تأثیر حفاظتی هشت هفته تمرین هوازی تناوبی بر بیان دکورین، TGF-β و حجم تومور در مدل حیوانی سرطان پستان

وحید ستوده[۱]، رضا قراخانلو[۲]، سولماز خلیق فرد[۳]، سمانه خلیق فرد[۴]، علیمحمد علیزاده[۵*]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی
۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشجوی دکتری، گروه سلولی مولکولی، دانشکده علوم پایه،دانشگاه آزاد علوم تحقیقات، تهران
۴. دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی،دانشگاه خوارزمی
۵. استادیار، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۹/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۱۰/۲۰

چکیده

دکورین مایوکاینی است که ازطریق تعامل با فاکتور رشد تومور بتا (TGF-β)، رشد و تکامل سلول‌های سرطانی را تعدیل می‌کند. هدف مطالعهٔ حاضر بررسی اثر حفاظتی هشت هفته تمرین هوازی تناوبی بر بیان دکورین TGF-β و حجم تومور در مدل حیوانی سرطان پستان است. در این تحقیق تجربی۴۰ سر موش آزمایشگاهی مادهٔ نژاد بالب سی به‌روش تصادفی و به‌طور مساوی در چهار گروه کنترل، تومور، ورزش و گروه ورزش به‌همراه تومور تقسیم شدند. تمرین اصلی، چهار هفته قبل و چهار هفته بعد از کاشت تومور با ۵۰ تا ۷۰ درصد توان بیشینهٔ موش‌ها اجرا شد. موش‌های دو گروه تومور و گروه ورزش به‌همراه تومور، ازطریق جراحی زیرجلدی با تومور آدنوکارسینومای پستان موشی سرطانی شدند. رشد تومور به‌صورت هفتگی اندازه‌گیری شد و در پایان مطالعهٔ تومورها و بافت عضلهٔ سولئوس ازطریق جراحی استخراج شدند. برای بررسی بیان ژن دکورین و TGF-β از روش Real-Time PCR استفاده شد و داده‌ها به‌روش آزمون‌های تی تحلیل واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن آزمون تعقیبی توکی با سطح معنی‌داری P<۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند. میزان رشد تومور درگروه تومور به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ورزش به‌همراه تومور بود و تفاوت معنی‌داری در میزان بیان دکورین در عضلهٔ سولئوس بین چهار گروه وجود داشت (F=12/30,P=0/0023). همچنین، آزمون تعقیبی توکی نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی تناوبی سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن دکورین در بافت عضلهٔ سولئوس در دو گروه ورزش نسبت به گروه کنترل و گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور شده است (P=0/02)، اما میزان بیان TGF-β در بافت تومور در گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه توموری کاهش معنی‌داری نشان داد. نتایج نشان داد که تمرینات هوازی تناوبی احتمالاً با افزایش بیان دکورین و کاهش بیان TGF-β، در کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان نقش دارد که اهمیت این نوع تمرین ورزشی را در مهار رشد تومور در سرطان پستان نشان می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: ورزش، حجم تومور، دکورین، سرطان.

Protective effects of eight weeks interval aerobic exercise on decorin, TGF-β and tumor volume in atypical animal of breast cancer

Sotoudeh, V.,[1] Gharakhanlou, R.,[2] Khalighfard, S., [3] Khalighfard, S.,[4] Alizadeh, A.M.[5]

1. PhD Student, Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences Kharrazmi University, Iran
2. Professor, Faculty of Humanities Sciences, Tarbiat Modares University, Iran
3. Ph.D. Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. PhD Student, Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences Kharrazmi University, Iran
5. Assistant Professor, Cancer Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: The decorin is a myokine that modulates the growth and the development of the cancer cells through the interaction with TGF-β. The present study is aimed to evaluate the protective effects of 8 weeks interval aerobic exercise on the expression of decorin and TGF-β, and tumor volume in a typical animal of breast tumor. Materials and Methods: In a exprimental research, forty adult female Balb/c mices were randomly divided into four groups: control, tumor, exercise, and exercise with the tumor. The main exercise was performed four weeks before and after tumor with 50-70 percent of the maximum power of mices. The mices were cancerous by subcutaneous surgery with tumor of adenocarcinoma of mice breast in the tumor group and the exercise group with the tumor. Tumor growth was measured weekly. At the end of the study, tumor and soleus muscle were extracted by surgery. Real-Time PCR method was used to evaluate the expression of decorin and TGF-β and data were analyzed by t-test, one-way ANOVA and post-hoc methods with considering the significant level

*. aalizadeh@sina.tums.ac.ir

of p<0.05. Results: The tumor growth rate in tumor group was significantly higher than the exercise group with the tumor. A significant difference confirmed between four groups In the level of decorin expression in soleus muscle (F=12.30 , P=0.0023). The Post hoc test showed that 8 weeks of interval aerobic training significantly increased the expression of decorum gene in soleus muscle in two pairs of exercise group compared with control group and exercise group with tumor compared to tumor group (P=0.02). The expression of TGF-β in tumor tissue showed a significant reduction in exercise group with tumor compared with tumor group. Conclusion: Our results showed that interval aerobic training probably contributes to decreasing the growth of breast cancer cells by increasing the expression of decorin and decreasing the expression of TGF-β.

Keywords: Exercise, Tumor Volume, Decorin, Cancer.

