Sport and Biomotor Sciences
ورزش و علوم زیست حرکتی

بررسی پاسخ سریال زمانی microRNA-1 به تمرین مقاومتی در عضلات اسکلتی کند و تند انقباض رت‌های نر نژاد ویستار

محمد فتحی[1]، رضا قراخانلو*[2]، مسعود سلیمانی[2]، حمید رجبی[3]، راضیه رضایی[4]

۱- استادیار دانشگاه لرستان

۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیاردانشگاه خوارزمی

٤- دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید چمران

* نشانی نویسنده مسئول: تهران، تقاطع بزرگراه چمران و جلال ال احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی

Email: ghara_re@modares.ac.ir

وصول: ۹۲/۱۰/۲۲ اصلاح: ۹۲/۱۱/۱ پذیرش: ۹۲/۱۱/۹

چکیده

مقدمه و هدف: microRNAs (miRs) در فرآیندهای مختلف سلولی درگیرند و بیان ژن را مهار می‌کنند. یکی از این miRs microRNA-1 (miR-1) است که ویژه بافت عضله است و میزان آن با هایپرتروفی عضلانی کاهش می یابد؛ با توجه به پاسخ متفاوت عضلات تند و کند به تمرین مقاومتی، هدف این مطالعه ارزیابی اثر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضلات اسکلتی کند و تند انقباض رت‌های نر نژاد ویستار است.

روش‌شناسی: نمونه‌هایی این مطالعه بنیادی ۱۵ سر رت بودند که به صورت تصادفی به گروه تمرینی (۱۰سر) و کنترل (۵ سر)تقسیم شدند. گروه تمرینی یک جلسه تمرین مقاومتی (صعود از نردبان یک متری، ٤ست با ۵ تکرار) را اجرا کرد، سپس ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی همراه با گروه کنترل بی‌هوش و تشریح شدند، عضله‌ی نعلی و عضله بازکننده دراز انگشتان (EDL) - به ترتیب به عنوان عضله کند و تند انقباض- جدا شدند. از روش Real time RT-PCR برای اندازه‌گیری میزان بیان miR-1 استفاده شد و در پایان از آزمون آماری t تک نمونه‌ای و t مستقل استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که میزان بیان miR-1 عضله EDL در پاسخ به یک جلسه تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری ۳ ساعت (P<۰/۰۰۰۱) و ٦ ساعت (P<۰/۰۰۱) بعد از تمرین مقاومتی به ترتیب ۹۹ و ۷۳ درصد کاهش می‌یابد. در حالیکه بیان miR-1 در عضله نعلی در ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی به ترتیب ٤۰ درصد کاهش (P< ۰/۳۲۳)و سپس ۲۲٤ درصد افزایش داشت که این تغییرات معنی دار نبودند (P<۰/۱۹٦).

بحث و نتیجه‌گیری: یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود که احتمالا نشان دهنده فعال سازی فرآیند تکثیر در سلول‌ها عضله EDL در اثر تمرین مقاومتی باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین مقاومتی، عضله بازکننده دراز انگشتان، عضله نعلی، microRNA-1

مقدمه

microRNAs یا miRs، RNA غیرکدی کوچکی هستند، که در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند رشد، تکامل، تکثیر، تمایز و همچنین بیماری‌ها (۱) از زمان آغاز حیات تا مرگ (۲) درگیرند برخی از این miRs خاص عضله هستند و در بافت‌های دیگر بیان نمی‌شوند؛ بنابراین آن‌ها را myomiR می‌گویند (۳)، که عبارتند از؛ miR-1، خانواده miR-133a miR-133b، miR-206، خانواده

miR-208a - miR-208b و miR-499 (۱, ٤). miRs در پایین دست ژن‌های هدف خود را سرکوب می‌کنند (۱, ۵).

miR-1 همراه با miR-133 بر روی یک ژن بیسیسترونی (قطعه از DNA که اطلاعات دو ژن روی آن قرار دارد و با هم رونویسی می شوند) قرار دارند که با هم رونویسی می‌شوند (٦). miR-1 دارای دو همولوگ miR-1-1 و miR-1-2 است که در نوع نوکلئوتید با هم تفاوتی ندارند تنها تفاوت آن‌ها به محل قرارگیری آن‌ها در روی کروموزوم‌ها برمی‌گردد که به ترتیب در موش‌ها بر روی کروموزوم شماره ۲ و ۱۸ قرار دارند (۱). miR-1 ۲۱ نوکلئوتید طول دارد که توالی آن به صورت UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA است (۱). ژن‌های هدف miR-1 عبارتند از Hand2 (درگیر در تکثیر سلول‌ها)، lrx5, KCND2 (کنترل هدایت پذیری سیگنال‌های قلب)، HDAC4 (درگیر در عضله‌زایی) و Delta (عضله‌زایی در قلب)(۱). میزان بیان miR-1 در اثر برخی ناهنجاری‌های عضلانی تغییر می کند (۸, ۷).

