

مقایسه اثرات تمرینات استقامتی و مقاومتی بر بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضله نعلی رت نژاد ویستار

چکیده

دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۵ ویرایش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۸/۱۱/۳۰

مجید قلی‌پور^{۱*}

مستانه سیف‌آبادی^۲

محمدرضا اسد^۳

۱- گروه تربیت بدنی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران.

۲- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، فیزیولوژی ورزشی کاربردی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز، ایران.

۳- گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه پیام نور کرج، البرز، ایران.

زمینه و هدف: توده عضله اسکلتی عامل مهمی برای حرکت جهت رفع نیازهای روزمره به‌ویژه در شرایط پاتولوژیک و کهولت است. هدف پژوهش کنونی، مقایسه تغییرات بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضله ناشی از انجام دو پروتکل تمرین ورزشی بود.

روش بررسی: رت‌های هشت هفته‌ای به‌طور تصادفی به دو گروه تمرینی مقاومتی و استقامتی و یک گروه کنترل تقسیم شدند و از مرداد تا مهر ۱۳۹۷ به‌مدت هشت هفته، پنج جلسه در هفته، در محل آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تهران روی نوارگردان دویند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، عضله نعلی جدا و جهت تجزیه و تحلیل با روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز- رونوشت معکوس (RT-PCR) و وسترن بلات، در دمای ۸۰- نگهداری شد.

یافته‌ها: نسبت به گروه کنترل، بیان ژن mTORC1 تنها در گروه مقاومتی به‌طور معناداری افزایش یافت ($P=0/022$)، در حالی که هر دو پروتکل تمرینی استقامتی و مقاومتی باعث افزایش معنادار Rps6kb1 شدند (به‌ترتیب $P<0/001$ و $P=0/001$). در مسیر تجزیه پروتئین، اگرچه بیان ژن FOXO3a تغییر معناداری نداشت ($P=0/463$)، بیان ژن eIF4Ebp1 توسط هر دو پروتکل تمرینی استقامتی و مقاومتی مهار شد (به‌ترتیب $P<0/001$ و $P=0/001$). این نتایج، توسط تجزیه و تحلیل وسترن بلات تأیید شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد پروتکل‌های ورزشی پژوهش کنونی اثرات کمابیش یکسانی بر تغییرات بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای سنتز و تجزیه پروتئین عضله اسکلتی دارند. بنابراین، می‌تواند جهت جلوگیری و یا کاهش آتروفی عضلانی در شرایط پاتولوژیک و سالمندی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: تمرینات ورزشی، بیان ژن، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، بیوستز پروتئین، رت‌ها، عضله نعلی.

* نویسنده مسئول: تهران، خیابان آزادی، دانشگاه صنعتی شریف، گروه تربیت بدنی.

تلفن: ۰۲۱-۶۶۱۶۵۱۵۲

E-mail: gholipour@sharif.edu

مقدمه

سنتز و تجزیه پروتئین تعیین می‌شود. تغییر در توده‌ی عضله، منعکس‌کننده‌ی عدم تعادل بین سنتز و تجزیه‌ی پروتئین است که به نوع و میزان فعالیت جسمانی بستگی دارد.^۱ مکانیزم‌های مولکولی اصلی حفظ عضلات اسکلتی مستلزم درگیری بین چند مسیر سیگنالینگ است. در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، شبکه‌ای از سیگنال‌های مرتبط، پیام‌های مربوط به آتروفی و هایپرتروفی را هماهنگ و کنترل کرده و تعادل ظریفی بین سنتز و تجزیه پروتئین را برقرار می‌کند. از دست دادن توده عضلات اسکلتی، تحت عنوان آتروفی، از جمله

عضله اسکلتی یک بافت سازگارپذیر است که به نیازهای محیطی و فیزیولوژیکی مانند رشد، حفظ قامت، عملکرد ورزشکاران و غیره پاسخ می‌دهد. افزون‌براین پاسخ‌های فیزیولوژیکی مثبت، اختلال در توده و عملکرد عضلانی در اثر کهولت، بیماری و همچنین بی‌حرکی را کاهش می‌دهد که به‌طور عمده توسط کنترل ژنتیک و مسیرهای سیگنالینگ تنظیم می‌شود.^۱ میزان کلی پروتئین عضلات اسکلتی به‌وسیله تعادل بین

فاکتورهای رشد فعال نباشد، 4E-BP1 فسفریله نشده و می‌تواند با اتصال به eIF4E و تشکیل مجموعه eIF4Ebp1، آغاز ترجمه را مهار کند.^{۱۳} از طرف دیگر mTORC2 از جمله عواملی است که با فسفریله کردن خانواده FOXO و مهار آن‌ها، از تجزیه پروتئین جلوگیری می‌کند. در واقع، عوامل رونویسی FOXO باعث بیان دو لیگاز یوبیکوئیتین E3، یعنی Atrogin1 (با نام دیگر MAFBx) و MuRF1 می‌شوند که این دو عامل به نوبه خود از طریق یوبیکوئیتیناسیون و پروتازوم، تجزیه پروتئین‌های سارکومری را باعث می‌شوند.^{۱۴} جلوگیری از عملکرد mTORC1 در موش‌های سوری به وسیله رابامایسین، هایپرتروفی فیزیولوژیک را کاهش می‌دهد.^{۱۵} جایی که عامل رونویسی FOXO3 که نقش مهمی را در آتروفی عضله بازی می‌کند، جهت القای آتوفاژی در عضلات اسکلتی ضروری است.^{۱۷} هدف از انجام پژوهش کنونی، بررسی تفاوت بین اثرات انجام تمرین استقامتی و مقاومتی در میزان بیان ژن‌های مرتبط با مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضلات اسکلتی رت شامل mTORC1، Rps6kb1، FOXO3a و eIF4Ebp1 بود.