مقدمه

سرطان پستان یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین سرطان‌ها است که ۲۳ درصد سرطان‌های زنان را تشکیل داده است. شیوع این بیماری به‌طور خاص در میان زنان ۴۶ تا ۴۹ ساله در حال افزایش است (۱،۲). در سال‌های اخیر، در کشورهای پیشرفته حوزه‌های جدیدی درزمینهٔ سرطان و ورزش شکل گرفته است که با رویکرد درمانی به ورزش نگاه می‌کنند. چنان‌که مطالعات زیادی در خصوص اثر مثبت ورزش بر رشد و تکامل تومور، ارتباط مستقیم بین تغییرات سیستمیک و سلولی ناشی از ورزش و کاهش رشد تومور را در سرطان پستان نشان داده‌اند (۱). مطالعات نشان داده‌اند که ورزش منظم، امکان ابتلا به سرطان پستان را ۳۰ تا ۴۰ درصد کاهش و میزان بقا را در زنان مبتلا به سرطان پستان افزایش می‌دهد (۳،۴). به‌هرحال، سازوکار تأثیر مفید فعالیت ورزشی بر فرایند سرطان پستان بسیار پیچیده است. فعالیت ورزشی می‌تواند با تعدیل واکنش‌های ایمنی و التهابی خطر پیشرفت سرطان پستان را تعدیل بخشد. در راستای چگونگی این اثرها، در دهه‌های اخیر گزارش‌های زیادی نشان داده است که سلول‌های عضلهٔ اسکلتی به‌طور معناداری پپتیدها/سایتوکاین‌هایی را با تبعیت از الگوی اتوکرین، پاراکرین و اندوکرین در پاسخ به انقباض عضلانی (فعالیت ورزشی) ترشح می‌کنند. با توجه به ظرفیت تولید و ترشح مایوکاین‌ها در عضلات اسکلتی، امکان دارد که مایوکاین‌ها اثر حفاظتی ورزش را در مقابل بیماری‌های مزمن مانند بیماری‌های قلبی- عروقی، دیابت و سرطان تعدیل کنند. فرض شده است که انقباض عضله محرک اصلی ترشح مایوکاین‌ها است و بیش از ۵۰۰ مایوکاین شناسایی شده است (۵،۶). برخی از مایوکاین‌های شناخته‌شده، در الگوی اتوکرین، اثر اصلی خود را بر فیزیولوژی عضله اعمال می‌کنند، درحالی‌که دیگر مایوکاین‌ها اثر سیستمیک خود را بر دیگر بافت‌ها و ارگان‌ها اعمال می‌کنند (۶). اخیراً، یک مایوکاین ناشی از انقباض به نام دکورین شناسایی شده است که فعالیت رشد سلول‌های مختلف را ازطریق تعامل با TGF- تعدیل می‌کند (۷). پروتئین دکورین، عضوی از خانوادهٔ پروتئوگلیکان‌های کوچک غنی از لوسین ماتریکس خارج‌سلولی است که به‌وسیلهٔ سلول‌های عضلهٔ اسکلتی ترشح می‌شود و ازطریق تعدیل فعالیت فاکتورهای رشد، نقش مهمی در رشد سلول دارد (۸). این پروتئوگلیکان می‌تواند فعالیت زیستی فاکتورهای رشد را تعدیل و مانند مولکول سیگنالینگ مستقیم در سلول‌های مختلف عمل کند (۹). ابتدا تصور بر این بود که پروتئوگلیکان‌ها به‌طور انحصاری تنها مؤلفه‌های ساختاری هستند، اما امروزه معلوم شده

که در سیگنالینگ نقش اصلی دارند و بر عملکردهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، بقا، اتصال، مهاجرت و پاسخ‌های التهابی تأثیر می‌گذارند (۱۰).

اخیراً، مطالعاتی در زمینهٔ بررسی عملکرد و نقش دکورین در بیماری‌ها به‌خصوص سرطان پستان انجام شده است. و نشان داده‌اند که دکورین نقش مهمی در توسعه و پیشرفت تومور ایفا می‌کند و مانند عامل ضدسرطان بالقوهٔ طبیعی است که به‌وسیلهٔ سلول‌های طبیعی، برخلاف سلول‌های سرطان، تولید می‌شود و ازطریق مسیرهای چندگانه بر سلول‌های تومور اثر می‌گذارد. شواهدی وجود دارد که بیان هدفمند دکورین در بافت‌های سرطان، یک راهکار درمانی ضد سرطان است (۱۱). لیگ و همکاران (۲۰۰۰) در مطالعه‌ای دربارهٔ عملکرد دکورین در مدل‌های سلول‌های سرطان پستان درون آزمایشگاهی، یک تنظیم منفی در بیان دکورین، هم در سطح پروتئین و هم در سطح mRNA، گزارش کرده‌اند، که این بیان کاهش‌یافتهٔ دکورین با تشخیص ضعیف در سرطان پستان ارتباط داشته است (۱۲). بی و همکاران (۲۰۰۸) با انجام آزمایش‌هایی دربارهٔ مدل‌های موشی نشان دادند که توقف بیان دکورین، تشکیل اولیهٔ تومور و تشکیل لنفوما را تسریع می‌بخشد (۱۰). فاکتور رشدی توموری بتا (TGF-β) یک فاکتور رشدی چندکاره است که رفتارهای گوناگون سلول شامل تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپاپتوز را تنظیم می‌کند و مسیر سیگنالینگ TGF-β رشد سلول‌های تومور را مهار می‌کند و شناخته شده است که مانند سرکوبگر تومور در طی مراحل اولیهٔ کارسینوژنز عمل می‌کند. به‌طور خاص، مسیر سیگنالینگ TGF-β نقش مهمی در طی پیشرفت و متاستاز سرطان پستان دارد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که دکورین فعالیت رشد سلول‌های مختلف را ازطریق تعامل با TGF-β تعدیل می‌کند. دکورین می‌تواند با اثرگذاری بر فعالیت TGF-β رشد سلول‌های سرطانی را کنترل و مهار کند (۱۳). مطالعه‌های اخیر بر نقش حفاظتی فعالیت ورزشی بر رشد تومور تمرکز کرده‌اند، اما مطالعهٔ حاضر با فرض تأثیر مثبت دکورین در راستای نقش حفاظتی فعالیت ورزشی بر حجم تومور پستان هدف‌گذاری شده است. بنابراین، به‌نظر می‌رسد پژوهش حاضر اولین مطالعه در زمینهٔ بررسی نقش دکورین در رشد و تکامل سلول‌های سرطان پستان در پاسخ به فعالیت ورزشی است. در این مقاله تلاش شده است تا به این پرسش‌ها پاسخ داده شود که، اول اینکه آیا تمرینات هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور می‌تواند از طریق تولید و ترشح دکورین عضلانی بر رشد و تکامل تومور مؤثر باشد؟ و دوم اینکه آیا تمرینات هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور نقشی در مهار رشد تومور با بررسی ژن‌های گیرنده دکورین و TGF-β دارد؟

