

اثر تمرین هوازی بر استرادیول پلازما و بیان $ER\alpha$ و miR-206 موش‌های مبتلا به سرطان پستان

زهرآخوری: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

محمدرضا کردی*: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

عباسعلی گایینی: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

شعبان علیزاده: پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

لیلا انوشه: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

صادق امانی شلمزاری: فیزیولوژی ورزش، پژوهشگاه تربیت بدنی، تهران، ایران

اشرف امینی: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

مریم دلفان: فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تهران، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: حلقه بازخوردی بین $ER\alpha$ -miR-206 استرادیول به عنوان سازوکار نوین در سرطان پستان مطرح شده است. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر تمرین ورزشی هوازی بر روند تنظیمی این حلقه بازخوردی در موش‌های مبتلا به سرطان پستان وابسته به استروژن است.

روش بررسی: سلول‌های سرطانی MC4-L2 به ۲۰ سر موش بальب سی ماده (شش تا هشت هفته، میانگین وزن ۱۵-۱۴ گرم) به شکل زیرجلدی تزریق شدند، سپس نمونه‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی کنترل و تمرین تقسیم شدند. پس از آن، گروه تمرین به مدت شش هفته، پنج روز در هفته تمرینات هوازی (۱۸-۱۴ متر بر دقیقه) را انجام دادند. پس از پیدایش تومور، طول و عرض تومور با کولیس دیجیتالی هر هفته اندازه‌گیری شد. موش‌ها ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین قربانی شدند، نمونه‌های خونی و بافتی برداشته شد و در دمای $-70^{\circ}C$ درجه ذخیره شد. در ابتدا RNA تام با استفاده از تریزول استخراج شد و میزان بیان miR-206 و $ER\alpha$ بافت تومور به روش Real time-PCR و استرادیول پلازما با روش الیزا اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: سطوح استرادیول ($P=0/001$) و بیان $ER\alpha$ ($P=0/001$) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل کاهش و بیان miR-206 افزایش معنادار داشت ($P=0/001$). همچنین، حجم تومور در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل کاهش معناداری نشان داد ($P=0/037$).

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر افزایشی تمرین ورزشی هوازی بر بیان miR-206 و اثر کاهشی بر بیان $ER\alpha$ و کاهش سطوح استرادیول پلازما در موش‌های مبتلا به سرطان پستان، تمرین هوازی، این حلقه تنظیمی را به سمت کاهش تکثیر سلولی پیش می‌برد و می‌تواند به عنوان سازوکار نوین در بیان اثرات مثبت و کمک درمانی فعالیت ورزشی بر سرطان پستان در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان وابسته به گیرنده استروژن، تمرین هوازی، miR-206، استرادیول.

* نشانی نویسنده پاسخگو: تهران، کارگر شمالی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران، محمدرضا کردی.
نشانی الکترونیک: mrkordi@ut.ac.ir

مقدمه

سرطان یکی از مشکلات اصلی بهداشتی در سراسر جهان است و از مهم‌ترین علت‌های مرگ و میر در کودکان و بزرگسالان به شمار می‌رود. این بیماری در انواع مختلفی بروز می‌کند و حدود ۲۰۰ بیماری را شامل می‌شود (۱) که سرطان پستان یکی از مهم‌ترین موارد آن است. امروزه سرطان پستان، شایع‌ترین نوع سرطان در زنان و مهم‌ترین عامل تهدیدکننده سلامتی زنان است و در کشورهای غربی در حدود یک سوم از کل سرطان‌های مربوط به زنان را تشکیل می‌دهد (۲).

بسیاری از مطالعات فراگیر پیشنهاد می‌کنند، بین فعالیت ورزشی و سرطان پستان رابطه نزدیکی وجود دارد. اگر چه کمبود مطالعات تجربی کنترل شده که رابطه موجود و سازوکارهای درگیر را آزمایش کرده باشند، اساس وجود این رابطه را تضعیف می‌کند (۳). طی دهه گذشته به موضوع فعالیت ورزشی به عنوان درمان کمکی موثر برای حفظ و یا بهبود کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان پستان، توجه زیادی شده است. پژوهش‌های فراگیر اخیر نشان داده‌اند، تمرین هوازی به دنبال تشخیص سرطان پستان، می‌تواند با کاهش عوارض سرطان و در نهایت با کاهش مرگ و میر همراه باشد. در این زمینه، فعالیت بدنی بسته به شدت فعالیت، می‌تواند باعث تسریع و یا جلوگیری از پیشرفت سرطان پستان در جوندگان شود (۴). مدارک تجربی جدید نشان می‌دهد، شدت متوسط فعالیت بدنی، خطر مرگ و میر در سرطان پستان را کاهش می‌دهد (۵). همچنین تمرین‌های هوازی با کاهش حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان همراه بوده است (۶). بتوف تاثیر تمرین هوازی را به عنوان یک روش درمانی، در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی کرد (۷). نتایج نشان داد که رشد تومور در گروه‌هایی که فعالیت ورزشی انجام داده بودند، نسبت به سایر گروه‌ها تا دو برابر کمتر بود. با این که این نتایج نشان می‌دهد، فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند خاصیت ضد توموری برای بیماران مبتلا به سرطان پستان داشته باشد، ولی در این مطالعه نیز مانند پژوهش‌های دیگر، سازوکارهای مولکولی درگیر، مورد بررسی قرار نگرفته است و تنها به نتایج کیفی مانند میزان مرگ و میر و حجم تومور اشاره شده است.