پژوهش‌ها نشان داده است که فعالیت‌های بدنی بر بسیاری از فرآیندهای سلولی مولکولی (۱۰, ۹) تاثیر می‌گذارد، اما تعداد پژوهش‌ها در این حوزه بر روی myomiRs (۱۵–۱۱)، و miRs که ویژه عضلات نیستند انگشت شمار است (۱۷, ١٦). با این وجود همین تعداد پژوهش نشان می‌دهد که هم فعالیت بدنی بر بیان miRs اثر می‌گذارد (۱۵) و هم تغییر در miRs موجب ایجاد سازگاری‌های ناشی از فعالیت بدنی می‌شود (١٤, ۱۱)، در پژوهش‌های کلر (۱۸) و قراخانلو (منتشر نشده) تاثیرپذیری miRs از فعالیت بدنی تایید شده است.

اما در مورد miR-1 مک‌کارتی و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که در اثر یک دوره اضافه‌بار عملکردی در عضلات نعلی و پلانتاریس میزان بیان آن به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۱). اما در تحقیق درآموند (Drummond) و همکارانش (۲۰۰۸) مشخص شد که میزان بیان آن در ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین در نمونه‌های انسانی جوان کاهش می یابد، اما در نمونه‌های مسن‌تر تغییر معنی‌داری نداشت، هرچند علاوه بر متغیر مستقل فعالیت بدنی در این تحقیق مصرف اسیدهای آمینه شاخه‌دار نیز تجویز شد (۱۳). در پژوهش دیگری گزارش شد که یک جلسه تمرین استقامتی باعث افزایش بیان معنی‌دار miR-1 در عضلاتی می‌شود که در معرض تمرین قرار داده می‌شوند (۱۷). نیلسن در نمونه‌های انسانی مشاهده کرد که بیان miR-1 در بلافاصله و ۲٤۰ دقیقه پس از یک جلسه تمرین استقامتی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد اما در ٦۰ دقیقه بعد از تمرین به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد این در حالی بود که بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی این روند مقداری متفاوت بود به این صورت که میزان بیان miR-1 در همان زمان‌های ذکر شده، تحت تاثیر همان جلسه حاد استقامتی قرار نمی‌گیرد (١٤).

همانطور که ذکر شد miR-1 در عضلات نقش تعیین‌کننده‌ای در تمایز عضلات دارد که با سرکوب فاکتور HDAC4 (٦) زمینه را برای افزایش تمایز (۱۹) فراهم می‌آورد رخدادی که بر اثر تمرینات مقاومتی به وقوع می‌پیوندد (۲۰)، مجموعه این رویدادها موجب تغییرات متناسب با تمرین در عضلات تند و کند می شود. ضمن اینکه می دانیم پاسخ عضلات تند و کند به فعالیت‌های مقاومتی متفاوت است احتمالا miR-1 در این فرآیند نقش محوری را ایفا کند اما هنوز پژوهشی تغییرات آن را تحت تاثیر فعالیت مقاومتی حاد بررسی نکرده است بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر یک جلسه حاد تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضلات تند و کند انقباض است.

روش‌شناسی

۱۵ سر رت نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن (۱۲±۱۱۳گرم) از انستیتو پاستور تهیه شد. برای همه آن‌ها شرایط مناسب (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص

موش، چرخه تاریکی و روشنایی۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما ۳±۲۲ درجه سانتی گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت‌مدرس تا رسیدن به سن بلوغ فراهم شد. در پایان این دوره سن رت‌ها به ۹ هفته رسید. در این مدت رت‌ها در ۳ قفس (۵ رت در هر قفسه) یکسان نگهداری شدند.