روش‌شناسی

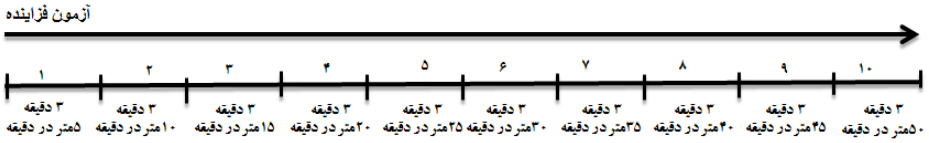
در پژوهش تجربی حاضر، ۴۰ سر موش آزمایشگاهی نژاد بالب سی ماده با محدودهٔ سنی ۶ تا ۷ هفته با محدودهٔ وزنی ۱۶–۱۸ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. موش‌ها در گروه‌های ده‌تایی و در محیطی با میانگین دمای ۱/۴±۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد، رطوبت ۴±۵۵ درصد و چرخهٔ روشنایی- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های

مخصوص از جنس پلی‌کربنات با درب توری و به ابعاد ۲۵ در ۲۷ و در ۴۳ سانتی‌متر نگهداری شدند. غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود که از شرکت خوراک دام پارس خریداری شد و به‌صورت آزاد تا پایان پروتکل در دسترس موش‌ها قرار گرفت. کلیهٔ اصول اخلاقی مطالعه مطابق با اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی و مطالعات انسانی مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت (رسالهٔ دکتری با شماره ۴۰۱۴۷۰۰).

گروه‌بندی حیوانات تحت مطالعه: تمامی موش‌ها پس از یک هفته آشنایی با زندگی در حیوان‌خانه و نحوهٔ دویدن روی نوارگردان به‌روش تصادفی به چهار گروه ده‌تایی ذیل تقسیم شدند. گروه‌های تحقیق حاضر شامل گروه کنترل، گروه توموری، گروه ورزش و گروه ورزش به‌همراه تومور بود. دربارهٔ گروه کنترل هیچ گونه تیماری تا پایان مطالعه انجام نگرفت. گروه توموری بعد از توموری‌شدن، تا پایان مطالعه هیچ مداخله‌ای دریافت نکردند. گروه ورزش مطابق جدول ۱ به‌مدت هشت‌هفته، پنج‌روز در هفته و با شدت تعیین‌شده تمرینات هوازی تناوبی را انجام دادند. در گروه ورزش به‌همراه تومور، موش‌ها چهار هفته قبل و چهار هفته بعد از کاشت بافت تومور، تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور را طبق پروتکل ورزشی دریافت کردند. حیوانات از ابتدای مطالعه هر سه روز یک‌بار توزین شدند و وزن آنها یادداشت شد.

پروتکل تمرینی: تمرین اصلی یک تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور دویدن روی نوارگردان بود که در جدول ۱ ارائه شده است. در پایان هفتهٔ هشتم، موش‌های تمام گروه‌ها به‌منظور سنجش عوامل مرتبط کشته شدند. پروتکل تمرینی با ۵۰ تا ۷۰ درصد توان بیشینهٔ موش‌ها اجرا شد. موش‌های گروه ورزش و گروه ورزش به‌همراه تومور، روی نوارگردان شش کاناله به مدت هشت هفته و هر هفته پنج جلسه، بین ساعت ۸ تا ۱۲ ظهر تمرین می‌کردند. موش‌های گروه‌های ورزش و ورزش به‌همراه تومور، برای عادت‌کردن به تمرینات و دویدن روی نوارگردان، ابتدا تمرینات آشناسازی را با دویدن روی نوارگردان با سرعت ۵ تا ۷ متر در دقیقه، ۱۰–۱۵ دقیقه در روز، و ۳ روز متوالی انجام دادند. پس از اجرای تمرینات آشناسازی و تا اجرای تمرینات اصلی، موش‌ها دو روز استراحت کردند (دو روز استراحت بین تمرینات آشناسازی و تمرینات اصلی). پس از یک روز استراحت و قبل از شروع تمرین اصلی، با استفاده از آزمون فزایندهٔ استاندارد بیدفورد و همکاران (۱۹۷۹) (۱۴)، که به‌وسیله لیندرلو و همکاران (۲۰۰۷) برای رت‌ها و موش‌ها استاندارد شده است، توان بیشینهٔ موش‌های بالب سی محاسبه شد (۱۵). آزمون فزاینده شامل یک آزمون ده مرحله‌ای دویدن روی نوارگردان بدون شیب بود که پس از ۱۰ دقیقه گرم‌کردن با سرعت پایین اجرا شد. سرعت شروع ۵ متر در دقیقه بود که هر ۳ دقیقه، سرعت ۵ متر در دقیقه اضافه می‌شد، تا جایی که موش‌ها دیگر قادر به دویدن نبودند. سرعت نهایی موش‌ها به‌منزلهٔ سرعت بیشینه در زمان رسیدن به توان بیشینه به‌دست آمد و ۵۰ و ۷۰ درصد آن به‌منزلهٔ شدت‌های تمرینی حداقل و حداکثر تعیین شد (تصویر ۱). آزمون فزاینده به‌صورت جداگانه از موش‌های گروه‌های ورزش و ورزش به‌همراه تومور گرفته شد. از حیوانات هر دو هفته یک‌بار آزمون فزاینده گرفته‌شد و شدت تمرین با توجه به مقادیر جدید آزمون تعیین می‌شد و پس از

۲۴ ساعت استراحت، تمرین اصلی براساس شدت‌های به‌دست آمده از آزمون فزاینده طراحی شد (جدول۱). گروه کنترل در این مدت هیچ‌گونه فعالیت ورزشی نداشتند. پس از پایان پروتکل تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور، موش‌های تمام گروه‌ها، ۴۸ ساعت بعد از جلسهٔ آخرین تمرین اتانازی شدند. در ابتدا، موش‌ها با ترکیبی از زایلازین و کتامین بی‌هوش شدند و با جراحی نمونهٔ خونی و بافت تومور موش‌ها برداشته شد و بلافاصله در ازت مایع فریز شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. همچنین، بافت عضلهٔ سولئوس از موش‌ها استخراج شد. به‌علاوه، نمونه‌های خونی پس از چند دقیقه سانتریفیوژ شد و سرم آن جدا شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.