در پاسخ به تحریک خارجی مانند تمرین ورزشی، بیان ژنی به‌وسیله سازوکارهای متفاوتی مانند، خاموش شدن بیان

ژن توسط میکرو RNA، می‌تواند تنظیم شود (۸،۹). miRNAs، RNAs غیرکدگذار کوچک هستند که بیان ژنی را از طریق از بین بردن مولکول‌های mRNA یا از طریق جلوگیری از ترجمه آنها تنظیم می‌کنند (۱۰-۱۲). بیش از ۵۰٪ ژن‌های miRNA در نواحی ژنومیک همراه سرطان قرار گرفته‌اند (۱۳)، بنابراین پیشنهاد شده miRNAs نقش مهمی در پاتوژنز انواع سرطان در انسان بازی می‌کند. در این میان، mir-206 رابطه نزدیکی با انواع سرطان‌ها دارد و با سرکوب بیان گیرنده آلفا استروژن (ERα) به عنوان سرکوب‌کننده تومور سرطان پستان عمل می‌کند (۱۴). mir-206 بیشتر در عضله اسکلتی و عضله قلبی بیان می‌شود و تمایز عضله را افزایش می‌دهد و در سطوح پایین در دیگر بافت‌ها از جمله سلول‌های پستان و بافت توموری پستان (۱۵) نیز بیان می‌شود. miR-206 عضوی از خانواده mir-1 ویژه عضله است و در موقعیت کروموزومی 6p12.2 قرار دارد. وجود حلقه بازخورد منفی در مطالعات نشان داده است، miR-206 و ERα یکدیگر را سرکوب می‌کنند (۱۵). از آنجایی که تاکنون پژوهشی که اثر فعالیت ورزشی بر mir-206 در نمونه‌های دارای سرطان پستان را مورد بررسی قرار دهد، انجام نشده است، پژوهش حاضر به منظور روشن شدن ارتباط بین فعالیت ورزشی، mir-206 و سرطان پستان انجام شده است.

از طرف دیگر استروژن‌ها به عنوان عامل خطر اصلی برای توسعه سرطان پستان پذیرفته شده‌اند. در همین ارتباط، یکی از عمده‌ترین استروژن‌های قابل بررسی، ۱۷-بتا استرادیول (استرادیول) است. استرادیول یک استروژن فعال است. چنان که غلظت بالای آن در سرم، یکی از نشانه‌های مهم سرطان پستان است (۱۶). چندین مطالعه فراگیر نشان داده‌اند، استرادیول پلاسما در زنان مبتلا به نئوپلازیا^۱ نسبت به افراد سالم بالاتر است و خطر ابتلا به سرطان پستان در زنانی که غلظت استرادیول بالایی دارند، بیشتر است (۱۶،۱۷). حال این سوال مطرح می‌شود که آیا فعالیت ورزشی می‌تواند میزان استرادیول پلاسما، بیان miR-206 و بیان گیرنده آلفای استروژن در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان را در بیماران مبتلا به سرطان پستان تغییر دهد و آیا می‌توان بخشی از خاصیت

^۱ Neoplasia

10% حل شد. سپس برای تعیین زنده مانده و شمارش سلولی به ترتیب از تریپان بلو و لام هماسیتومتر استفاده شد.

تزریق سلول و نحوه ایجاد تومور: در ابتدا سلول‌های مورد نظر در محیط آزمایشگاهی به منظور دستیابی به میزان معینی از سلول کشت داده شدند و پس از آن که تعداد سلول به اندازه مورد نیاز رسید، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر بافر PBS تهیه شد. سپس به هر موش بالبسی ماده پس از بی‌هوشی با دوز مناسب کتامین و زایلوزین (۱۰ میلی‌گرم به یک میلی‌گرم)، یک میلیون سلول به شکل زیر جلدی به ناحیه بالای ران سمت راست تزریق شد. در حدود دو هفته پس از تزریق، تومور در محل تزریق قابل لمس است.

پروتکل تمرین: در ابتدا پیش از تزریق سلول‌های سرطانی، یک هفته آشناسازی با محیط و تمرین بر روی نوآگردان، انجام شد. سپس موش‌ها به شکل تصادفی به دو گروه ۱۰ تایی تمرین و کنترل تقسیم شدند (جدول ۱). تمرینات به مدت شش هفته انجام شد. تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه شروع و در نهایت در دو هفته آخر پس از سرطانی شدن به ۱۸ متر در دقیقه رسید (۷۰-۵۵ درصد VO_{2max}) (۱۹). از آنجایی که در تمرین هوازی روی نوار گردان، شدت و مدت تمرین به راحتی تحت کنترل پژوهشگر می‌باشد، در پژوهش حاضر، از این نوع تمرین استفاده شد.