سپس دوره آشناسازی رت‌ها با تمرینات مقاومتی آغاز شد که این دوره یک هفته (سه جلسه) به طول انجامید. در جلسه اول رت‌ها با وزنه‌ای به میزان ۱۰ درصد وزن خودشان که به دمشان وصل بود از نردبانی به ارتفاع ۱ متر (۲۶ پله) با شیب کمتر از شیب اصلی، سه بار بالا می رفتند و سپس در جلسات دوم و سوم همین بار و تکرار در نظر گرفته شد، اما زاویه نردبان به ۸۵ درجه افزایش یافت. در پایان این دوره، رت‌ها به صورت تصادفی به ۲ گروه (۵ سر به عنوان گروه کنترل و ۱۰سر دیگر به عنوان گروه تمرینی) تقسیم شدند که گروه تمرینی یک جلسه تمرین مقاومتی (صعود از یک نردبان یک متری با ۲۶ پله و زاویه ۸۵ درجه) با ٤ست، ۵ تکرار،۳۰ثانیه استراحت بین تکرارها و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها را اجرا کرد(۲۱). برای تعیین بار اولیه، ابتدا وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و بار اولیه، ۵۰ درصد وزن هر رت در نظر گرفته شد. در ادامه، در ابتدای اجرای هر ست ۱۰ درصد وزن رت به بار اولیه اضافه می شد به طوری که هر رت در پایان ست چهارم ۸۰ درصد وزن خود را از نردبان بالا می برد (۲۲).

از آنجایی که برخی پژوهش‌ها اندازه گیری بیان miR-1 را در دو زمان ۳ و ٦ ساعت بعد از اعمال تمرین گزارش کرده‌اند (۱۳)، رت‌های گروه تمرینی به طور تصادفی به دو دسته تقسیم شدند که یک گروه ۳ ساعت و گروه دیگر ٦ ساعت پس از جلسه تمرین مقاومتی حاد به صورت زیر تشریح شدند. با رعایت مسائل اخلاقی ابتدا حیوانات با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هرکیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) بیهوش شدند. بعد از بی هوشی کامل (به طوری که رت‌ها به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، عضله نعلی (عضله کند) و EDL (عضله تند) تحت شرایط استریل خارج شد و با نیتروژن مایع فریز و تا شروع هموژن کردن بافت‌ها، همه آن‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA از بافت

برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی‌لیتر ترایزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژکردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد سپس ۲/ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتر دار کار شد) سپس ۵/ میلی‌لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماندند (overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ مجددا سانتریفیوژ شدند که در این مرحله یک رسوب سفید رنگ در ته اکثر میکروتیوب ها قابل مشاهده بود. با سمپلر (شرکت eppendorff) مایع رویی با دقت خارج شد و ۱ میلی لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک شود، بعد از این مرحله ۵۰ لاندا آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند با به آرامی پیپتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر

(شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه ها بین ۱.٦ تا ۱.۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نورUV) انجام می شد، غیر از مراحلی که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد سانتریفیوز و یا ورتکس شوند. در طی مراحل از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده می‌شد و به محض نیاز به تعویض دستکش‌ها تعویض می شدند. کیت‌ها دقیقا قبل از استفاده از یخچال ۲۰- خارج می شدند و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل می شدند. تمام سمپلرها طبق زمانبندی‌های گروه کالیبره شده بودند.

سنتز cDNA

برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت Exiqon با Cat # 203300 استفاده شد. و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت eppendorff بود.

ارزیابی بیان ژن

برای ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت Applied Biosystem استفاده شد. SYBR Green master mix استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت Exiqon با Cat # 203450 بود. طبق دستورالعمل کیت برای یک نمونه ۱۰ لاندای ترکیبی از master mix (۵ لاندا) پرایمر (۱ لاندا) و cDNA (٤ لاندا) در نظر گرفته شد و میزان بیان miR-1 با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد. در هر Run یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی master mix (طبق دستورالعمل شرکت Applied Biosystem نباید CT آن کمتر از ۳۵ باشد) در نظر گرفته شد. و کنترل داخلی (U6)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و miR-1 همزمان (در یک Run واحد) ارزیابی شد. نمونه‌ها به صورت دوتایی (duplicate) ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه میانگین آنها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود که test مجددا تکرار شود که در صورت نیاز تست تکرار می شد. در صورتی که CT پرتی مشاهده می شد همراه با نمونه کنترل آن از تحقیق حذف می شدند. بعد از انتقال اطلاعات به نرم افزار Excel طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ میزان بیان miR-1 محاسبه شد(۲۳).

مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است. پرایمرهای miR-1 و رفرنس آن (Housekeeping) U6 از شرکت Exiqon تهیه شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمرmiR-1 و کنترل داخلی آن

miR-1	205104 rno-miR-1, LNA™ PCR primer set, UniRT .miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set.
U6	203907, U6 snRNA (hsa, mmu, rno) PCR primer set, UniRT. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set. NCBI Symbol U6snRNA, NCBI Accesion: x59362

تجزیه وتحلیل داده‌ها

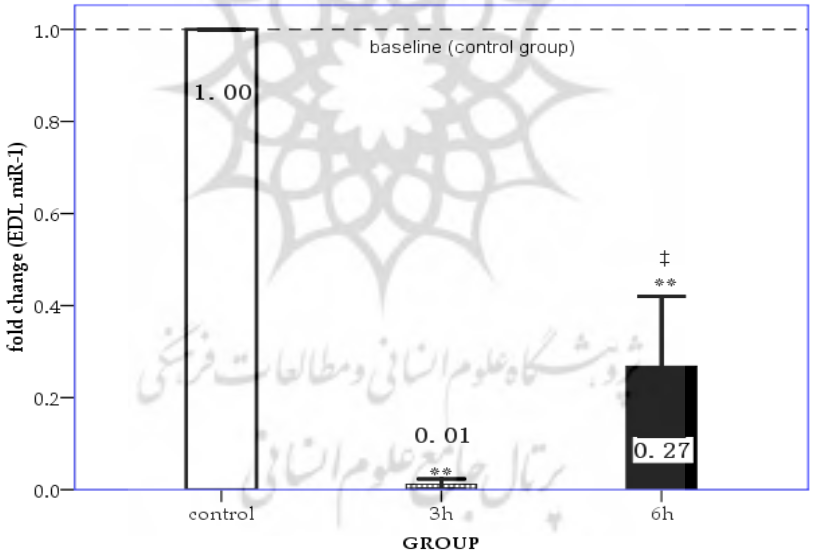
با انتقال داده‌ها به نرم افزار SPSS ابتدا داده‌های پرت مشخص و همراه با نمونه کنترل آن حذف شدند (عضلات EDL و نعلی هرکدام در ساعت ۳ یک داده پرت داشتند، بنابراین در ساعت ۳ برای هر عضله ٤ آزمودنی باقی ماند) سپس نرمال بودن آن‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزیابی شد نتایج این آزمون نشان داد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند.

سپس با استفاده از آزمون Levene مساوی بودن واریانس‌ها ارزیابی شد. نتایج این آزمون نشان داد که

واریانس داده‌ها در عضلات نعلی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند اما واریانس داده‌ها در عضله EDL با هم اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰٤) داشتند. از آزمون آماری t یک نمونه برای تعیین اختلاف گروه‌های تجربی (۳ و ٦ ساعت پس از تمرین) با گروه کنترل استفاده شد. در ادامه از آزمون t مستقل برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌های تجربی (میانگین‌ها ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین) با همدیگر استفاده شد. برای عضله EDL، مقدار t برای داده‌ها با "واریانس نابرابر" در نظر گرفته شد. کلیه اعمال تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS16 و Excel 2007 انجام شد.

نتایج

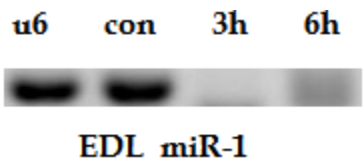
در پایان مرحله نگهداری رت‌ها و آغاز اعمال تمرین مقاومتی، میانگین و انحراف استاندارد وزن آن‌ها به ۲۲/٦±۲۳٤/٦ گرم رسید. نتایج آزمون t (t=-۱۸٦/۷٤۰) یک نمونه‌ای نشان داد که بیان miR-1 عضله EDL نسبت به گروه کنترل در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری کاهش می یابد (P<۰/۰۰۰۱)، و مقدار t (t=-۹/۵) ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی همچنان کاهش معنی‌داری را در سطح P<۰/۰۰۱ نشان داد، به این معنی که مقادیر بیان miR-1 به ترتیب به میزان ۹۹ و ۷۳ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (شکل ۱). همچنین مقادیر t مستقل نشان داد (t=-۳/۳۲) که بین گروه ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی در عضله EDL تفاوت معنی‌داری در سطح P<۰/۰۲۹ وجود دارد، به این معنی که میزان بیان miR-1 ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری پایین‌تر از میزان بیان آن در ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی بود



شکل ۱. تاثیر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 عضله EDL در گروه ۳ و ٦ ساعت پس جلسه تمرین در مقایسه با گروه کنترل