تصویر۱: آزمون فزاینده

جدول۱: پروتکل ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی روی نوارگردان قبل و بعد ازکاشت تومور

دوره تمرین	شرایط ورزش	سرعت (متر در دقیقه)	تکرار	زمان (دقیقه)	کل زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحله آشناسازی	قبل از پیوند تومور	۵-۷			۱۰-۱۵	۳
هفته اول و دوم	قبل از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۱۹	۵	۲	۱۰	۵
		سرعت پایین: ۱۴	۵	۲	۱۰	
هفته سوم	قبل از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۲۱	۵	۳	۱۵	۵
		سرعت پایین: ۱۵	۵	۳	۱۵	
هفته چهارم	قبل از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۲۱	۵	۴	۲۰	۵
		سرعت پایین: ۱۵	۵	۴	۲۰	
کاشت بافت تومور ۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین						
هفته پنجم و ششم	بعد از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۱۹	۵	۲	۱۰	۵
		سرعت پایین: ۱۴	۵	۲	۱۰	
هفته هفتم	بعد از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۲۳	۵	۳	۱۵	۵
		سرعت پایین: ۱۷	۵	۳	۱۵	
هفته هشتم	بعد از پیوند تومور	سرعت متوسط: ۲۳	۵	۴	۲۰	۵
		سرعت پایین: ۱۷	**۵**	**۴**	**۲۰**	
۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرین اتانازی حیوانات						

نحوهٔ ایجاد و اندازه‌گیری تومور: برای تهیهٔ اســتوک اولیهٔ تومور ســرطان پســتان ســل‌لاین MC4L2 به‌میزان 1×10^5 سلول به‌صورت تزریق صفاقی بر پهلوی راست موش انجام شد که بعد از رشد تومور به‌اندازهٔ مورد نیاز موش حاوی تومور اســتوک، کشــته شــد و تومور به قطعاتی با ابعاد کمتر از ۰/۳ میلی‌متر مکعب برش داده شــد. ســپس، هریک از موش‌های گروه‌های تومور و ورزش به‌همراه تومور به‌وســیلهٔ کتامین و زایلازین (به ترتیب با دوز (mg/kg) ۱۰ و ۱۰۰ داخل پریتوئن) بیهوش شدند و تکه‌های تومور به‌صورت زیرجلدی در پهلوی سمت راســت حیوان کاشــته شــد. یک هفته بعد از کاشــت، بافت تومور در تمام موش‌ها قابل رؤیت و اندازه‌گیری بود. برای اندازه‌گیری حجم تومور به‌صــورت هفته‌ای دوبار از کولیس دیجیتال (Mitutoyo,Japan) اســتفاده شــد (۱۶). طول، عرض و ارتفاع تومور طبق فرمول محاسبه و لحاظ شد:

$$V=1/6(\pi\times L\times W\times D)$$

که در آن L = طول، W = عرض ، D = ارتفاع و V= حجم تومور. سپس، عدد محاسباتی روز آخر تقسیم بر روز اول شد تا میزان نهایی حجم تومور برای عملیات بعدی در هر موش به‌دست آید.

استخراج RNA و سنتز cDNA: برای استخراج RNA از بافت‌های تومور و عضلهٔ سولئوس با توجه به پروتکل از کیت (Total RNA) Extraction Kit, Parstuse استفاده و آر.ان.ای‌ها از بافت جدا شد. در پایان، مقدار RNA با روش دانسیتهٔ نوری (OD) و میزان جذب در طول موج تعیین‌شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. سپس، سنتز cDNA مطابق پروتکل از کیت (Easy cDNA Synthesis Kit, Parstuse) بهینه‌شده انجام گرفت. در این پروتکل به مقدار 1µl از هریک از ترکیبات Oligo or Random Hexamer (40µg/µl), dT(100µg/µl), (10mM)dNTP و۱۰ µl از RNA Template در میکروتیوب ریخته شد و سپس، لوله به مدت ۶ دقیقه در ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد قرارگرفت و بلافاصله در یخ گذاشته شد و 10 µl از RT Premix درون میکروتیوب ریخته شد. با مخلوط دو میکروتیوب، حجم نهایی واکنش در نهایت 20µl به‌دست آمد. توالی ژن TGF-β از سایت NCBI به‌دست آمد و توسط برنامهٔ Primer Express ۳ پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. پس از طراحی توالی پرایمرها توسط NCBI و Runner Gene نیز Blast گردیدند تا دقت و اختصاصی‌بودن آنها به‌طور کامل بررسی شود (۱۷).

Real Time PCR: جهت بررسی میزان بیان ژن TGF-β و دکورین در نمونه‌های تومور و عضلهٔ سولئوس به‌ترتیب از روش Real Time PCR با Syber Green PCR Master Mix استفاده شد. در این روش، از زوج پرایمر اختصاصی که توسط گروه تحقیقاتی و با استفاده از سایت NCBI طراحی شده است، استفاده شد. جهت بررسی میزان بیان ژن GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی (Housekeeping Gene) از زوج پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. توالی پرایمرها در جدول ۲ نمایش داده شده است (۱۸).

جدول ۲. پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش Real-Time PCR

Gene	Forward 5 ⟶ 3	Reverse 5 ⟶ 3
TGF-β	ACACTGCCCCTGCTGTACCTTCG	AGCAGGAGATGTGGGGTCTTCCC
GAPDH	AGGCCGGTGCTGAGTATGTCGTG	TCACAAACATGGGGGCATCGG
Decorin	ACCTCTCGTGAAGTTGGAAAGG	CCCAGAGTTTTTCAGTGGGTTG

واکنش Real Time PCR، ژن‌های مذکور طبق روش زیر و با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر بیو- راد انجام گرفت. میانگین CTها، با استفاده از $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. جهت انجام واکنش، به هر تیوپ 100 میکرولیتری، مقدار ۱۰ میکرولیتر ماسترمیکس سایبرگرین با غلظت ۲ ایکس، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمرهای Reverse و Forwardبا غلظت ۱۰ پیکو مولار (که با استفاده از نرم‌افزار ۳ Primer طراحی شده‌اند) ۷/۴ میکرولیتر آب DEPCو ۲ میکرولیتر cDNA استفاده شد. تکثیر PCR در ۴۰ سیکل، با استفاده از برنامهٔ ذیل انجام شد: ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. در همهٔ موارد، داده‌ها با ژن GAPDH به‌عنوان Housekeeping Gene مقایسه شد. با استفاده از رنگ سایبرگرین (SYBER Green) میزان آمپلی فیکاسیون (Amplification) در هر چرخه دنبال و میزان افزایش محصولات اندازه‌گیری شد. پس از اتمام واکنش تکثیر، برای هر واکنش PCR یک نمودار رسم شد و سپس براساس آن CT تعیین شد (۱۹).