جدول ۱: پروتکل تمرین هوازی پیش بینی شده برای گروه تمرین پس از سرطانی شدن آزمودنی‌ها

دوره تمرین	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
یک هفته	۶-۱۰	۲۰	۵
دو هفته اول	۱۴	۲۵	۵
دو هفته دوم	۱۶	۳۰	۵
دو هفته سوم	۱۸	۳۰	۵

اندازه‌گیری حجم تومور: پس از تزریق سلول‌های سرطانی و پیدایش تومور، هر هفته حجم تومور محاسبه شد. برای اندازه‌گیری حجم تومور از فرمول جونز و همکاران $[V=1/2(L^2 \times W)]$ استفاده شد (۲۰). لذا

ضد توموری فعالیت ورزشی را به تاثیر آن بر میزان استرادیول پلازما، بیان miR-206 و بیان گیرنده آلفای استروژن نسبت داد. از آنجایی که در مورد آثار فعالیت ورزشی بر استرادیول پلازما، بیان miR-206 و بیان گیرنده آلفای استروژن در بیماران مبتلا به سرطان پستان پژوهشی انجام نشده است. در این پژوهش محققین تاثیر یک دوره تمرین استقامتی بر استرادیول پلازما، بیان miR-206 و بیان گیرنده آلفای استروژن در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان را مورد بررسی قرار داده است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و روش آن تجربی است که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام می‌شود.

آزمودنی‌ها: با توجه به پژوهش‌های پیشین (۱۸،۳)، تعداد ۲۰ سر موش بالب سی ماده (شش تا هشت هفته‌ای، میانگین توده بدنی ۱۵-۱۴ گرم) از موسسه پاستور خریداری شد و به حیوان‌خانه دانشگاه تهران منتقل شدند. برای تطابق فیزیولوژیک موش‌ها، دوره ۱۲ ساعته تاریکی روشنایی رعایت شد. دمای اتاق نیز بین درجه ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۵٪ حفظ شد. غذای حیوانات شامل آب و غذای معمول موش بود که به صورت آزاد و در اختیار^۲ تا پایان پروتکل در دسترس موش‌ها قرار گرفت.

کشت سلول: از رده سلول کارسینمای وابسته به استروژن MC4-L2 که هدیه دکتر لاناری از موسسه پزشکی آرژانتین بود (۱۹)؛ استفاده شد. سلول‌های MC4L2 در فلاسک T75 در محیط DMEM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی‌سلین ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ، استراپتومایسن ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و FBS ۱۰٪ مطابق مقاله امانی و همکاران (۱۸) کشت داده شدند. روند کشت بدین شکل بود که پس از پرکردن ۹۰٪ سطح فلاسک بوسیله سلول‌ها، مایع رویی برداشت شده و پس از شستشو با PBS، در مرحله بعد با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵٪ از کف پلیت سلول‌ها جدا شده و پس از خنثی‌سازی آنزیم با محیط حاوی FBS 10٪، همه محتویات فلاسک را داخل لوله فالکون ریخته و آن را در دور ۱۲۰۰ به مدت ۳-۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد، مایع روئی برداشته و پلاک سلولی، در داخل محیط حاوی FBS

² ad Libitum

استفاده کردیم. برای U6 از پرایمر جلویی 5'-GCGCGTCGTGAGGGTTC-3' و پرایمر برگشت، 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3' استفاده شد. برای GAPDH از پرایمر جلویی 5'-TCAACAGCAACTCCCACTCTTCC-3' و پرایمر برگشت 5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC-3' استفاده شد.

اندازه‌گیری استرادیول پلاسما: با استفاده از کیت الایزای Cayman chemical company با شماره‌ی کیت ۵۸۲۲۵۱-۱۷-بتااسترادیول پلاسما اندازه‌گیری شدند.

روش‌های آماری: تجزیه و تحلیل آماری و میزان بیان ژن‌های مورد نظر توسط نرم افزار REST صورت گرفت. از ANOVA با اندازه‌گیری مکرر برای تجزیه تحلیل حجم تومور و از آزمون T مستقل برای استرادیول استفاده شد. همچنین از نرم افزار EXCEL برای ترسیم شکل‌ها استفاده شد.

یافته‌ها

داده‌های به دست آمده از حجم تومور و روند رشد تومور در شش هفته اجرای پروتکل تمرین در شکل یک ترسیم شده است. همان‌طور که نشان داده شده است، میزان نهایی و روند رشد در گروه کنترل بالاتر از گروه تمرین است. نتایج آزمون تحلیل واریانس با اندازه‌گیری مکرر نشان می‌دهد بین دو گروه تفاوت معناداری ($F=4/57$, $P=0/037$) وجود دارد (شکل ۱).

نتایج به دست آمده از روش کمی Real-Time PCR با استفاده از نرم افزار REST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌ها افزایش معنادار بیان mir-206 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل را نشان دادند ($P=0/0001$). میزان بیان mir-206 در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل ۱۱/۲ برابر است. همچنین کاهش معنادار بیان ژن ERα در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل به دست آمد ($P=0/019$). میزان بیان ERα در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل ۰/۱۹ برابر است (شکل ۲، جدول ۲).