روش بررسی

جهت انجام پژوهش کنونی که از مرداد تا مهر ۱۳۹۷ در محل آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تهران انجام شد، تعداد ۲۴ سر رت سالم هشت هفته‌ای نژاد ویستار با وزن $13/79 \pm 219/80$ g خریداری و به‌طور تصادفی به سه گروه هشت‌تایی مقاومتی (وزن $12/53 \pm 222/17$ g)، استقامتی (وزن $11/02 \pm 215/38$ g) و کنترل (وزن $13/79 \pm 219/86$ g) تقسیم و براساس کد اخلاقی شماره IR.PNU.REC.1397.035 و ضمن رعایت پروتکل رفتار با حیوانات براساس اصول بیانیه هلسینکی، در گروه‌های چهارتایی درون قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات، در دمای ۲۲ تا ۲۴ °C و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از سه روز سازگاری با محیط، مرحله آشناسازی با پروتکل‌های تمرینی استقامتی و مقاومتی طی دو هفته و هر هفته پنج جلسه انجام شد. برای آشناسازی با تمرینات استقامتی (دویدن روی تردمیل ویژه حیوانات)، از سرعت‌های کم، حدود ۸ تا ۹ m در دقیقه، استفاده شد و زمان تمرین به تدریج از ۱۰ دقیقه شروع و در پایان دو هفته به ۲۰ دقیقه رسید. در پایان دوره

شاخص‌های تشخیصی کالجکسیا است که در بروز سرطان، بیماری قلبی، بیماری مزمن انسداد ریوی، بیماری کلیوی و سوختگی‌ها مشاهده می‌شود که در این صورت احتمال مرگ‌ومیر افزایش می‌یابد. مطالعات اخیر، مسیرهایی که منجر به افزایش و کاهش عضلات اسکلتی و همچنین فرآیندهای سیگنالینگ که از طریق تمایز و بازسازی پس از آسیب‌دیدگی باعث حفظ توده عضلانی اسکلتی می‌شوند را بهتر تعریف کرده‌اند.^۳

mTOR تجزیه پروتئین را سرکوب می‌کند و این در حالی است که خود به‌طور مستقیم با سطح اسیدهای آمینه داخل سلولی و به‌طور غیرمستقیم توسط عوامل رشدی از طریق Akt/PKB و وضعیت انرژی سلول از طریق AMPK کنترل می‌شود.^۴ کیناز mTOR تحت دو ترکیب مستقل از هم وجود دارد: ترکیب‌های mTORC1 و mTORC2. رپتور و ریکتور عوامل تنظیم‌کننده و اجزای عملکردی پروتئین‌های TORC1 و TORC2 هستند. از این دو ترکیب، mTORC1 تا حدود زیادی نسبت به mTORC2 مشخصه بهتری است. فعال شدن mTORC1 به افزایش سنتز پروتئین و کاهش تجزیه آن منجر شده و باعث رشد سلول می‌شود. 4E-BP1 و Rp70S6k1 (نام‌های دیگر S6K1 یا Rps6kb1) از جمله اهداف پایین دستی mTORC1 هستند که با فسفریله‌شدن توسط mTORC1 ترجمه پروتئین کنترل می‌شود.^{۵-۷} به عبارت دیگر، بیوسنتز پروتئین به‌صورت هماهنگ و طی مراحل متعددی، تحت تنظیم محورهای mTORC1-S6K1 و mTORC1-4E-BP1 قرار دارد.^۸ mTORC1 با فسفریله کردن Rp70S6k1 در موقعیت ترئونین ۳۸۹ موجب افزایش آغاز ترجمه از طریق S6K1^۹ و طولیل‌سازی پروتئین از طریق eEF2 می‌شود.^{۱۱} محور mTORC1-4E-BP1 از طریق مجموعه eIF4F (eIF4E، eIF4G، eIF4A)، مراحل به‌طور کامل مشخص و حساسی را در شروع فرآیند ترجمه کنترل می‌کند.^{۱۱} mTORC1 با فسفریله کردن 4E-BP1 (نام دیگر eIF4Ebp1) آن را مهار می‌کند که در نتیجه eIF4E جدا شده و می‌تواند ضمن تعامل با eIF4G، آغاز سنتز پروتئین را سبب شود.^{۱۲} در واقع، mTORC1 باعث فسفریله شدن S6K1 در موقعیت ترئونین ۳۸۹ و 4E-BP1 در چندین موقعیت مانند ترئونین ۳۷، ترئونین ۴۶، ترئونین ۷۰ و سرین ۶۵ می‌شود که این فسفریلاسیون باعث جدا شدن 4E-BP1 از eIF4E و همچنین S6K1 از eIF3 شده که در نتیجه آن، ترجمه و سنتز پروتئین آغاز می‌شود.^۸ این در حالی است که چنانچه mTORC1 در غیاب محرک‌هایی مانند

تهیه بافت و انجام آزمایشات و عملیات آماری، ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، خون هر رت پس از بی‌هوشی به‌طور مستقیم از قلب خارج شد. پس از اطمینان از استخراج کامل خون و معدوم شدن حیوان، بافت عضله نعلی اندام عقبی حیوان پس از جداسازی و شستشو در سرم فیزیولوژیک، در دمای °C ۸۰- نگهداری شد. از روش RT-PCR جهت تعیین تغییرات بیان ژن‌های FOXO3a, Rps6kb1, mTORC1 و eIF4Ebp1 و از روش وسترن بلائینگ به‌منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین‌های Rps6kb1 و eIF4Ebp1 به‌ترتیب به‌عنوان آخرین عامل مسیرهای سنتز و تجزیه پروتئین در پژوهش کنونی، استفاده شد.