ارزیابی خلوص و کیفیت محصولات Real-Time PCR : مقادیر CT (Threshold cycle) برای هر نمونه محاسبه شد و تغییرات بیان ژن‌ها در هر نمونه با استفاده از مقادیر CT اندازه گرفته شد(۱۹).

فرمول‌ها برای محاسبه به این ترتیب بود:

$$\Delta Ct = Ct\ (\text{ژن هدف}) - Ct\ (\text{ژن مرجع})$$

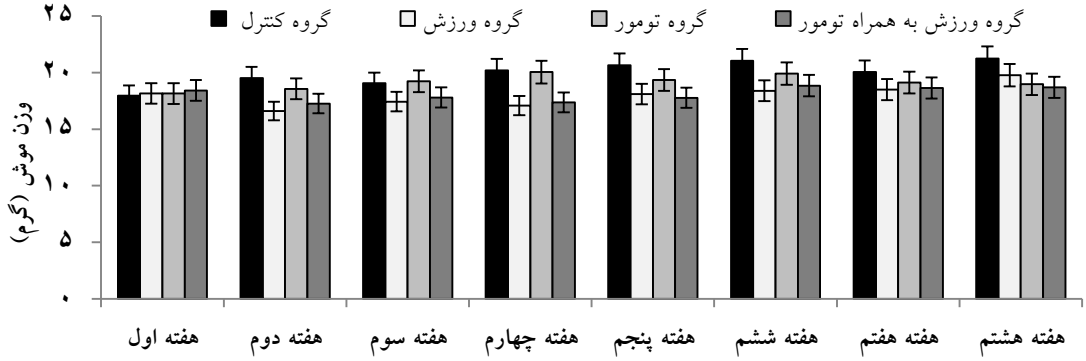
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct\ (\text{نمونهٔ آزمایش}) - \Delta Ct\ (\text{نمونه نرمال})$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{میزان تغییرات بیان ژن}$$

روش آماری: برای توصیف داده‌ها از میانگین و انحراف استاندارد استفاده شد. برای ارزیابی توزیع طبیعی داده‌ها از آزمون کلموگروف- اسمیرنوف استفاده شد. برای تحلیل استنباطی داده‌ها از آزمون‌های تی برای اندازه‌گیری حجم تومور و مقایسهٔ بیان ژن TGF-β و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسهٔ میزان بیان ژن دکورین استفاده شد. سپس، آزمون تعقیبی توکی برای میزان بیان ژن دکورین در بافت عضلهٔ دوقلو در دو گروه ورزش نسبت به گروه کنترل و گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور انجام شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

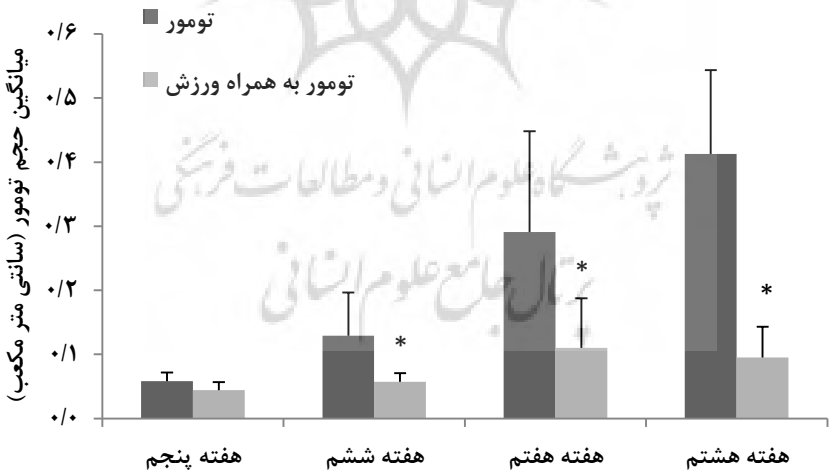
یافته‌ها

روند تغییرات وزن موش‌ها به‌صورت هفتگی در نمودار ۱ در تمام گروه‌ها نشان داده شده است.



نمودار۱: تغییرات وزن موش‌ها به صورت هفتگی در گروه های مختلف

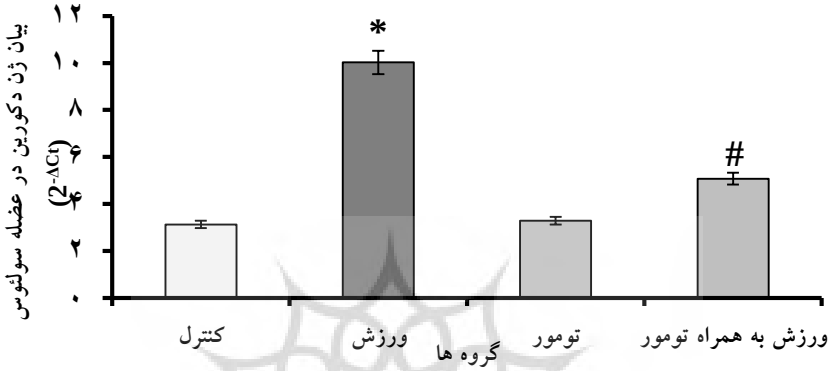
روند تغییرات حجم تومور به‌صورت هفتگی در نمودار ۲ در دو گروه تومور و ورزش به‌همراه تومور نشان داده شده است. نتایج نشان داد میزان رشد تومور در گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور کاهش معنی‌داری داشته است. همچنین، تومور ۳ سر از موش‌ها در هفتهٔ هشتم کاملاً از بین رفته بود. نتایج آزمون تی، تفاوت معنی‌داری در نسبت رشد تومور بین دو گروه تومور و تومور به همراه ورزش نشان داد (P=۰/۰۰۲)



نمودار۲: اثر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی بر رشد حجم تومور پستان در موش

* P≤0/05 تفاوت معنی دار نسبت به گروه تومور در همان هفته

نتیجهٔ آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه، وجود تفاوت معنی‌دار در میزان بیان ژن دکورین بین چهار گروه را تأیید کرده است (F=۱۲/۳۰, P=۰/۰۰۲۳). سپس، آزمون تعقیبی توکی نشان داد که هشت هفته تمرین هوازی تناوبی سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن دکورین در بافت عضلهٔ سولئوس در دو گروه ورزش نسبت به گروه کنترل و گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور شده است (P=۰/۰۲) (نمودار۳).