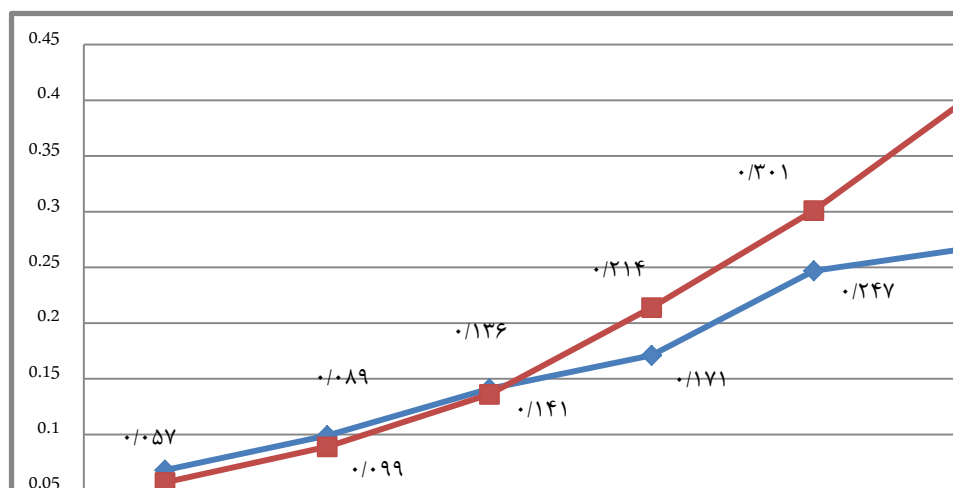
نتایج آزمون T مستقل برای سطوح استرادیول نشان داد در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل اختلاف معنادار ($t=9/04$, $P=0/0001$) بود و سطوح استرادیول در گروه تمرین با کاهش معنادار همراه بود (شکل ۳).

حجم تومور در ۲ بعد اندازه‌گیری شد. بزرگ‌ترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور در نظر گرفته شد و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. حجم تومور در هر دو گروه اندازه‌گیری شد.

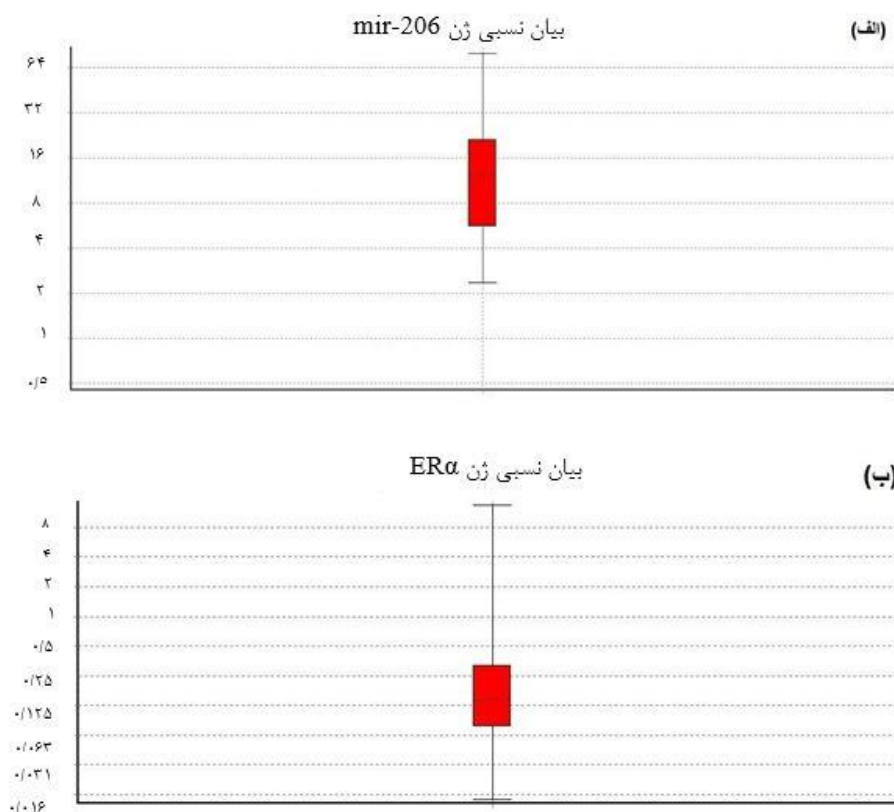
هموژنایز بافت تومور: در پایان برنامه تمرین و ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها برای سنجش متغیرهای پژوهشی قربانی شدند. به منظور اندازه‌گیری سطوح متغیرها، بلافاصله بافت تومور برداشته شد و قسمت مرکزی آن (قسمت نکروز) حذف گردید و قسمت رویی تومور در نیتروژن مایع، فریز و در دمای -70°C نگهداری شد. در آزمایشگاه حدود ۵۰-۱۰۰ میلی گرم بافت تومور به همراه یک سی سی ترایزول در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. سپس مایع رویی برای استخراج RNA به لوله جدید منتقل شد.

استخراج RNA: مراحل استخراج RNA تام براساس پروتکل ترایزول به شکل دقیق اجرا شد، با این اختلاف که برای استخراج mir-206 پس از اضافه نمودن ایزوپروپانول، رنشین به مدت یک شبانه روز در دمای -20°C نگهداری شد و سپس مراحل بعدی استخراج به ترتیب انجام گرفت. برای سنتز cDNA از کیت‌های مخصوص استفاده شد. برای سنتز cDNA ژن ERα از کیت استخراج کیاژن ۲۰۵۳۱۱ و برای ساخت cDNA mir-206 از کیت STRATAGENE با CAT No:600583 استفاده گردید. مراحل سنتز cDNA مطابق با پروتکل کیت‌ها انجام شد.

Real time – PCR: در ابتدا با استفاده از آزمایش سریال غلظت، میزان غلظت بهینه cDNA و پرایمرهای مربوط به هر ژن به‌طور مجزا برای هر کدام مشخص شد. برنامه Real time – PCR بر روی دستگاه کوربت برای mir-206 شامل 95° به مدت ۱۰ دقیقه و 45° سیکل 95° به مدت ۱۰ ثانیه، 60° به مدت ۱۵ ثانیه و 72° به مدت ۲۰ ثانیه و برای ژن ERα شامل 95° به مدت ۱۰ دقیقه و 40° سیکل 95° به مدت ۱۵ ثانیه، 60° به مدت یک دقیقه بود. پرایمر جلویی برای miR-206 UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG برای ER-α از پرایمر جلویی 5'-3'-CCTCCCGCCTTCTACAGGT و پرایمر برگشت، 5'-CACACGGCACAGTAGCGAG-3' استفاده شد. از U6 و GAPDH به عنوان ژن کنترل



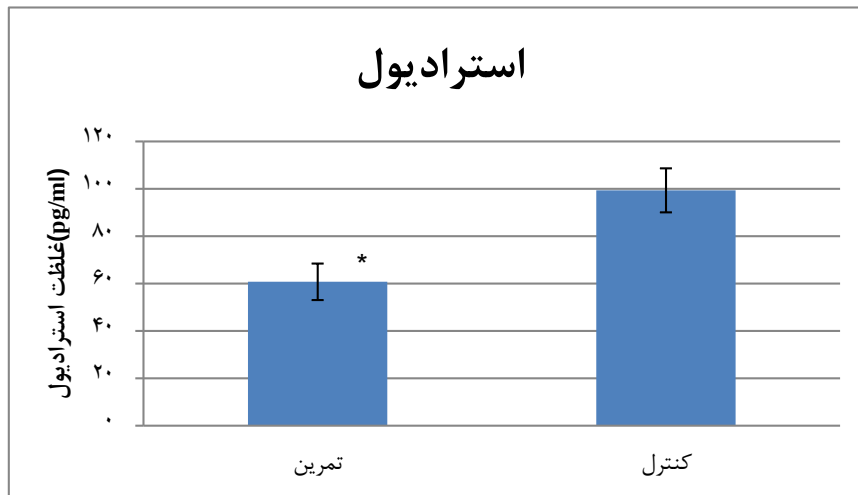
شکل ۱: تغییرات رشد تومور در دو گروه آزمون و کنترل در شش هفته



شکل ۲. میزان بیان mir-206 (الف) و ERα (ب) در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل

جدول ۲. نتایج بیان نسبی mir-206 و ERα در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل

ژن	نوع	بیان	خطای استاندارد	C.I. ۹۵٪	ارزش P
Mir-206	هدف	۱۱/۲	۴/۶۳-۲۵/۹۴	۲/۸۸۸-۵۴/۳۸	۰/۰۰۰۱
ERα	هدف	۰/۱۹	۰/۰۵۶-۰/۴۹	۰/۰۲۲-۷/۶۲	۰/۰۰۰۱



شکل ۳: سطوح استرادیول گروه‌های تمرین و کنترل پس از اجرای برنامه تمرین

بحث

با توجه به داده‌های حاصل از حجم تومور، پژوهش حاضر نشان داد، فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند روند پیشروی سرطان پستان را کاهش دهد و با توجه به افزایش بیان *mir-206* و کاهش بیان *ERα* و سطوح استرادیول پلاسما، به نظر می‌رسد حلقه ارتباطی بین این سه عامل تنظیم‌کننده می‌تواند به عنوان سازوکاری نوین جهت ایجاد آثار مثبت ورزش هوازی بر سرطان پستان شناخته شود.

در سال‌های اخیر، در کشورهای پیشرفته حوزه‌های جدیدی در رابطه با ورزش شکل گرفته است که با رویکرد درمانی به ورزش نگاه می‌کنند. برای مثال، پژوهش‌ها نشان داده‌اند، تمرینات ورزشی منظم می‌تواند منجر به کاهش حجم تومور گردد (۲۲، ۲۱، ۳، ۱۹)، نتیجه‌ای که در پژوهش حاضر نیز تایید شد. نتایج پژوهش بتوف در موش‌های مبتلا به سرطان پستان نشان داد، تمرین هوازی به عنوان یک روش درمانی، می‌تواند رشد تومور را در گروه‌هایی که فعالیت ورزشی انجام دادند نسبت به سایر گروه‌ها تا دو برابر کاهش دهد. در این پژوهش، بررسی‌های MRI نشان داد که در گروه‌هایی که پس از سرطانی شدن فعالیت ورزشی انجام دادند، هایپوکسی به صورت معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها، کاهش داشته و جریان خونی در تومور آنها یکنواخت‌تر بوده است. تمرین ورزشی همچنین باعث بهبود اثر شیمی‌درمانی در کاهش رشد تومور شد. هرچند، با وجود این‌که این نتایج نشان می‌دهد،

فعالیت ورزشی هوازی می‌تواند خاصیت ضد توموری برای بیماران مبتلا به سرطان پستان داشته باشد، ولی در این مطالعه نیز مانند پژوهش‌های دیگر، سازوکارهای مولکولی درگیر، مورد بررسی قرار نگرفته است (۷). هم‌راستا با داده‌های حاصل از حجم تومور در پژوهش حاضر، زیلینسکی و همکاران نشان دادند، فعالیت شدید بر رشد تومور با اثرگذاری بر ریز محیط تومور اثرگذار است و منجر به تاخیر در رشد تومور می‌شود (۲۲). ورما و همکاران کاهش حجم تومور ناشی از فعالیت ورزشی را با کاهش آنژیوژنز، کاهش بیان *VEGF*، مقادیر اریتروسیت، لاکتات ریزمحیط تومور و افزایش اکسیژن و نیتریک اکساید، مرتبط می‌دانند (۲۳). در پژوهش حاضر، علت کاهش تومور به کاهش استرادیول پلاسما، سرکوب بیان ژن تومور، به کاهش استرادیول پلاسما و سرکوب بیان ژن *ERα* به افزایش *mir-206* نسبت داده شده است.

