Iranian Journal of Breast Diseases. 2021; 13(4):67-76.

Original Article

# The Effect of Aerobic Training on Tumor Growth and Expression of Bcl-2 Gene and Protein in Female Mice with Breast Cancer

**Shahvali Koohshoori Y[1], Marandi M[2*], Kargarfard M[2], Vaseghi G[3], Moshtaghian J[4]**

[1] Ph.D. Student in Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[2] Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran
[3] Department of Applied physiology, Faculty of Medical, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
[4] Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, Iran

[ Downloaded from ijbd.com on 2022-06-20 ]

**Receive:** 14/11/2020
**Accepted:** 6/2/2021

***Corresponding Author:**
s.m.marandi@spr.ui.ac.ir

**Ethics Approval:**
IR.UI.REC.1398.012

[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

## Abstract

**Introduction:** The aim of this study was to investigate the effect of aerobic exercise with detraining in different phases of prevention on Bcl-2 gene expression and protein.

**Methods:** For this purpose, 32 female BALB-c mice (18-20 g) were purchased and randomly assigned to four groups of primordial prevention (A), primary prevention (B), secondary prevention (C), and control (D). Group A performed aerobic exercise for 4 weeks, followed by injection of 4T1 cells and 8 weeks of detraining after the injection. Group B performed aerobic exercise for 4 weeks immediately after the injection of 4T1 cells and then detrained for 4 weeks. Group C received a 4T1 cell injection and maintained a sedentary life for 4 weeks, followed by 4 weeks of aerobic exercise. The subjects were killed 48 hours after the last training session and detraining courses and tumor tissues were removed. Real-time polymerase chain reaction was used to measure gene expression and western blotting was used to measure protein content.The one-way ANOVA test was used to analyze the data.

**Results:** The mean gene expression due to aerobic exercise was significantly ($P<0.001$) lower in groups A (0.481), B (0.323), and C (0.035) compared with group D (1.711). Also, aerobic exercise caused a significant decrease in Bcl-2 ($P=0.005$) protein expression in groups A (0.692), B (0.821), and C (0.670) compared with group D (1.000). It should be noted that tumor growth in experimental groups was not significantly different from the control group ($P=0.092$).

**Conclusion:** Exercise may be able to reduce anti-apoptotic agents in tumor cells, leading to apoptosis of tumor cells and reduced tumor growth.

**Keywords**: Primordial Prevention, Primary Prevention, Secondary Prevention, Apoptosis, Aerobic Exercise, Detraining

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۱۳۹۹؛ ۱۳(٤): ٦٨-٧٦

مقاله پژوهشی

# تاثیر دوره‌های تمرین هوازی بر رشد تومور و بیان ژن و پروتئین BCL-2در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

**یوسف شاه ولی کوه شوری[۱]، سید محمد مرندی[۲*]، مهدی کارگرفرد[۲]، گلناز واثقی[۳]، سید جمال مشتاقیان[۴]**

[۱] دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۲] گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
[۳] گروه فیزیولوژی کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
[۴] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

**تاریخ ارسال:** : ۹۹/۸/۲۴
**تاریخ پذیرش:** : ۹۹/۱۱/۱۸

* **نویسنده مسئول:**
s.m.marandi@spr.ui.ac.ir

## چکیده

**مقدمه:** هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر تمرین هوازی به همراه بی‌تمرینی در فازهای مختلف پیشگیری بر روی بیان ژن و پروتئین BCl-2 بود.