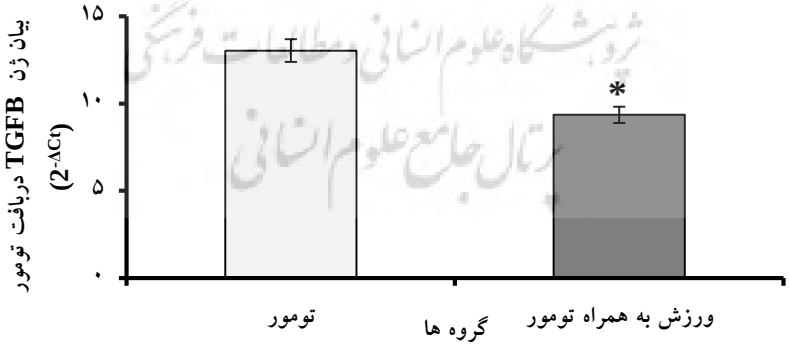


نمودار۳: تغییرات بیان ژن دکورین در عضله سولئوس در اثر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی در موش با تومور پستان

* P≤0/05 تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه کنترل

P≤0/05 تفاوت معنی‌دار بیان ژن دکورین نسبت به گروه تومور

همچنین، نتایج نشان دادند که هشت هفته فعالیت هوازی تناوبی سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن **TGF-β**در بافت تومور گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور شده است (نمودار۴).



نمودار۴: تغییرات بیان ژن TGF-β در بافت تومور در اثر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی در موش با تومور پستان

* P≤0/05 تفاوت معنی‌دار نسبت به گروه تومور

بحث

با توجه به داده‌های حاصل از حجم تومور، پژوهش حاضر نشان داد، هشت هفته تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور می‌تواند روند پیش‌روی سرطان پستان را کاهش دهد، به گونه‌ای که نسبت رشد تومور به‌طور معنی‌داری در گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور پایین‌تر بود. هم‌راستا با داده‌های حاصل از حجم تومور در پژوهش حاضر، نتایج پژوهش بتوف و همکاران (۲۰۱۳) دربارهٔ موش‌های مبتلا به سرطان پستان نشان داد که تمرین هوازی به‌منزلهٔ یک روش درمانی، رشد تومور را در گروه‌هایی که پس از سرطانی‌شدن، تمرین هوازی انجام داده بودند نسبت به بقیهٔ گروه‌ها تا دوبرابر کاهش می‌دهد (۲۰). مطالعات دیگر نیز کاهش حجم تومور را به‌دنبال تمرین منظم ورزشی گزارش کرده‌اند (۲۱،۲۲). مورفی و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که تمرین اجباری نوارگردان سبب کاهش معنی‌دار تعداد و حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود (۲۳). سازوکارهای تأثیر تمرین ورزشی بر حجم تومور، پیچیده و نامشخص است. در جهت بررسی تغییرات فیزیولوژیکی بافت تومور در پاسخ به فعالیت ورزشی، نشانگر رشد سلول‌های سرطانی TGF-β را در این مطالعه بررسی کردیم. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد هشت هفته تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور سبب کاهش میزان بیان ژن TGF-β در بافت تومور شده است. یک پارادوکس اصلی دربارهٔ TGF-β این است که یک سرکوبگر بالقوه تکثیر سلول‌های طبیعی اپیتلیال پستان است، اما در طی توسعهٔ سرطان به پروموتور تبدیل می‌شود (۲۴). در سلول‌های طبیعی اپیتلیال پستان و در مراحل ابتدایی پیشرفت سرطان، TGF-β، با خاصیت سرکوب‌کنندگی خود بر رشد تومور و ازطریق مهار تکثیر سلولی به‌منزلهٔ مهارکنندهٔ رشد عمل می‌کند، اما با پیشرفت سرطان عملکرد آنکوژنیک و القاکنندگی تومور پیدا می‌کند و باعث افزایش پتانسیل تهاجم و متاستاز می‌شود(۲۴،۲۵). براین‌اساس، مسیر سیگنالینگ TGF-β به‌مثابهٔ مسیر سرکوبگر تومور و پروموتور پیشرفت تومور و تهاجم در نظر گرفته شده است (۲۵،۲۶). درواقع، بیان بالای TGF-β با شروع تومور پستان، پیشرفت و متاستاز آن ارتباط دارد. آرتیگا و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که افزایش سیگنالینگ TGF-β در اپیتلیال سلول های‌پستان مدل‌های موشی، متاستاز ریوی را افزایش می‌دهد، درحالی‌که مهار سیستمیک سیگنالینگ TGF-β متاستاز ریه را مهار می‌کند (۲۷).