اگر چه تواتر دقیق رویدادهای منجر به تومورهای پستان به خوبی شناسایی نشده است، اما مواجهه با استروژن‌ها به عنوان عامل خطر اصلی برای توسعه سرطان پستان پذیرفته شده است. همانگونه که ذکر شد، سطوح بالاتر استرادیول پلاسما، خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش می‌دهد (۱۶، ۱۷). استرادیول مضاعف سازی سلول را بوسیله اتصال به گیرنده‌های استروژن α و β افزایش می‌دهد. استرادیول می‌تواند در تنظیم بیان *miRNA* در سلول‌های سرطان پستان نقش داشته باشد، به گونه‌ای که

مولکول‌های تنظیمی هستند که بیان ژن را در سطح پیش و پس ترجمه‌ای تنظیم می‌کنند. به دنبال بررسی چگونگی اثر کاهشی فعالیت ورزشی هوازی بر بیان استرادیول پلاسما، در پژوهش حاضر، تغییرات *mir-206* اندازه‌گیری شده است.

چندین ژن *miRNA* تنظیم شده با استرادیول در ناحیه درون ژنی ژن‌های تنظیم شده با استروژن قرار دارند و یا با جایگاه‌های اتصال *ERα* همراه هستند. دوره بالینی سرطان پستان *ERα* مثبت به تعادل بین *miRNAs* سرکوبگر تومور تنظیم شده با استرادیول و *miRNAs* سرطان‌زا وابسته است. پژوهش‌های اخیر *mir-206* را به عنوان عامل سرکوب‌کننده سرطان شناسایی کرده‌اند، به‌طوری‌که افزایش مرگ سلولی و کاهش تکثیر سلولی در سلول‌های سرطان پستان که در معرض *miR-206* قرار گرفتند مشاهده شده است (۲۴). *mir-206* در عضله اسکلتی و عضله قلبی بیان می‌شود و تمایز عضله را افزایش می‌دهد و در سطوح پایین در دیگر بافت‌ها از جمله سلول‌های پستان و بافت توموری پستان (۱۴) نیز بیان می‌شود. یوشیموتو و همکاران تنظیم کاهشی *mir-206* در بافت سرطان پستان *ERα* مثبت را گزارش کردند (۲۸). *miR-206* بیان *ERα* را سرکوب می‌کند و از رشد سرطان پستان انسان MCF-7 پیشگیری می‌کند (۲۹). آدامز و همکاران نشان دادند، بیان *ERα* و فعالیت آن در سرطان پستان به وسیله حلقه تنظیمی *mir-206-ERα* استروژن تنظیم می‌شود، به‌گونه‌ای که *miR-206* با اتصال به *ERα mRNA 3'UTR* از ترجمه *ERα* بازداری می‌کند درحالی‌که آگونیست *ERα* بیان *miR-206* را متوقف می‌کند (۱۴). علاوه بر این، بیش‌بانی *miR-206* می‌تواند اهداف استرادیول در سلول‌های MCF-7 را سرکوب کند. *miR-206* می‌تواند بیان *ESR1*^۴ (۲۹)، بیان *SRC-1* و *SRC-3*^۵ درونزا (۲۴)، بیان *ERα* و *Met*^۶ (۳۰) را که اهداف استرادیول در بافت پستان هستند را سرکوب کند. دی لوا و همکاران دو جنبه از فعالیت این سرکوبگر تومور را شناسایی کردند (۳۰). آنها نشان دادند *mir-206* گیرنده MET (گیرنده فاکتور رشد هیپاسیت) انکوژنیک را سرکوب می‌کند که در

می‌تواند بیان *miR-206* در سلول‌های MCF-7^۳ را سرکوب کند (۲۴). هم‌راستا با مطالعات ورزشی دیگر (۲۵) پژوهش حاضر نیز کاهش معنادار استرادیول سرم در گروه ورزش را نشان داد. مک تیرنان و همکاران نشان دادند بیشترین کاهش در غلظت سرمی استرادیول زنان تمرین کرده مربوط به زنایی بود که چربی بدن آن‌ها بیشتر از دو درصد کاهش داشت (۲۶). از آن‌جاکه استرادیول مثل سایر استروئیدهای جنسی از کلسترول ساخته می‌شود، ممکن است برنامه تمرینی با اثرگذاری در میزان کلسترول در کاهش استرادیول سرم نقش داشته باشد یا در متابولیسم استرادیول و در نتیجه کاهش سطح سرمی آن موثر باشد. پژوهش حاضر نشان داد، میزان بیان *ERα* در گروه تمرین به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. نقطه مشترک بیشتر سرطان‌های پستان انسان اختلال در تنظیم بیان *ERα* است. تقریباً ۶۰٪ سرطان‌های پستان تشخیص داده شده، *ERα* را بیش بیان می‌کنند از این رو می‌تواند پیامدهایی برای درمان و تشخیص سرطان پستان داشته باشد. سلول‌های سرطان پستان *ERα* مثبت برای حیات و پیشرفت شان به استرادیول وابسته هستند. نتایج مطالعات حیوانی روی موش‌های فاقد ژن گیرنده استروژن آلفا و بتا، نشان داد، اثرات تکثیری استروژن به‌وسیله *ERα* میانجی می‌شود (۲۷). *ERα* به عنوان یک محصول انکوژن فعال شده با گیرنده در بافت‌های تناسلی عمل می‌کند، به‌طوری‌که بیش بیانی *ERα* با بدخیم شدن سرطان‌های رحم و پستان همراه است (۱۶ ۲۸). علاوه براین، تعدیل‌گرهای انتخابی استروژن که به عنوان آنتاگونیست‌های *ERα* در بافت پستان عمل می‌کنند، می‌توانند در درمان مطلوب سرطان‌های پستان *ERα* مثبت، مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین با توجه به داده‌های حاصل از پژوهش حاضر، تمرین ورزشی هوازی اثر کاهشی بر ۱۷ بتا استرادیول پلاسما دارد و می‌تواند اثر مطلوبی در روند بهبود و درمان این بیماری داشته باشد. از این رو کاهش مشاهده شده *ERα* در پژوهش حاضر را می‌توان به عنوان یکی از آثار مثبت فعالیت ورزشی بر سرطان پستان معرفی کرد. بیان *ERα* و فعالیت آن به‌وسیله سازوکارهای متعددی تنظیم می‌شود. یک سازوکار برای خاموشی این ژن به‌وسیله *miRNA* صورت می‌گیرد. *miRNAs* طبقه جدیدی از