**روش بررسی:** ۳۲ سر موش Balb-c ماده (18-20g) خریداری شد و به‌طور تصادفی در گروه‌های پیشگیری مقدماتی (A)، پیشگیری اولیه (B)، پیشگیری ثانویه (C) و کنترل (D) قرار گرفتند. گروه A پس از ۴ هفته تمرین هوازی و تزریق سلول‌های 4T1، ۸ هفته بی‌تمرینی داشتند. گروه B پس از تزریق سلول‌های 4T1 به مدت ۴ هفته تمرین هوازی انجام دادند و سپس به مدت ۴ هفته بی‌تمرینی داشتند. در گروه C پس از تزریق سلول‌های سرطانی و بعد از آن ۴ هفته بی‌تحرکی و سپس ۴ هفته تمرین هوازی انجام شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی و دوره‌های بی‌تمرینی پس از بی‌هوشی، قربانی کردن و بافت‌برداری انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن از RT PCR و برای سنجش میزان پروتئین از WB استفاده شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میانگین بیان ژن در اثر تمرین هوازی بین گروه‌های (۰/۴۸۱) A، (۰/۳۲۳) B و (۰/۰۳۵) C نسبت به گروه کنترل (۱/۷۱۱) D در حد معنی‌داری (P=۰/۰۰۱) متفاوت بود. همچنین تمرین هوازی باعث تفاوت معنی‌دار میزان بیان پروتئین BCl-2 (P=۰/۰۰۵) بین گروه‌های (۰/۶۹۲) A، (۰/۸۲۱) B و (۰/۶۷۰) C نسبت به گروه (۱/۰۰۰) D شد. لازم به ذکر است که رشد تومور در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت (P=۰/۰۹۲).

**نتیجه‌گیری:** ورزش احتمالا بتواند با کاهش عوامل ضد آپوپتوزی در سلول‌های توموری منجر به ایجاد آپوپتوز و مرگ سلول‌های توموری و کاهش رشد تومور و بهبود وضعیت بیمار شود.

**واژه‌های کلیدی**: پیشگیری مقدماتی، پیشگیری اولیه، پیشگیری ثانویه، آپوپتوز، تمرین ورزشی هوازی، بی‌تمرینی

[ Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

## مقدمه

افزایش شیوع سرطان در سال‌های اخیر و تأثیر آن بر ابعاد مختلف جسمی، روحی و اجتماعی زندگی انسان، آن را به یکی از مشکلات اساسی قرن تبدیل کرده است (۱). در بین انواع مختلف سرطان، سرطان پستان که ۲۳٪ از کل سرطان‌های زنان را به خود اختصاص داده است، شایع‌ترین سرطان و کشنده‌ترین بدخیمی در زنان و یکی از نگران کننده‌ترین عوامل سلامت زنان در ایران و جهان است (۴-۲). بیشترین سن ابتلا در زنان ایرانی ۴۷ سالگی است و یک دهه پایین‌تر از کشورهای توسعه یافته است (۵). ۲۵٪ علل وقوع سرطان‌ها طبق تحقیقات آژانس بین‌المللی، چاقی یا اضافه وزن و سبک زندگی بی‌تحرک است (۶، ۷). افزایش وزن به مقدار ۱/۵ برابر حد طبیعی، خطر بروز سرطان پستان را افزایش می‌دهد (۸، ۹). علت این مسئله افزایش استروژن از بافت چربی است که می‌تواند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول (آپوپتوز) را مهار کند و تکثیر سلول را افزایش دهد (۸). کاهش آپوپتوز یا مقاومت آن نقش مهمی در سرطان‌زایی دارد. روش‌های بسیاری وجود دارد که یک سلول بدخیم می‌تواند به کاهش آپوپتوز یا مقاومت به آپوپتوز دست یابد.