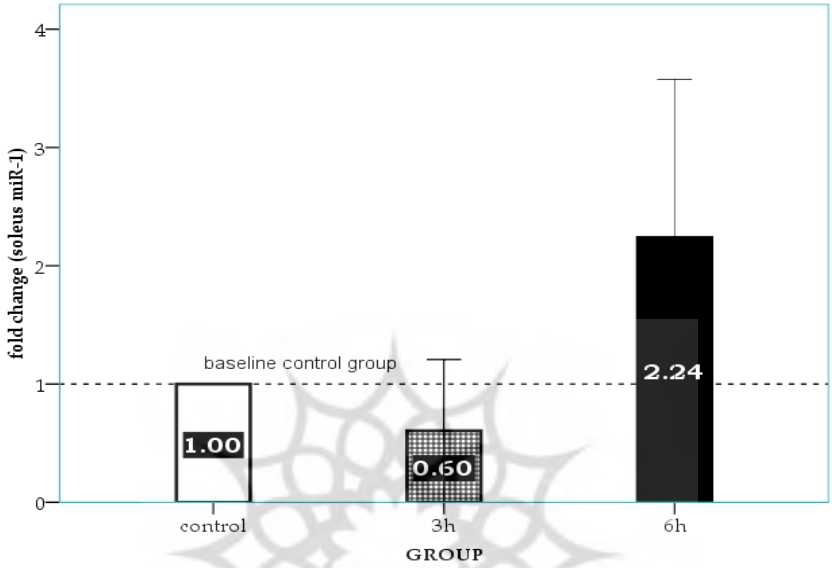
** معنی‌داری بودن تفاوت میانگین گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل در سطح (P<۰/۰۱)

‡ معنی‌داری بودن تفاوت میانگین دو گروه تجربی (۳ و ۶ ساعت)

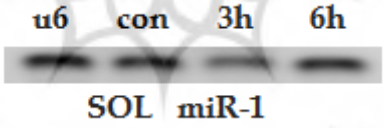


شکل ۲. نمایش محصول PCR miR-1 عضله EDL که با استفاده از u6 (سمت چپ) به عنوان کنترل داخلی نرمال شده‌اند گروه کنترل(con)، ۳ساعت پس از تمرین (3h) و ٦ ساعت پس از تمرین (6h)

اما یافته‌ها در مورد عضله کند انقباض یعنی نعلی متفاوت بود به این صورت که آزمون t (t= -۱/۱۸۲) یک نمونه‌ای نشان داد بیان miR-1 عضله نعلی نسبت به گروه کنترل در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی دچار تغییر معنی‌داری (P = ۰/۳۲۳) نمی‌شود. مقدار t (t=۱.۵۵۱) ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی همچنان غیر معنی‌داری (P = ۰/۱۹٦) بود. همچنین مقادیر t مستقل در عضله نعلی نشان داد (t= -۱/۷۱٦) که بین گروه ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. شکل ۵ نشان می دهد که روند تغییرات در این دو عضله متفاوت است.

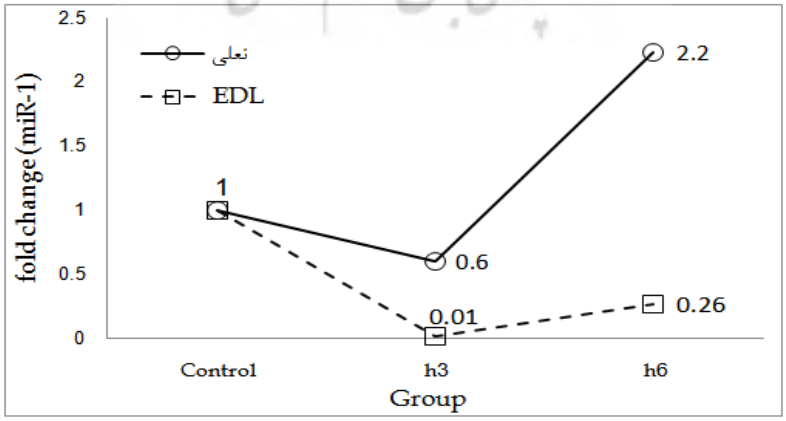


شکل ۳. تاثیر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 عضله نعلی در گروه ۳ و ٦ ساعت پس جلسه تمرین در مقایسه با گروه کنترل



SOL miR-1

شکل ٤. نمایش محصول PCR miR-1 عضله نعلی که با استفاده از u6 (سمت چپ) به عنوان کنترل داخلی نرمال شده‌اند گروه کنترل(con)، ۳ ساعت پس از تمرین (3h) و ٦ ساعت پس از تمرین (6h)