استخراج RNA با استفاده از ۵۰ mg عضله نعلی و ۱ ml کیزول (Qiazole) براساس پروتکل شرکت سازنده (Qiagen, Germany) انجام گرفت. پس از ۲۴ ساعت پلاک موجود در میکروتیوب در حالت نیمه انجماد توسط سرسمپلر خرد و کمی پیتاژ گردید. سپس به نمونه حدود ۱۰۰ لاندا کلروفرم اضافه شد تا سلول‌ها لیز شوند. این محلول حدود یک دقیقه با سلول‌ها در تماس بود. پس از یک دقیقه، محلول با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ، مایع شفاف حاوی RNA به‌همراه ۱ ml ایزوپروپانول درون یک میکروتیوب دی‌اتیل‌پیل‌کربنات (DEPC) به مدت یک دقیقه مخلوط شد و به مدت یک شب در دمای °C ۸۰- قرار گرفت. سپس نمونه‌ها با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از تخلیه مایع رویی، ۱ ml الکل ۷۰ اضافه گردید. پس از انجام Vortex، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی در داخل میکروتیوب با سمپلر تخلیه و پلاک خشک شد. به‌منظور حل کردن RNA، ۲۰ لاندا آب مقطر ۶۰ درجه بر روی پلاک داخل میکروتیوب ریخته و پس از پیتاژ با سرسمپلر، به مدت پنج دقیقه بر روی صفحه‌ی ۶۰ درجه قرار داده شد. خلوص و غلظت RNA به‌روش اسپکتروفوتومتری توسط NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Rockford, USA) تعیین شد. غلظت (Optical density, RNA OD) به‌دست‌آمده برابر با ۱/۹۲ بود که نشان از خلوص RNA و عدم ترکیب با DNA و پروتئین داشت.

هر واکنش Polymerase chain reaction (PCR) با استفاده از ABI StepOne (Applied) master mix و SYBER Green در دستگاه Biosystems, Forster City, CA, USA) براساس پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-time PCR در نظر گرفته

آشناسازی و کسب آمادگی اولیه، این گروه مورد آزمون تخمین حداکثر اکسیژن مصرفی قرار گرفت^{۱۸} و تا پایان دوره تمرین، این آزمون هر دو هفته یک‌بار انجام شد. پروتکل اصلی تمرینات استقامتی شامل هشت هفته تمرین (پنج روز در هفته) بود که با ۳۰ دقیقه دویدن در هفته اول شروع و به ۵۰ دقیقه در هفته سوم رسید که تا آخر هفته هشتم این مدت زمان در نظر گرفته شد. شدت این تمرینات به‌طور متوسط ۶۵ تا ۷۰٪ بیشینه‌ی اکسیژن مصرفی (براساس آخرین سنجش) در نظر گرفته شد. مدت زمان گرم کردن و سرد کردن پنج دقیقه بود که با شدت ۵۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی در ابتدا و انتهای هر جلسه تمرین انجام می‌شد.^{۱۹}

دو هفته آشناسازی با تمرینات مقاومتی روی نردبانی به‌طول ۱ m و نرده‌های ۲ cm (بدون وزنه) با شیب ۸۵ درجه، طوری انجام شد که رت‌ها برای بالا رفتن از نردبان، بدون وزنه، در پایین آن قرار داده می‌شدند. پس از دو هفته آشناسازی، تمرینات اصلی شامل پنج جلسه در هفته، هر جلسه سه ست و هر ست با پنج تکرار بود که به مدت هشت هفته انجام شد. زمان استراحت بین تکرارها یک دقیقه و بین ست‌ها دو دقیقه بود. میزان وزنه ۳۰٪ وزن هر رت در اولین هفته از دوره تمرینی در نظر گرفته شد که با ۱۰٪ افزایش در هر هفته، میزان وزنه در هفته آخر ۱۰۰ تا ۱۱۰٪ از وزن هر رت بود (وزن رت‌ها در انتهای دوره ۳۰۷/۶۷±۳۵/۶۰ g). شرط لازم برای افزایش میزان وزنه در هر هفته، موفقیت در انجام کامل دوره تمرینی در هفته پیش بود. در صورت عدم موفقیت در بالا رفتن از نردبان با وزنه جدید، میزان وزنه ۱۰٪ کاهش می‌یافت (با مقدار وزنه پیشین انجام می‌شد). جهت تعیین میزان وزنه، وزن هر رت، هر هفته اندازه‌گیری شد. برای اتصال وزنه‌ها به دم حیوان در قسمت نزدیک به تنه، از چسب نواری استفاده شد. برای ترغیب به بالا رفتن از نردبان، دم حیوان لمس می‌شد و معیار برای عدم موفقیت در انجام تمرین و توقف آن، مقاومت در برابر بالا رفتن از نردبان پس از سه بار اقدام و ترغیب بود. پس از رسیدن با بالای نردبان، محلی برای استراحت حیوان در مدت زمان مشخص در نظر گرفته شده بود.^{۲۰} گروه کنترل بدون تمرین، دوره هشت هفته‌ای پژوهش را تحت شرایط یکسان سپری کردند.

به‌دلیل مرگومیر و یا عدم انجام کامل تمرینات و کنار گذاشته شدن از گروه، تعداد نهایی رت‌ها در هر گروه عبارت بود از گروه مقاومتی (شش سر)، گروه استقامتی (هشت سر) و گروه کنترل (هفت سر). به‌منظور جهت

جدول ۱: توالی پرایمر ژنهای مورد استفاده در پژوهش، براساس داده‌های بانک ژن

نام ژن	پرایمر پیش رو	پرایمر پس رو	شناسه ژن
mTOR	5'-TGATTTGGGAGAACAGAAGATGA-3'	5'-GAGGTAACAGGATGGTGGAGTG-3'	۵۶۷۱۸
Rps6kb1	5'-GTGTTGTGGATTGGTGGAGT-3'	5'-TTGTTGTGTGAGGTAGGGAGG-3'	۸۳۸۴۰
FOXO3a	5'-GCCTCATCTCAAAGCTGGGT-3'	5'-TGCTCTGGAGTAGGGATGCT-3'	۲۹۴۵۱۵
efF4Ebp1	5'-GGACACAGTGATGCTTCT-3'	5'-GGAGGTATGTGCTGGTAT-3'	۱۱۶۶۳۶
Gapdh	5'-AAGTCAACGGCACAGTCAAGG-3'	5'-CATACTCAGCACCAGCATCACC-3'	۱۰۸۳۵۱۱۳۷