⁴ The human ER- gene

⁵ Coactivator proteins steroid receptor coactivator

⁶ Hepatocyte growth factor receptor

³ Michigan Cancer Foundation - 7

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالب ذکر شده مشخص است ورزش اثرات مفیدی بر درمان سرطان پستان و یا بیماری‌های ثانویه همراه با سرطان دارد. اما تاکنون پژوهش‌های اندکی سازوکارهای مولکولی و سلولی اثرات مفید ورزش بر بافت توموری سرطان پستان را بررسی کرده‌اند و اصولاً مسیرهای پیام‌رسانی و سازوکارهای اثربخش ورزش در بهبود سرطان مشخص نبوده‌اند. به نظر پژوهشگران، تمرین‌های ورزشی می‌تواند با اثر افزایشی در بیان *miR-206* و اثر کاهشی بر بیان *ERα* و استرادیول پلاسما در موش‌های مبتلا به سرطان پستان وابسته به هورمون، می‌تواند به‌عنوان سازوکار نوینی در بیان اثرات مثبت ورزش بر سرطان پستان در نظر گرفته شود. همچنین با توجه به اثر *mir-206* بر ژن‌های پایین دست استرادیول و محدودیت مالی پژوهشگر برای اندازه‌گیری این ژن‌ها، توصیه می‌شود برای روشن‌تر شدن سازوکارهای سلولی اثر فعالیت ورزشی، پژوهش‌های بیشتری در این زمینه انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از رساله دکتری دو نفر از دانشجویان مقطع دکتری تخصصی فیزیولوژی ورزش دانشگاه تهران می‌باشد که با همکاری دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است، که بدین وسیله از آنها تقدیر و تشکر می‌شود. همچنین از دکتر لاناری اهدا کننده رده سلولی از موسسه پزشکی آرژانتین تشکر می‌شود.

بسیاری از تومورهای جامد بیش بیان می‌شود. آنها نشان دادند *mir-206* با هدف قرار دادن *MET*، *POLA1* (پلی مرز DNA آلفای ۱)، *SRC1* و *FOXO3*، درجهت مخالف با *miR-221* و *miR-222* که در رشد تومور درگیر هستند، عمل می‌کند و موجب کاهش تکثیر سلولی و آپوپتوز می‌شود (۳۰) همچنین، *mir-206* به‌طور غیر مستقیم *FOXO3*^۷ و اهداف رونویسی مستقیم آن یعنی *BIM*^۸ را تحریک می‌کند (۳۰). از طرف دیگر موری و همکاران حلقه تنظیمی بین *E2-FOXO3* را آرایه کردند، که در آن *AKT2*، *FOXO3* را سرکوب می‌کند و *E2* به‌طور غیرمستقیم با اثر تحریکی بر *AKT2*، موجب مهار *FOXO3* می‌شود (۳۱). این پژوهش نشان داد، *FOXO3* نیز همانند *Mir-206* دارای جایگاه اتصال روی ژن *ERα* بوده و می‌تواند به‌طور مستقیم از بیان *ERα* جلوگیری کند. *FOXO3* و اهداف آن از عوامل رونویسی موثر در فرایند آپوپتوز هستند و بنابراین پتانسیل *mir-206* در آپوپتوز سلول تومور را نشان می‌دهند. در پژوهش حاضر نشان داده شد، تمرین ورزشی هوازی به‌طور معناداری موجب افزایش بیان *mir-206* می‌شود. از این رو به نظر می‌رسد *mir-206* با هدف قرار دادن ژن‌های حساس به استروژن، اهداف ژنی استرادیول را سرکوب کرده و موجب کاهش کلی در تکثیر سلولی در سلولی در سلول‌های *ER* مثبت می‌شود. هرچند، اصلی‌ترین هدف *miR-206* mRNA گیرنده استروژن است (۳۰). در مطالعه حاضر نشان دادیم فعالیت ورزشی هوازی به‌طور معناداری موجب افزایش *Mir-206* می‌شود. به‌نظر می‌رسد *Mir-206* با هدف قرار دادن ژن‌های حساس به استروژن، اهداف ژنی استروژن را سرکوب کرده و موجب کاهش کلی در تکثیر سلولی در سلول‌های *ER* مثبت می‌شود.