کاهش میزان بیان TGF-β در گروه ورزش به‌همراه تومور نسبت به گروه تومور به این معنی است که شاید فعالیت بدنی منظم ازطریق مهار مسیر سیگنالینگ TGF-β سبب کاهش حجم و رشد سلول‌های تومور شود. این نتایج با میزان رشد تومور نیز هم‌خوانی دارد، یعنی میزان رشد تومور در گروه ورزش به‌همراه تومور پایین‌تر است. برآیند این تغییرات مسلماً کاهش رشد تومور یا تأخیر در رشد تومور است. ازطرف دیگر، در پژوهش حاضر نشان داده شد، میزان بیان ژن دکورین در گروه‌های ورزش و ورزش به‌همراه تومور به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. مطالعات اندکی درباب تأثیر فعالیت ورزشی بر میزان دکورین انجام و نتایج متفاوتی حاصل شده است. برخی تأثیر

مثبت فعالیت بدنی را تأیید کرده و برخی تغییری در میزان بیان ژن دکورین مشاهده نکرده‌اند. هینیمر و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای افزایش بیان ژن دکورین را در پاسخ به فعالیت ورزشی نشان دادند و بیان کردند که دکورین می‌تواند در سازگاری با فعالیت ورزشی نقش اصلی داشته باشد (۲۸). درحالی‌که سالیوان و همکاران (۲۰۰۸) تغییری در میزان بیان ژن دکورین پس از فعالیت مقاومتی متوسط مشاهده نکردند (۲۹). بنابراین، درخصوص بیان سازوکار فیزیولوژیکی تأثیر تمرینات ورزشی بر میزان بیان ژن دکورین، به‌نظر می‌رسد عوامل مداخله‌گری مانند شدت و مدت فعالیت ورزشی، آسیب عضلانی، نوع آزمودنی‌ها، روش بررسی بیان ژن و نوع بافت مورد نظر (تاندون و عضله) می‌تواند دلیل تفاوت مطالعات انجام‌شده باشد. دکورین مانند تنظیم‌کنندهٔ اتوکرین و پاراکرین بر رشد تومور تأثیر می‌گذارد و می‌تواند مانند عامل ضدتومور مؤثر عمل کند (۳۰). به‌علاوه نشان داده شده است که دکورین بیان ژن TGF-β و سنتز پروتئین آن را طریق رقابت با گیرندهٔ ژن TGF-β نیز مهار می‌کند (۳۱،۳۲). بنابراین، هم‌راستا با پژوهش‌های پیشین درجهت اثرگذاری دکورین بر رشد و تکثیر تومور، نتایج مطالعهٔ ما نیز نشان داد که این روند کاهش حجم و رشد تومور ازطریق کاهش میزان بیان ژن TGF-β در پاسخ به تمرین هوازی تناوبی در گروه ورزش به همراه تومور احتمالاً می‌تواند ناشی از افزایش در میزان بیان ژن دکورین بافت عضلهٔ سولئوس باشد. بنابراین، احتمال می‌رود که هشت هفته فعالیت هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور ازیک‌طرف با افزایش بیان ژن دکورین و ازطرف دیگر با کاهش بیان ژن TGF-β در کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان درگیر است و در نتیجه احتمال اثر مثبت فعالیت ورزشی در بازداری از رشد تومور در سرطان پستان وجود دارد. هرچند در این مطالعه به‌علت عدم استفاده از کیت آنتاگونیست دکورین و بررسی سطح پروتئین دکورین نمی‌توان به‌طور قطع کاهش در رشد و تکثیر تومور را تنها به تأثیر دکورین مربوط دانست. بنابراین، پیشنهاد می‌کنیم که برای مطالعات آینده در جهت بررسی دقیق و مؤثر نقش دکورین بر رشد و تکثیر تومور، از آنتاگونیست و سطح پروتئین دکورین استفاده شود.

نتیجه‌گیری

براساس نتایج به‌دست‌آمده در هشت هفته تمرین هوازی تناوبی قبل و بعد از کاشت تومور، که به افزایش بیان ژن دکورین و کاهش بیان ژن TGF-β منجر شده است و در مقابل کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان را نتیجه داده است، این امر، امکان وجود ارتباط بین تغییرات بیان ژن دکورین و TGF-β با رشد تومور را بیان می‌کند. ازطرفی، نتایج این مطالعه، اثر مثبت و نقش حفاظتی این مدل تمرین را در کاهش روند رشد حجم تومور در سرطان پستان تأیید کرده است.

تقدیر و تشکر

مقالهٔ حاضر حاصل بخشی از رسالهٔ دکتری به شمارهٔ ثبتی ۴۰۱۴۷۰۰ از دانشگاه خوارزمی است. نویسندگان از همکاری مسئولان انستیتو سرطان دانشگاه علوم پزشکی تهران نیز تشکر می‌کنند.