مونوکلونال اولیه انکوبه شد. سپس آنتی‌بادی ثانویه HRP-Rabbit بر ضد آنتی‌بادی اولیه (با رقت ۱:۱۰۰۰ در PBS-T) به مدت یک‌ونیم ساعت با دستگاه لرزاننده (Shaker) انکوبه شد و دوباره عمل شستشو انجام گرفت. در نهایت با افزودن سوبسترای DAB به کاغذ PVDF، حضور در نمونه‌ها بررسی شد. در کنار نمونه‌ها یک نمونه دیگر از لیفات، به‌عنوان کنترل منفی با همان غلظت، الکتروفورز شد. شرایط وسترن‌بلات برای کنترل منفی مشابه سایر نمونه‌ها بود با این تفاوت که این نمونه در مجاورت آنتی‌بادی اولیه قرار نگرفت. نتایج حاصل از روند RT-PCR مربوط به تکثیر ژن‌ها، در فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ قرار داده شد و مقادیر نسبی بیان هر ژن برای انجام عملیات آماری مورد استفاده قرار گرفت. برای گزارش آمار توصیفی از میانگین و انحراف معیار و در صورت لزوم از خطای معیار استفاده شد. طبیعی بودن توزیع داده‌ها با استفاده از Shapiro-Wilk test و همگنی واریانس با Levene's Test سنجیده شد. به‌منظور تعیین تفاوت بین گروهی مربوطه به متغیرهایی که توزیع طبیعی نداشتند از آزمون ناپارامتریک Kruskal-Wallis و از Mann-Whitney U test به‌عنوان آزمون تعقیبی و برای متغیرهای با توزیع طبیعی از One-way analysis of variance (ANOVA) و همچنین از Tukey's test به‌عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد. تمامی عملیات آماری با SPSS software, version 24 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) انجام شد. معناداری نتایج آزمون‌ها در سطح $\alpha < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج مربوط به میزان پروتئین‌های Rps6kb1 (مسیر سنتز پروتئین)،

شد و دماهای هر سیکل شامل 94°C برای 20 ثانیه، $58-60^{\circ}\text{C}$ برای 30 ثانیه و 72°C برای 30 ثانیه تنظیم شدند. نمودار Melting جهت بررسی درستی واکنش‌های PCR انجام شده و به‌صورت اختصاصی برای هر ژن و در هر بار از واکنش به‌همراه نمودار کنترل منفی جهت بررسی وجود آلودگی در هر واکنش مورد ارزیابی قرار گرفت. نسبت بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه، با روش مقایسه‌ای چرخه آستانه (Threshold cycle, CT) مورد ارزیابی قرار گرفتند. منحنی استاندارد اختصاصی هر ژن با استفاده از حداقل پنج غلظت لگاریتمی به‌ترتیب رقیق‌شونده از کنترل مثبت هر ژن رسم گردید. میزان بیان ژن هدف با ژن Gapdh به‌عنوان ژن مرجع، نرمالیز شده و بیان ژن‌های گروه سالم به‌عنوان کالیبراتور در نظر گرفته شد. توالی ژن‌های استفاده‌شده در پژوهش کنونی و شناسه ژن‌ها براساس بانک ژن در جدول ۱ ارایه شده است.

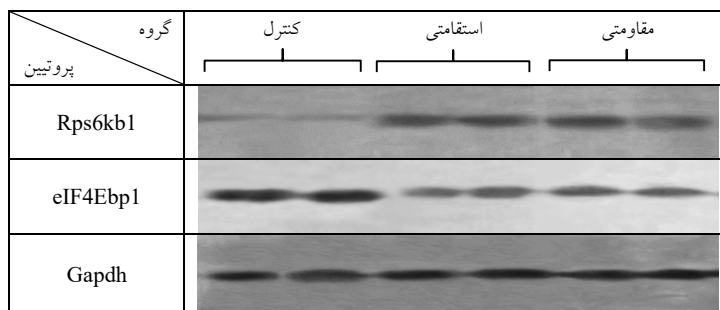
در ارتباط با وسترن بلائینگ، بافت عضله نعلی جداشده از هر رت، پس از شستشو دادن با بافر PBS سرد، در یک میکروتیوب به‌همراه 1 ml بافر لیزکننده سلولی (Abcam, Cambridge, UK) با دستگاه یکنواخت ساز (Radioimmunoprecipitation assay) RIPA و 1% مهارکننده پروتئازها (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) خرد و یکنواخت شد. سپس برای لیز شدن کامل، به‌مدت دو ساعت روی ظرف یخ قرار گرفت. پس از سانتریفوژ شدن با دور 13000 دور در دقیقه به‌مدت 15 دقیقه، محلول شناور رویی (Supernatant) گردآوری شد و غلظت پروتئین‌های موجود در آن با استفاده از BCA protein assay kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) تعیین شد. لیفات هر یک از بافت‌ها به‌میزان $60\ \mu\text{g}$ روی ژل پلی‌آکریل آمید 10% در شرایط احیاشده الکتروفورز شد. سپس پروتئین‌های الکتروفورز شده به کاغذ PVDF (Polyvinylidene Fluoride) منتقل شد و با آنتی‌بادی‌های

ادامه، آزمون Tukey مشخص کرد که در میزان بیان پروتیین Rps6kb1 (شکل ۲، C)، بین دو گروه تمرینی مقاومتی و استقامتی با گروه کنترل تفاوت معنادار است (به ترتیب $P < 0.001$ و $P = 0.011$) در حالی که بین دو گروه تمرینی تفاوت معناداری وجود نداشت ($P = 0.931$). نتایج بیان پروتیین Rps6kb1 حاصل از تجزیه و تحلیل وسترن بلات، به گونه‌ای مؤید تغییرات بیان این ژن حاصل از روند RT-PCR است.