شکل ۵. روند تغییرات بیان miR-1 در گروه کنترل ۳ و ٦ ساعت پس از یک جلسه تمرین مقاومتی در عضله نعلی و EDL

بحث و نتیجه گیری

مهمترین یافته‌های این پژوهش نشان داد که در پاسخ به یک جلسه تمرین مقاومتی میزان بیان miR-1 در عضله EDL به طور معنی‌داری در ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی شدیدا کاهش یافت به طوری که این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار شد، همچنین مشخص شد که بیان miR-1 در ۳ و ٦ ساعت پس از تمرین مقاومتی با هم اختلاف معنی‌داری دارند به این معنی که کاهش ۹۹ درصدی در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به ۷۳ درصد در ٦ ساعت رسید. در حالی که تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضله نعلی تاثیر معنی‌داری نداشت.

قبل از هرگونه بحث، ابتدا باید فرآیند سازگاری و پاسخ miR-1 به تمرینات ورزشی را جداگانه بررسی کنیم. سازگاریی که در miR-1 نسبت به تمرینات قدرتی رخ می دهد عمدتا به صورت عدم تغییر (۱۵) یا کاهش(۱۱) و کاهش در اثر تمرینات استقامتی(١٤) است. پاسخ miR-1 به تمرینات مقاومتی و استقامتی به این صورت است که miR-1 در پاسخ به یک جلسه حاد تمرین مقاومتی کاهش می‌یابد البته این برنامه تمرینی همراه با مصرف اسیدهای آمینه شاخه‌دار بود (۱۳) لذا نمی‌تواند تاثیر صرف تمرینات مقاومتی باشد. اما در پاسخ به یک جلسه تمرین استقامتی میزان آن افزایش می‌یابد (١٤, ١٧). فعالیت‌های بدنی بلند مدت موجب القای برنامه تبدیل تار می‌شود (٢٤). احتمال دارد که برنامه تبدیل تارها با بیان miR-1 در ارتباط باشد. همچنین دیده شده که در پاسخ به فعالیت مقاومتی حاد یکسان، miR-1 در افراد جوان کمتر از افراد مسن بیان می‌شود (۱۳). احتمال دارد این تفاوت ریشه در تغییر نوع تار داشته باشد که با افزایش سن رخ می‌دهد زیرا میزان تارهای تند انقباض با افزایش سن کاهش می‌یابد (۲۵). در این پژوهش دیده شد که میزان بیان miR-1 در تارهای کند تغییر معنی‌داری را تجربه نمی‌کنند در صورتی که در تارهای تند انقباض میزان آن شدیدا کاهش می‌یابد.

در آزمودنی‌های حیوانی (موش) مشخص شده که miR-1 در پاسخ به یک دوره اضافه بار عملکردی (قطع عضله همکار) ۷ روزه در عضلات نعلی و پلانتاریس کاهش می‌یابد (۱۱). که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد. مطالعه درآموند(۲۰۰۸) نشان داد که یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش بیان miR-1 عضله پهن جانبی افراد جوان ۳ و ٦ ساعت پس از پروتکل می‌شود اما در افراد پیر تاثیری بر بیان آن ندارد. این در حالی بود که میزان miR-1 استراحت افراد مسن بالاتر از افراد پیر بود(۱۳). سوسی (۲۰۱۱) در پژوهشی که بر روی رت‌ها انجام داد نشان داد که تمرینات استقامتی بلندمدت (۱۰ هفته شنا، ۵ روز در هفته) با شدت متوسط و بالا موجب کاهش بیان miR-1 در عضله قلب هر دو گروه می‌شود (۱۲). مطالعه مک‌کارتی (۲۰۰۷) نشان داد که تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله پلانتاریس و نعلی می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر در مورد عضله تند انقباض همخوانی اما در مورد عضله کند تناقض دارد (۱۱). با توجه به نتایج این مطالعه و همچنین مطالعات قبل به نظر می رسد که تاثیر فعالیت بدنی بر بیان miR-1 با فعال‌سازی برنامه تبدیل Myosin heavy chain (MHC) –زنجیره سنگین میوزین–، اعمال نوع تمرین ورزشی و نوع تارها ارتباط دارد.