بنابراین، فعالیت ورزشی منظم از دو طریق در بازداری از رشد سلول‌های سرطانی درگیر است. به‌طوری‌که از یک سو از تولید استرادیول بازداری می‌کند و از سویی دیگر از طریق افزایش تولید *miR-206*، اهداف زیر دست استرادیول و همین‌طور گیرنده استروژن را سرکوب می‌کند. برآیند این تغییرات کاهش رشد تومور و یا تاخیر در رشد تومور است.

⁷ Forkhead box o3

⁸ BCL2-like 11 apoptosis facilitator

References

۱. فرج اللهی م. روش‌های به کار گرفته شده جهت تسکین شدت خستگی توسط بیماران مبتلا به سرطان تحت شیمی‌درمانی. نشریه پرستاری ایران. ۲۰۰۴؛ ۱۷(۳۸): ۵۸-۶۴.
2. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA: a cancer journal for clinicians* 2013; 63(1): 11-30.
3. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. *Cytokine* 2011; 55(2): 274-9.
4. Na HK, Oliynyk S. Effects of physical activity on cancer prevention. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2011; 1229(1): 176-83.
5. McNeely ML, Campbell KL, Rowe BH, Klassen TP, Mackey JR, Courneya KS. Effects of exercise on breast cancer patients and survivors: a systematic review and meta-analysis. *Canadian Medical Association Journal* 2006; 175(1): 34-41.
6. Steiner JL, Davis JM, McClellan JL, Enos RT, Murphy EA. Effects of voluntary exercise on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer 2013; 2(4): 1466-72.
7. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: a translational perspective. *Brain, behavior, and immunity* 2013; 30:S75-S87.
8. Fernandes-Silva MM, Carvalho VO, Guimarães GV, Bacal F, Bocchi EA. Physical exercise and microRNAs: new frontiers in heart failure. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 2012; 98(5): 459-66.
9. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research* 2004; 14(10a): 1902-10.
10. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nature reviews Drug discovery* 2010; 9(10): 775-89.
11. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431(7006): 350-5.
12. Deng S, Calin GA, Croce CM, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell cycle* 2008; 7(17): 2643-6.
13. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* 2006; 6(11):857-66.
14. Adams BDD, Furneaux H, White B. The micro-RNA miR-206 Targets the Human Estrogen Receptor- α , and Represses ER α mRNA and Protein Expression in Breast Cancer Cell Lines. *Mol Endocrinol* 2007.
15. Adams BD, Furneaux H, White BA. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor- α (ER α) and represses ER α messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Molecular endocrinology* 2007; 21(5): 1132-47.
16. Clemons M, Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N engl J med* 2001; 344(4): 276-85.
17. Travis RC, Key TJ. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Research* 2003; 5(5):239-49.
18. Amani-shalamzari s, Agha-Alinejad H, alizadeh s, shahbazi s, khatib zk, kazemi a, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2014; 17(4):231-6.
19. Lanari C, Lüthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer research* 2001; 61(1): 293-302.
20. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *Journal of Applied Physiology* 2010; 108(2):343-8.

۲۱. آقاعلی‌نژاد ح، توفیقی ا، محمدحسن ز، مهدوی م، شاهرخی س، گروه تبوعو و همکاران، اثر تمرین استقامتی پیوسته بر میزان HSP70 و طول عمر موش‌های مبتلا به تومور سرطان سینه. فصلنامه المپیک؛ ۱۳۸۷: ۴۸(۴): ۷۳-۸۲.
22. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *Journal of Applied Physiology* 2004; 96(6):2249-56.
23. Verma VK, Singh V, Singh MP, Singh SM. Effect of physical exercise on tumor growth regulating factors of tumor microenvironment: implications in exercise-dependent tumor growth retardation. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 2009; 31(2):274-82.
24. Adams BD, Cowee DM, White BA. The role of miR-206 in the epidermal growth factor (EGF) induced repression of estrogen receptor- α (ER α) signaling and a luminal phenotype in MCF-7 breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 2009; 23(8): 1215-30.
۲۵. بختیار ت، اعظم ز. اثر یک دوره برنامه تمرینی منتخب هوازی ۱۰ هفته ای بر ۱۷ بتا - استرادیول سرم (نشانگر سرطان سینه) و چاقی زنان یائسه. فصلنامه المپیک. ۱۳۸۷؛ ۳(۴۳): ۴۵-۵۲.
26. McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, Yasui Y, Irwin ML, Rajan KB, et al. Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women a 12- month randomized clinical trial. *Cancer Research* 2004; 64(8): 2923-8.
27. Hewitt SC, Korach KS. Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 2003; 125(2): 143-9.
28. Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, et al. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor α in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment* 2011;130(1): 331-9.
29. Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression Is Down-regulated in Estrogen Receptor α -Positive Human Breast Cancer. *Cancer research* 2008; 68(13):5004-8.
30. Di Leva G, Gasparini P, Piovan C, Ngankeu A, Garofalo M, Taccioli C, et al. MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor α interactions in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2010; 102(10):706-21.
31. Morelli C, Lanzino M, Garofalo C, Maris P, Brunelli E, Casaburi I, et al. Akt2 Inhibition Enables the Forkhead Transcription Factor FoxO3a To Have a Repressive Role in Estrogen Receptor α Transcriptional Activity in Breast Cancer Cells. *Molecular and cellular biology* 2010; 30(3):857-70.