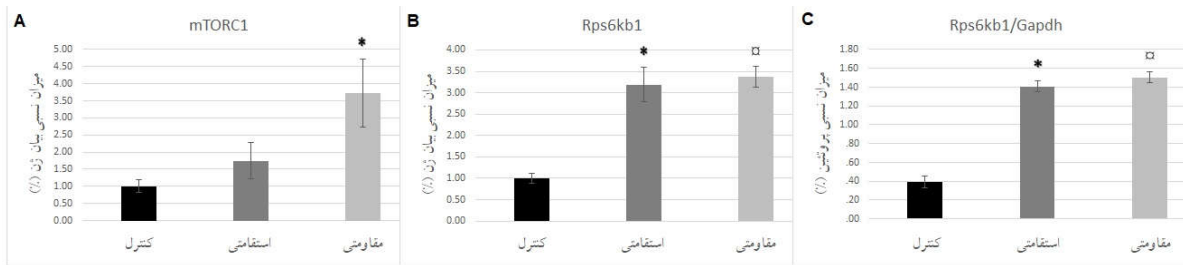
همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، براساس نتایج آزمون Kruskal-Wallis میزان بیان ژن FOXO3a نسبت به ژن مرجع، یکی از عوامل درگیر در روند سیگنالینگ مرتبط با تجزیه پروتیین، در اثر انجام هر دو پروتکل تمرینی تغییر معناداری نداشت ($P = 0.463$). مقادیر به دست آمده از روند RT-PCR نشان داد که بیان ژن FOXO3a در گروه استقامتی و مقاومتی (به ترتیب 0.81 ± 0.22 و 0.83 ± 0.17) نسبت به گروه کنترل (1.00 ± 0.16) به صورت غیر معناداری کاهش یافته است. همچنین تفاوت بین گروهی در تغییرات بیان ژن eIF4Ebp1 معنادار بود ($P = 0.001$). به عبارتی، انجام هر دو پروتکل ورزشی استقامتی ($P < 0.001$) و مقاومتی ($P = 0.001$) به طور معناداری باعث سرکوب بیان این ژن نسبت به گروه کنترل شد. در ضمن، اگرچه تفاوت بین گروه‌های تمرینی در بیان ژن eIF4Ebp1 معنادار نبود ($P = 0.059$) ولی میزان کاهش آن در گروه استقامتی چشمگیر بود. از آنجاکه بیان eIF4Ebp1 از جمله عوامل درگیر در مسیر تجزیه پروتیین شناخته شده است، در پژوهش کنونی این ژن جهت نشان دادن عامل انتهایی در نظر گرفته شد که در همین ارتباط به منظور بررسی بیشتر و تایید نتایج مربوط به بیان این ژن حاصل از روند RT-PCR، اقدام به سنجش پروتیین مربوطه، با استفاده از تجزیه و تحلیل وسترن بلات شد (شکل ۱).

eIF4Ebp1 (مسیر تجزیه پروتیین) و Gapdh (ژن رفرنس)، حاصل از تجزیه و تحلیل وسترن بلات، در شکل ۱ ارایه شده است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود، در مقایسه با گروه کنترل، اگرچه هر دو پروتکل تمرینی مؤثر بوده‌اند، ولی گروه مقاومتی در افزایش بیان پروتیین Rps6kb1 و گروه استقامتی در سرکوب بیان پروتیین eIF4Ebp1 نقش مؤثرتری داشتند.

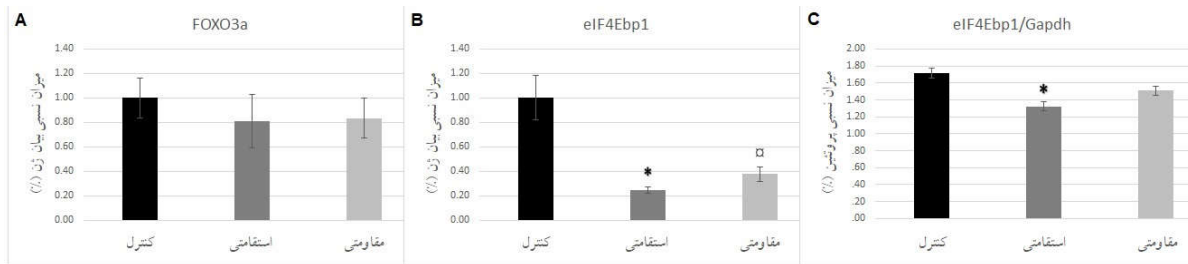
همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بیان ژن mTORC1 نسبت به ژن مرجع، در اثر انجام تمرینات مقاومتی افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل داشت ($P = 0.022$) اگرچه افزایش غیر معنادار آن در گروه استقامتی هم چشمگیر بود ($P = 0.054$) و این در حالی بود که بین دو گروه تمرینی تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P = 0.081$). در ادامه مسیر سنتز پروتیین، تفاوت بین گروهی معناداری در میزان بیان ژن Rps6kb1 مشاهده شد ($P = 0.001$). Mann-Whitney U test به عنوان آزمون تعقیبی، مشخص کرد که تفاوت بین گروه‌های تمرینی استقامتی و مقاومتی با گروه کنترل معنادار است (به ترتیب $P < 0.001$ و $P = 0.001$) در حالی که بین دو گروه تمرینی تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P = 0.345$). افزایش بیان ژن Rps6kb1 در مسیر سیگنالینگ که باعث فعال شدن عوامل زیردستی در روند سنتز پروتیین می‌شود، با میزان افزایش یافته پروتیین Rps6kb1 حاصل از روش وسترن بلات (شکل ۱) هم‌راستا بوده و می‌تواند مؤید افزایش میزان سنتز پروتیین عضله نعلی گروه‌های تمرینی نسبت به گروه کنترل، ناشی از دوره هشت هفته‌ای تمرینات باشد. در همین راستا، نتایج آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) تفاوت بین گروهی معناداری را در میزان بیان پروتیین Rps6kb1 حاصل از وسترن بلات نشان داد ($P < 0.001$) در



شکل ۱: میزان بیان پروتیین‌های Rps6kb1، eIF4Ebp1 و Gapdh با استفاده از روش وسترن بلاتینگ



شکل ۲: اجزای مسیر سنتز پروتئین. میزان نسبی بیان ژن mTORC1 (A)، Rps6kb1 (B) و بیان پروتئین Rps6kb1 (C) نسبت به ژن مرجع (Gapdh) در سه گروه. * و □ تفاوت معنادار با گروه کنترل. $\alpha < 0.05$.



شکل ۳: اجزای مسیر تجزیه پروتئین. میزان نسبی بیان ژن FOXO3a (A)، eIF4Eb1 (B) و بیان پروتئین eIF4Eb1 (C) نسبت به ژن مرجع (Gapdh) در سه گروه. * و □ تفاوت معنادار با گروه کنترل. $\alpha < 0.05$.

اتصال باعث فسفریله شدن زیرمجموعه گیرنده انسولین (IRS-1) و در ادامه فعال شدن مسیر PI3K/AKT می شود. یک پروتئین کیناز سرین-ترئونین است که می تواند سنتز پروتئین را القا کند. همچنین نشان داده شده که فعال شدن مسیر PI3K/AKT باعث فعال شدن mTORC1 می شود. در واقع mTORC1 در پاسخ به محرک های آنابولیکی، حداقل بخشی از رشد سلول را از طریق S6k1 و 4EBP1 تسریع می کند. به عبارت دیگر، محورهای mTORC1-S6k1 و mTORC1-4EBP1 به عنوان تنظیم کننده های مستقیم آغاز ترجمه، نقطه محدودکننده در روند سنتز پروتئین، شناخته شده اند و mTORC1 تنظیم کننده اصلی آن است.^{۲۱،۲۲} نتیجه پژوهش کنونی مبنی بر افزایش mTORC1 در گروه مقاومتی (شکل ۲، A) همسو با نتایج بسیاری از دیگر پژوهش ها است که نشان دادند مسیر PI3K/AKT/mTOR به واسطه آغاز ترجمه باعث ایجاد هایپرتروفی

نتایج آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه، در میزان بیان پروتئین eIF4Eb1 (شکل ۳، C)، تفاوت معناداری را بین گروه استقامتی با گروه کنترل نشان داد ($P=0.036$). هرچند، تاثیر انجام پروتکل تمرینی مقاومتی در کاهش بیان پروتئین eIF4Eb1 نسبت به گروه کنترل چشمگیر بود، ولی این تفاوت معنادار نبود ($P=0.166$).

بحث

مسیر سیگنالینگ سنتز پروتئین، به عنوان نمونه توسط انجام فعالیت های انقباضی عضله اسکلتی، مانند فعالیت جسمانی و ورزشی آغاز و باعث ترشح IGF-1 می شود که به نوبه خود به عنوان یک عامل رشد به گیرنده مربوط به خود در غشای سلول، مانند عضله اسکلتی، متصل شده و آبخاری از رخدادهای ملکولی را آغاز می کند. این

می‌شود. نشان داده شده که فعال شدن AKT حتی برای مدت ۲ تا ۳ هفته برای افزایش مسیر mTORC1/p70s6K و در نتیجه سنتز پروتیین و هایپرتروفی کافی است.^{۲۳،۲۷} برخلاف پروتکل ورزشی مقاومتی، میزان افزایش mTORC1 در اثر انجام تمرین استقامتی پژوهش کنونی معنادار نبود (شکل ۲، A). این مقدار افزایش در بیان ژن mTORC1 در اثر فعالیت استقامتی می‌تواند بیشتر در جهت حفظ توده عضلانی ناشی از انجام تمرین ورزشی و افزایش سن باشد، چراکه این نوع تمرین از کاهش سنتز پروتیین عضله اسکلتی وابسته به پیری و کهولت جلوگیری می‌کند و یا آن را به حداقل می‌رساند.^{۲۴} در ادامه مسیر، بیان ژن Rps6kb1 در هر دو پروتکل ورزشی افزایش معناداری داشت (شکل ۲، B). از آنجاکه mTORC1 فعال‌کننده Rps6kb1 است، افزایش آن در گروه مقاومتی تاییدی بر نتایج پیشین است.^{۲۶} اما در ارتباط با افزایش آن در گروه استقامتی، با توجه به عدم تغییر mTORC1 به‌عنوان نمونه نشان داده شده است پس از یک جلسه تمرین eIF2B، یکی دیگر از عوامل درگیر در سنتز پروتیین، از طریق مسیر وابسته به mTOR کنترل می‌شود^{۲۵} و این در حالی است که eIF2B از مسیر AKT/GSK3 هم قابل کنترل است. به‌عبارت دیگر AKT از طریق فسفریله‌کردن و مهار GSK3، باعث حذف اثر مهاری آن روی eIF2B و شروع روند سنتز پروتیین می‌شود،^{۲۶} ولی اینکه آیا S6K1 هم از مسیری غیر از mTORC1 کنترل می‌شود یا خیر، نیازمند بررسی است، ولی نقش اساسی Rps6kb1 در هایپرتروفی عضلات اسکلتی توسط چندین پژوهش به‌طور قطعی نشان داده شده است.^{۲۳،۲۷،۲۸} که با نتایج پژوهش کنونی همخوانی دارد. همچنین جهت اطمینان بیشتر در خصوص افزایش بیان ژن Rps6kb1 ناشی از روند RT-PCR در اثر انجام هر دو پروتکل تمرینی، میزان بیان پروتیین Rps6kb1 مورد تجزیه و تحلیل وسترن‌بلاتینگ (شکل ۱) قرار گرفت که نتیجه حاصله با افزایش بیان ژن همخوانی داشت و آن را مورد تایید قرار داد (شکل ۲، C). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عوامل درگیر در مسیر سیگنالینگ سنتز پروتیین عضله اسکلتی تحت تأثیر انجام پروتکل‌های ورزشی، به‌ویژه مقاومتی پژوهش کنونی افزایش می‌یابند.