منابع

1. Goh, J., Endicott, E., Ladiges, W.C. (2014). Pre-tumor exercise decreases breast cancer in old mice in a distance-dependent manner. American Journal of Cancer Research. 4(4):378-84.
2. Shiri, S., Alizadeh, A.M., Baradaran, B., Farhanghi, B., Shanehbandi, D., Khodayari, S., Tavassoli, A. (2015). Dendrosomal curcumin suppresses metastatic breast cancer in mice by changing m1/m2 macrophage balance in the tumor microenvironment. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 16(9):3917-22.
3. Chen, X., Lu, W., Zheng, W., Gu, K., Matthews, C. E., Chen, Z.,Zhenj,Y., Shu, X.-O. (2011). Exercise after diagnosis of breast cancer in association with survival. Cancer Prevention Research, canprevres. 4(9):1409-18.
4. Loprinzi, P.D., Cardinal, B.J., Winters-Stone, K., Smit, E., Loprinzi, C.L. (2012). Physical activity and the risk of breast cancer recurrence: a literature review. Paper Presented at the Oncology Nursing Forum. 39(3):269-74.
5. Pedersen, B.K., Febbraio, M.A. (2008). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. Physiological Reviews. 88(4):1379-406.
6. Raschke, S., Eckardt, K., Bjørklund, H.B., Jensen, J., Eckel, J. (2013). Identification and validation of novel contraction-regulated myokines released from primary human skeletal muscle cells. PloS one. 8(4):e62008.
7. Karstoft, Kristian, Pedersen, Bente K. (2016). Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 19(4):270-5.
8. Henningsen, J., Rigbolt, K.T., Blagoev, B., Pedersen, B.K., Kratchmarova, I. (2010). Dynamics of the skeletal muscle secretome during myoblast differentiation. Molecular & Cellular Proteomics. 9(11):2482-96.
9. Li, Yong, Li, Juan, Zhu, Jinghong, Sun, Bin, Branca, Maria, Tang, Ying, Huard, Johnny. (2007). Decorin gene transfer promotes muscle cell differentiation and muscle regeneration. The American Society of Gene Therapy. 15(9):1616-22.
10. Bi, X.L., Yang, W. (2013). Biological functions of decorin in cancer. Chinese Journal of Cancer. 32(5):266-9.
11. Sofeu Feugaing, D.D.S., Götte, M., Viola, M. (2012). More than matrix: the multifaceted role of decorin in cancer. European Journal of Cell Biology. 92(1):1-11.
12. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., Troup, S., Hiller-Hitchcock, T., Murphy, L.C., Roughly, P.J., Watson, P.H. (2000). Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. The Journal of Pathology. 192(3):313-20.
13. Imamura, T., Hikita, A., Inoue, Y. (2012). The roles of TGF-β signaling in carcinogenesis and breast cancer metastasis. Breast Cancer. 19(2):118-24.
14. Bedford, T.G., Tipton, C.M., Wilson, N.C., Oppliger, R.A., Gisolfi, C.V. (1979). Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. Journal of Applied Physiology. 47(6):1278-83.
15. Leandro, C.G., Levada, A.C., Hirabara, S.M., Manhães-de-Castro, R.De- Castro, C,B., Curi, R., Pithon-Curi, T.C. (2007). A program of moderate physical training for Wistar rats based on maximal oxygen consumption. Journal of Strength and Conditioning Research. 21(3):751-6.
16. Isanejad, A., Alizadeh, A.M., Amani Shalamzari, S., Khodayari, H., Khodayari, S., Khori, V., Khojastehnejad, N. (2016). MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. Life Sciences. 151(15):30-40.
17. Khori, V., Amani Shalamzari, S., Isanejad, A., Alizadeh, A.M., Alizadeh, S., Khodayari, S., Khodayari, H., Shahbazi,S.,Zahedi, A., Sohanaki, H,. Khaniki, M., Mahdian, R., Saffari, M., Fayad, R. (2015). Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. European Journal of Pharmacology. 765:179-187.
18. Farhanji, B., Latifpour, M., Alizadeh, A.M., Khodayari, H., Khodayari, S., Khaniki, M., Ghasempour, S. ,(2015). Tumor suppression effects of myoepithelial cells on mice breast cancer. European Journal of Pharmacology. 765:171-8.
19. Farsinejad, S., Rahaie, M., Alizadeh, A.M., Mir-Derikvand, M., Gheisary, Z., Nosrati, H., Khalighfard, S. (2016). Expression of the circulating and the tissue microRNAs after surgery, chemotherapy, and radiotherapy in mice mammary tumor. Tumor Biology. 37(10):14225-34.
20. Betof, A.S., Dewhirst, M.W., Jones, L.W. (2013). Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: a translational perspective. Brain, Behavior, and Immunity. 30:75-87.
21. آقاعلی‌نژاد، حمید.، هفت‌چناری، شیما.، متین‌همایی، حسن. (۱۳۹۳) اثر یک دوره تمرینی استقامتی بر سطح IL-8 سرم و حجم تومور در موش‌های حامل تومور پستان. غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران. ۱۶(۱): ۳۲-۲۶.
22. میراخوری، زهرا.، کردی، محمدرضا.، علیزاده، شعبان.، گائینی، عباسعلی.، آقاعلی‌نژاد، حمید.، انوشه، لیلا.، امانی شلمزاری، صادق.، امینی، اشرف. (۱۳۹۴). بررسی اثر پیشگیرانه و کمک‌درمانی تمرین هوازی بر نسبت رشد تومور، E2 و بیان mir-206 و Erα بافت تومور سرطان پستان. فیزیولوژی ورزشی کاربردی.۱۱(۲۲): ۹۸-۸۷
23. Murphy, E.A., Davis, J.M., Barrilleaux, T.L,, McClellan, J.L., Steiner, J., Carmichael, M.D., Pena, M.M., Hebert, J,R., Green, J.E. (2011). Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. Cytokine. 55(2):274-9.
24. Moses, H., Barcellos-Hoff, M H. (2011). TGF-β biology in mammary development and breast cancer. cold spring harbor perspectives in biology. 3(1): a003277.
25. Derynck, R., Akhurst, R.J., Balmain, A. (2001). TGF-β signaling in tumor suppression and cancer progression. Nature Genetics. 29(2):117-29.
26. Chamani, R., Asghari, S.M., Alizadeh, A.M., Eskandari, S., Mansouri, K., Khodarahmi, R., Taghdir, M., Heidari, Z., Gorji, A., Aliakbar, A., Ranjbar, B., Khajeh, H. (2015). Engineering of a disulfide loop instead of a Zn binding loop restores the anti-proliferative, anti-angiogenic and anti-tumor activities of the N-terminal fragment of endostatin: Mechanistic and therapeutic insights. Vascular pharmacology. 72:73-82.

27. Arteaga, C.L. (2006). Inhibition of TGFβ signaling in cancer therapy. Current Opinion in Genetics & Development. 16(1):30-7.
28. Heinemeier, K.M., Bjerrum, S.S., Schjerling, P., Kjaer, M. (2013). Expression of extracellular matrix components and related growth factors in human tendon and muscle after acute exercise. Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports. 23(3). e150-61.
29. Sullivan, B.E., Carroll, C.C., Jemiolo, B., Trappe, S.W., Magnusson, S.P., Dossing, S., Kjear, M., Trappe, T.A. (2009). Effect of acute resistance exercise and sex on human patellar tendon structural and regulatory mRNA expression. Journal of Applied Physiology. 106(2):468-75.
30. Csordas, G., Santra, M., Reed, C.C., Eichstetter, I., McQuillan, D.J., Gross, D., Nugent. M.A., Hajnoczky, G., Iozzo, R.V. (2000). Sustained down-regulation of the epidermal growth factor receptor by decorin a mechanism for controlling tumor growth in vivo. Journal of Biological Chemistry. 275(42):32879-32887.
31. Isaka, Y., Brees, D.K., Ikegaya, K., Kaneda, Y., Imai, E., Noble, N.A., Border, W.A. (1996). Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. Nature Medicine. 2(4):418-23.
32. Stander, M., Naumann, U., Dumitrescu, L., Heneka, M., Loschmann, P., Gulbins, E., Dichgans, J., Weller, M. (1998). Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-β synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo. Gene Therapy. 5(9): 1187–94.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی