, Sheikh Bahaei St., Mollasadra St., Vanak Sq., Tehran, Iran.
Tel: +98 21 82482391
E-mail: shirvani.h2006@gmail.com

Background: Recent evidence suggests that regular exercise training is effective in treating various aspects of cancer. Therefore, the purpose of this study was to determine the effect of 8 weeks of aerobic interval training on monocarboxylate transporter 1 (MCT1) protein and expression of p53 gene in tumor of colon cancer mice.

Methods: The present study was conducted experimentally from May to October 2014 at the Exercise Physiology Research Center of Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Twenty BALB/c mice of age 3 weekly with a mean weight of 17.6 ± 1.4 grams were selected and randomly divided into 4 groups: control (N=5), interval training (N=5), colon tumor (N=5) and interval training+colon tumor (N=5). The cancer was induced by subcutaneous injection of a carcinogenic azoxymethane (10 mg/kg) once a week for three weeks, and aerobic exercise was performed with rodent treadmill for 8 weeks and 5 days a week. Forty-eight hours after the last training session, the mice were cleared and colon removed. Measurement of MCT1 protein was performed by ELISA and commercial kits (ZellBio, Germany). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the relative expression of p53 gene. Data were analyzed by Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U tests.

Results: The results showed a significant increase in MCT1 protein ($P < 0.01$) and significant reductions in p53 gene expression ($P < 0.001$) in a colon tumor group compared to other groups. Also, there was a significant decrease in the level of MCT1 protein ($P < 0.01$) and significant increase in p53 gene expression ($P < 0.001$) in the exercise training group and exercise training+colon tumor group compared to control group and the tumor group was observed.

Conclusion: The findings of the study showed that aerobic interval training reduced the protein content of MCT1 and increased the expression of p53 gene (as a tumor inhibitor) in the tumor of colon cancer mice. These factors are portions of the mechanisms involved in cancer cell metabolism by which aerobic interval training shows part of its therapeutic effect in colon cancer.

Keywords: colonic neoplasms, interval training, monocarboxylate transport protein 1, p53 gene.