از طرف دیگر، تعادل بین اجزای درون سلولی مرتبط با سنتز و تجزیه پروتیین عضلات اسکلتی تعیین‌کننده اندازه فیبر و در نتیجه توده عضلانی است. آتروفی عضلات اسکلتی زمانی رخ می‌دهد که میزان

تجزیه، برای نمونه در شرایط گرسنگی، برخی بیماری‌ها، کهولت و بی‌حرکی جسمانی، بیشتر از میزان سنتز باشد و FOXO3 به‌عنوان یک عامل رونویسی، از طریق Atrogin1 یا همان MAFbx باعث آتروفی عضلات اسکلتی در بزرگسالان شود. همچنین FOXO3 یک عامل رونویسی است که به‌عنوان نمونه در شرایط استرس‌های اکسیداتیو و تغذیه‌ای و سیگنال‌های مربوطه، از طریق فعال کردن ژن‌هایی مانند LC3B باعث القای آتوفازی می‌شود. افزون‌براین، AKT قادر است فعالیت FOXO3 را مهار کرده و مانع روند آتوفازی شود.^{۱۷} در پژوهش کنونی اگرچه بیان ژن FOXO3a تحت تأثیر انجام هر دو پروتکل ورزشی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ولی این کاهش معنادار نبود (شکل ۳، A). یکی از دلایل عدم تغییر معنادار FOXO3a در اثر انجام دوره هشت هفته‌ای تمرینی، ویژگی‌های عملکردی آن است. این عامل، دو سیستم اصلی تجزیه پروتیین عضله اسکلتی را تحت کنترل دارد، یکی یوبیکویتین-پروتئازومال و دیگری آتوفازیک لیزوزوم، که هر دو مسیر تحت شرایط برخی بیماری‌ها، کهولت و یا آسیب‌های سلولی فعال می‌شوند، بنابراین سالم بودن رت‌های پژوهش کنونی، می‌تواند دلیلی برای عدم افزایش این ژن باشد. از طرف دیگر، همان‌طور که در بالا اشاره شد AKT از جمله عواملی است که به‌ویژه در جریان انجام مستمر فعالیت‌های ورزشی افزایش یافته و فعال می‌شود. AKT به‌عنوان یک عامل تنظیم‌کننده، FOXO3a را در موقعیت‌های ترئونین^{۳۲} سرین^{۲۵۳} و سرین^{۳۱۵} فسفریله کرده و ضمن خروج آن از هسته به داخل سیتوزول، فعالیت اتصال آن به DNA را کاهش می‌دهد. به‌این ترتیب، احتباس FOXO3a در سیتوپلاسم و یا تجزیه آن، منجر به مهار بیان ژن‌های درگیر در تجزیه پروتیین شده و به این ترتیب اثر حفاظتی روی عضله اسکلتی اعمال می‌شود.^{۲۷،۲۹،۳۰} همچنین، همان‌طور که در بالا اشاره شد، فعال شدن مسیر PI3K/AKT/mTOR ضمن فسفریله و فعال کردن Rps6kb1، که با نتایج پژوهش کنونی همسو است، به‌طور موازی باعث مهار 4E-BP1 هم می‌شود. 4E-BP1 از جمله عواملی است که در صورت عدم مهار، به عامل آغازگر روند ترجمه یعنی eIF4E متصل شده و eIF4Ebp1 را تشکیل می‌دهد که به‌نوبه خود از شروع ترجمه و روند سنتز پروتیین جلوگیری می‌کند، زیرا در غیر این صورت، eIF4E می‌تواند به‌همراه eIF4A و eIF4G تشکیل یک مجموعه به‌نام eIF4F را داده و آغاز ترجمه و تنظیم زنجیره پپیدی عضله اسکلتی را سبب شود.^۳ کاهش eIF4Ebp1 در هر دو

یا به‌ویژه به‌طور همزمان در برنامه تمرینی، جهت جلوگیری و یا کاهش آتروفی عضلانی در شرایط پاتولوژیک و سالمندی پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "مقایسه تأثیر تمرینات استقامتی و مقاومتی بر بیان ژن‌های Rps6kb1 و eIF4ebp1 در مسیرهای سیگنالینگ سنتز و تجزیه پروتئین عضله نعلی موش صحرایی" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۷ با کد IR.PNU.REC.1397.035 می‌باشد که با حمایت دانشگاه پیام نور کرج اجرا شده است.

پروتکل ورزشی پژوهش کنونی (شکل ۳، B)، به‌نوعی نشان از آزادی و رهایش eIF4E دارد. به‌عبارت دیگر هر دو پروتکل تمرینی در سرکوب عامل مهارکننده آغاز ترجمه یعنی 4E-BP1 مؤثر بوده‌اند، به‌ویژه تمرین استقامتی، ضمن آنکه نتایج وسترن‌بلاتینگ (شکل ۱) هم مؤید تغییرات بیان این ژن (شکل ۳، C) است.

نتایج پژوهش کنونی، تأثیر کمابیش یکسان پروتکل‌های ورزشی را بر بیان ژن‌های درگیر در مسیرهای سنتز و تجزیه پروتئین عضله نعلی رت‌ها نشان داد، اگرچه تمرینات مقاومتی تا حدودی مؤثرتر بود. بنابراین توجه به استفاده از هر یک از دو پروتکل به‌طور مجزا و