miR-1 در زمان تمایز میوبلاست‌های اولیه و سلول‌های ماهواره‌ای به مقدار زیادی بیان می‌شود و موجب تمایز سلول‌های ماهواره‌ای می‌شوند و تکثیر آن‌ها را محدود می‌کند (۲۷). از طرف دیگر کاهش miR-1 موجب افزایش Histone Deacetylase 4 (HDAC4) – عامل سرکوب کننده تمایز– می‌شود، بنابراین افزایش miR-1 با تمایز سلول‌های عضله اسکلتی همراه است (۲) احتمالا کاهش آن به خصوص در عضله EDL نشانه‌ای از فعال‌سازی اولیه سلول‌های ماهواره‌ای، یعنی تکثیر این سلول‌ها باشد (۲۸) که این فرآیند ممکن است در تارهایی

که توانایی بالایی برای گرایش به سمت تارهای کند انقباض دارند، اتفاق بیفتد. زیرا برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرین مقاومتی موجب افزایش بیان تارهای نوع آهسته‌تر (MHC IIa) و در همان زمان کاهش بیان MHC IIb می‌شود، هرچند میزان MHC I تغییری نشان نداد (۲۹, ۳۰). از طرف دیگر تارهای عضله نعلی درصد بسیار بالایی از فیبرهای کند را دارا می باشد، بنابراین توانایی آن‌ها در تغییر و تبدیل تار محدود است احتمالا عدم تغییر miR-1 در این تارها ناشی از این خصوصیت باشد و بنابراین فرآیند تکثیر در این تارها در اثر تمرین مقاومتی به اندازه تارهای EDL فعال نشده است.

گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در عضلات کند و تند انقباض تحت تاثیر فعالیت های مقاومتی قرار می‌گیرند (۳۲, ۳۱). گیرنده‌های استیل‌کولین در پیوندگاه عصبی عضلانی (۳۳) از جمله اهداف miR-1 محسوب می‌شود. miR-1 به وسیله جفت کردن تغییر فعالیت عضلانی با تغییر در عملکرد سیناپسی موجب تنظیم کارکرد سیناپسی می‌شود (۳۳). با توجه به نتایج این پژوهش و پژوهش‌های که اشاره شد به نظر می‌رسد در سطح بیان ژن فعالیت مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود در نتیجه کاهش miR-1 فرصتی است برای افزایش گیرنده‌های استیل‌کولینی (میزان این گیرنده‌ها با کاهش miR-1 (۳۳) که در اثر تمرینات مختلف ورزشی افزایش می یابند). همچنین دیده شده که کاهش میزان miR-1 با افزایش MEF2 همزمان است که از این طریق حلقه ارتباطی بین عصب و عضله با miR-1/MEF2 حفظ می‌شود (۳٤, ۳۳). علاوه بر فعالیت‌های بدنی miR-1 در بسیاری از ناهنجاری‌های عضلانی (عضلات اسکلتی و قلبی) درگیر است (۳٦, ۳۵)

نتیجه گیری

یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود که احتمالا نشان دهنده فعال سازی فرآیند تکثیر در سلول‌ها عضله EDL باشد که آغازی است بر تجدید ساختار این نوع عضله در پاسخ به تمرین مقاومتی. اما روند تغییر بیان آن در عضله نعلی متفاوت است.

تقدیر و تشکر

از تمام دوستانی که در انجام این پژوهش کمک کردند صمیمانه تشکر می‌شود و همچنین از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تامین اعتبارات این پژوهش سپاسگزاریم. مجوز این پژوهش با شماره ۶۰/۷۹۶۵۰-۱۳۹۰/۹/۱۳ درکمیته پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تصویب و ثبت شد

منابع

1. Van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. Trends in Genetics 2008;24(4):159-66.

2. Chen JF, Callis TE, Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. Journal of Cell Science 2008;122(1):13-20.

3. McCarthy JJ. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. Exerc Sport Sci Rev 2011;39(3):150-4.

4. Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev Cell 2009;17(5):662-73.

5. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. PLoS Biol 2004;2(11):363.

6. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu QL, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nature Genetics 2006;38(2):228-33.

7. Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. The FASEB Journal 2009;23(10):3335-46.

8. Da Costa MP, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. Cardiovasc Res 2012;93(4):563-72.

9. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. Heart 2012;98(1):5-10.

10. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists 2002;81(11): 40-51.

11. McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. Journal of Applied Physiology 2007;102(1):306-13.

12. Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. Physiol Genomics 2011;43(11):665-73.

13. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295(6): 1333-40.

14. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. J Physiol 2010; 588(20): 4029-37.

15. Davidsen PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, et al. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. Journal of Applied Physiology 2011;110(2):309-17.

16. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). Hypertension 2011; 58(2):182-9.

17. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57Bl/6J Male Mice. PLoS One 2009; 4(5): 5610.

18. Keller P, Vollaard NB, Gustafsson T, Gallagher IJ, Sundberg CJ, Rankinen T, et al. A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. J Appl Physiol. 2011;110(1):46-59.

19. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. Development 2007; 134(23): 4131-40.

20. Adams G. The Molecular Response of Skeletal Muscle to Resistance Training. Deut Z Sportmed 2010;61(3):61-7.

21. Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. J Exercise Physiol on line 2003;6:80-7.

22. Godfrey J, Kayser B, Gomez G, Bennett J, Jaque S, Sumida K. Interrupted Resistance Training and BMD in Growing Rats. International Journal of Sports Medicine 2009; 30(8): 579-84.

23. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 2001;25(4):402-8.

24. O'Neill DS, Zheng D, Anderson WK, Dohm GL, Houmard JA. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. Am J Physiol 1999; 276(2): 414-9.

25. Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, Harridge SDR. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. The Journal of Physiology 2002;547(1):247-54.

26. Charge SBP. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. Physiological Reviews. 2004; 84(1): 209-38.

27. Chen JF, Tao YZ, Li JA, Deng ZL, Yan Z, Xiao XA, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. Journal of Cell Biology 2010;190(5):867-79.

28. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. J Appl Physiol 2001;91(2):534-51.

29. Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. J Appl Physiol 1993; 74(2):911-5.

30. Campos G, Luecke T, Wendeln H, Toma K, Hagerman F, Murray T, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. European

Journal of Applied Physiology 2002; 88(1-2):50-60.

31. Desaulniers P, Lavoie PA, Gardiner PF. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. Neuroreport.1998; 9(16):3549-52.

32. Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ, Meskaitis VJ, Volek JS, Nindl BC, et al. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. Muscle Nerve 2000; 23(10):1576-81.

33. Simon DJ, Madison JM, Conery AL, Thompson-Peer KL, Soskis M, Ruvkun GB, et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. Cell 2008; 133(5):903-15.

34. Naya FJ, Wu C, Richardson JA, Overbeek P, Olson EN. Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. Development.1999; 126(10):2045-52.

35. Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. Nat Struct Mol Biol 2011; 18(7):840-5.

36. Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. Neuromuscular Disord 2011; 21(2):81-8.

پژوهشگاه علوم انسانی و مطالعات فرهنگی
پرتال جامع علوم انسانی

The study of timing series response of microRNA-1 expression to resistance exercise in slow and fast muscles of Wistar male rats

Fathi M[1], Gharakanloo R[*2], Solimani M[2], Rajabi H[3], Rezai R[4]

1- Lorestan University
2- Tarbiat Modares University
3- Kharazmi University
4- Shahid Chamran University

Received: 12/01/2014 **Revised:** 21/01/2014 **Accepted:** 29/01/2014

*** Correspondence:**
Reza Gharakanlou, Physical Education Department, Humanity Faculty, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran.

Email:
ghara_re@modares.ac.ir

Abstract

Introduction and purpose: microRNAs (miRs) are involved in cellular different processes and inhibit gene expression. One of these miRs is microRNA-1 (miR-1) which is special in muscles-tissue and the rate of it decreases with muscular hypertrophy. Regarded to difference of slow and fast muscles to resistance exercise, the purpose of this study was to evaluate the effect resistance exercise (RE) on miR-1 expression in fast and slow skeletal muscles of Wistar male rats.

Materials and Methods: The subjects of this Fundamental study were15 rats that were randomly assigned to RE (n=10) or control groups (n=5); the RE group performed one session RE (climbing a 1-meter–long ladder with 4 set, 5rep), then 3 and 6 hours after RE with control group were anaesthetized and sacrificed, the soleus and Extensor digitorum longus (EDL) muscles -slow and fast twitch skeletal muscle respectively- were removed. The miR-1 expression rate was determined by Real time RT-PCR method. To analysis of dates the one sample t test and independent t test were used.

Results: The results showed that in response to RE, the expression of EDL miR-1 was significantly decreased 99 and 73 percent at 3 (P<.0001) and 6 hours (P<.0001) after exercise respectively. While the expression of soleus muscle miR-1 decreased by 40 percent (P<.323) and then increased 224 percent (P<.196) at 3 and 6 hours after RE respectively but these changes were not significant.

Discussion and Conclusion: one session RE induce decrease in miR-1 in EDL muscle, it is probably a sign of proliferation in EDL muscle.

Key words: Resistance exercise, EDL muscle, Soleus muscle, microRNA-1