References

- Stewart CE, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006;6(1):73-86.
- Watson K, Baar K. mTOR and the health benefits of exercise. *Semin Cell Dev Biol* 2014;36:130-9.
- Egerman MA, Glass DJ. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit Rev Biochem Mol* 2014;49(1):59-68.
- Mordier S, Deval C, Béchet D, Tassa A, Ferrara M. Leucine limitation induces autophagy and activation of lysosome-dependent proteolysis in C2C12 myotubes through a mammalian target of rapamycin-independent signaling pathway. *J Biol Chem* 2000;275(38):29900-6.
- Hodson N, Philp A. The importance of mTOR trafficking for human skeletal muscle translational control. *Exerc Sport Sci Rev* 2019;47(1):46-53.
- Hershey JW. Translational control in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1991;60:717-55.
- Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):1014-9.
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 2012;441(1):1-21.
- Richardson CJ, Bröenstrup M, Fingar DC, Jülich K, Ballif BA, Gygi S, et al. SKAR is a specific target of S6 kinase 1 in cell growth control. *Curr Biol* 2004;14(17):1540-9.
- Wang X, Li W, Williams M, Terada N, Alessi DR, Proud CG. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J* 2001;20(16):4370-9.
- Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(5):307-18.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Gene Dev* 1999;13(11):1422-37.
- Beretta L, Gingras AC, Svitkin YV, Hall MN, Sonenberg N. Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J* 1996;15(3):658-64.
- Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294(5547):1704-8.
- Chen JK, Chen J, Neilson EG, Harris RC. Role of mammalian target of rapamycin signaling in compensatory renal hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(5):1384-91.
- Shioi T, McMullen JR, Tamavski O, Converso K, Sherwood MC, Manning WJ, et al. Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circulation* 2003;107(12):1664-70.
- Gao Y, Arfat Y, Wang H, Goswami N. Muscle atrophy induced by mechanical unloading: Mechanisms and potential countermeasures. *Front Physiol* 2018;9:235.
- Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen O. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: practical implications for exercise training. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2007;14(6):753-60.
- Iemitsu M, Maeda S, Miyauchi T, Matsuda M, Tanaka H. Gene expression profiling of exercise-induced cardiac hypertrophy in rats. *Acta Physiol Scand* 2005;185(4):259-70.
- Aram Y, Jun-Young H, Soon-Mi C, Dong-Woo H, Ki-Jeong K, Suk-Ho L. Comparison of multiple sets and progressive single set of resistance training on muscle mass and strength in rat. *Exerc Sci* 2015;24(3):267-74.
- McGlory C, Phillips SM. Exercise and the regulation of skeletal muscle hypertrophy. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;135:153-73.
- Olsen LA, Nicoll JX, Fry AC. The skeletal muscle fiber: A mechanically sensitive cell. *Eur J Appl Physiol* 2019;119(2):333-49.
- Lai KM, Gonzalez M, Poueymirou WT, Kline WO, Na E, Zlotchenko E, et al. Conditional activation of AKT in adult skeletal muscle induces rapid hypertrophy. *Mol Cell Biol* 2004;24(21):9295-304.
- Reynolds TH 4th, Reid P, Larkin LM, Dengel DR. Effects of aerobic exercise training on the protein kinase B (PKB)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in aged skeletal muscle. *Exp Gerontol* 2004;39(3):379-85.
- Kubica N, Bolster DR, Farrell PA, Kimball SR, Jefferson LS. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B mRNA in a mammalian target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem* 2005;280(9):7570-80.

26. Pavitt GD. eIF2B, a mediator of general and gene-specific translational control. *Biochem Soc Trans* 2005;33(Pt 6):1487-92.
27. Atherton PJ, Babraj J, Smith K, Singh J, Rennie MJ, Wackerhage H. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J* 2005;19(7):786-8.
28. Karlsson HK, Nilsson PA, Nilsson J, Chibalin AV, Zierath JR, Blomstrand E. Branched-chain amino acids increase p70S6k phosphorylation in human skeletal muscle after resistance exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287(1):E1-7.
29. Wang X, Hu S, Liu L. Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically? *Oncol Lett* 2017;13(5):2867-72.
30. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, Panaro F, Timofeyeva Y, Kline WO, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell* 2004;14(3):395-403.

Comparing the effects of endurance and resistance trainings on gene expression involved in protein synthesis and degradation signaling pathways of Wistar rat soleus muscle

Abstract

Received: 27 Aug. 2019 Revised: 03 Sep. 2019 Accepted: 09 Feb. 2020 Available online: 19 Feb. 2020

Majid Gholipour Ph.D.^{1*}
Mastaneh Seifabadi M.Sc.²
Mohammad Reza Asad Ph.D.³

1- Department of Physical Education, Sharif University of Technology, Tehran, Iran.

2- Department of Physical Education and Sport Science, Applied Exercise Physiology, Karaj Payam Noor University, Alborz, Iran.

3- Department of Physical Education and Sport Science, Karaj Payam Noor University, Alborz, Iran.

Background: Skeletal muscle mass, which is regulated by a balance between muscle protein synthesis and degradation, is an important factor for movement to meet everyday needs, especially in pathological conditions and aging. The purpose of the present investigation was to compare the alterations of the gene expression involved in muscle protein synthesis and degradation signaling pathways induced by two exercise training protocols.

Methods: Eight weeks old Wistar rats have been assigned to the present experimental study, which was conducted from August 2018 to October 2018 at the animal laboratory of Tehran University. They were randomly divided into two resistance and endurance training groups and one control group, and run on a treadmill, 5 sessions per week for 8 weeks. 48 hours after the last exercise session, the rats in the two groups were anesthetized, and the dissected soleus muscles from euthanized animals were stored at -80° for RT-PCR and Western blot analysis later. Between-group differences were analyzed by the parametric and non-parametric tests for normally and non-normally distributed data respectively, at the significance level of $\alpha < 0.05$.

Results: Compared with the control group, mTORC1 gene expression was increased significantly just in the endurance group ($P=0.022$), whereas both endurance and resistance exercise protocols caused a significant increase in Rps6kb1 ($P < 0.001$ and $P=0.001$ respectively). In protein degradation pathway, although, FOXO3a did not alter significantly ($P=0.463$), eIF4Ebp1 gene expression was inhibited by both endurance and resistance exercise training protocols ($P < 0.001$ and $P=0.001$ respectively). The alterations of Rps6kb1 and FOXO3a gene expression were confirmed by Western blot analysis.

Conclusion: The results showed that the exercise training protocols of the present study had approximately similar effects on alterations of gene expression involved in skeletal muscle protein synthesis and degradation pathways. Therefore, application of the protocols may be considered to prevent or reduce the muscle atrophy in pathological conditions such as motor neuron disease, aging, and/or muscle strength improvement in athletes.

Keywords: exercise training, gene expression, polymerase chain reaction, protein biosynthesis, rats, soleus muscle.

* Corresponding author: Department of Physical Education, Sharif University of Technology, Azadi St., Tehran, Iran.
Tel: +98-21-66165152
E-mail: gholipour@sharif.edu