به‌طور کلی مکانیسم‌هایی که در فرار از آپوپتوز رخ می‌دهد، می‌تواند به‌طور گسترده تقسیم شود به: ۱) اختلال در تعادل پروتئین‌های پیش آپوپتوز و ضد آپوپتوز، ۲) کاهش عملکرد کاسپاز ۳) اختلال در سیگنالینگ گیرنده مرگ (۱۰). روند آپوپتوز توسط گروهی از پروتئین‌های متعلق به Bcl-2 کنترل می‌شود. گروه پروتئین Bcl-2 از پروتئین‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl-2، Bcl-XL و پروتئین پیش آپوپتوزی مثل BAX تشکیل شده است (۱۰). Bax پروتئین آغازگر آپوپتوز از طریق شکل‌گیری نفوذپذیری غشای میتوکندری است (۱۱)، در مقابل، Bcl-2 عملکرد متضاد BAX، مهار آپوپتوز و حفظ سلول‌ها را دارد (۱۲، ۱۳). فعال‌سازی بیان Bax مانع از عملکرد Bcl-2 می‌شود (۱۳، ۱۴). نسبت این دو پروتئین می‌تواند بر وجود و یا عدم وجود ادامه آپوپتوز تأثیر بگذارد زیرا افزایش نسبت Bax/ Bcl-2 که به عنوان یک شاخص قابل اعتماد سلول برای انجام آپوپتوز محسوب می‌شود (۱۴، ۱۵). BcL2 نقشی مرکزی را در برنامه ژنتیکی رشد و بقای سلول‌های یوکاریوتی از مسیر مهار مرگ سلولی ایفا می‌کند (۱۶). بنابراین سرکوب کننده‌های BcL2 می‌توانند به عنوان روشی برای درمان سرطان از راه کاهش تأثیر مهاری BcL2 بر آپوپتوز استفاده شوند (۱۷). لذا با تحریک پروتئین‌های پیش آپوپتوزی و سرکوب پروتئین‌های ضد آپوپتوزی در سلول‌های توموری می‌توان به کنترل سرطان پرداخت.

جراحی، درمان دارویی، هورمون‌درمانی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی از روش‌های درمان سرطان پستان می‌باشند. امروزه عوارض شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و هورمون‌درمانی بر کسی پوشیده نیست و امکان متاستاز سلول‌های سرطانی بعد از جراحی وجود دارد. از طرفی یکی از بزرگترین محدودیت‌های داروهای ضدسرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است و با افزایش سلول‌های مقاوم روند درمان مشکل‌تر می‌شود (۱۸). از آنجایی که بیشتر عوامل خطر سرطان پستان به آسانی قابل تغییر نیستند، از این رو راه‌های پیشگیری از آن به سوی عواملی معطوف می‌شود که دستخوش تغییر می‌باشند (۱۹)؛ که یکی از راه‌های پیشگیری از بروز سرطان پستان، فعالیت بدنی منظم است. شواهد زیادی نشان می‌دهند خطر ابتلای به سرطان پستان و مرگ ناشی از سرطان در زنانی که قبل و یا بعد از یائسگی فعالیت بدنی منظم دارند، نسبت به زنان غیرفعال کمتر است که ممکن است با اثرات فعالیت فیزیکی بر توده بدنی، هورمون‌ها و تعادل انرژی، مرتبط باشد. ورزش منظم در دوره نوجوانی و بزرگسالی، می‌تواند به کاهش خطر سرطان پستان کمک کند و در بین نجات یافتگان از سرطان پستان، ورزش منظم می‌تواند عوارض جانبی درمان (پرتودرمانی و شیمی‌درمانی) را کاهش و احتمال زنده ماندن را افزایش دهد (۲۲-۲۰). از طرفی با توجه به اینکه چربی، محل ذخیره استروژن‌ها و تولید هورمون‌های استروئیدی است و چاقی نیز از عوامل تاثیرگذار بر بروز سرطان‌های مختلف است به‌نظر می‌رسد که تاثیر فعالیت ورزشی بر کاهش چربی می‌تواند در بهبودی بیماری سرطان تاثیرگذار باشد (۲۳).

پیشگیری مقدماتی، به‌عنوان پیشگیری از توسعه عوامل خطر در ابتدا قبل از وقوع بیماری تعریف شده است (۲۴). پیشگیری اولیه عبارت است از حذف یا کاهش قرار گرفتن

[ Downloaded from ijbd.com 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

در معرض عوامل خطر شناخته شده در جمعیت‌های حساس برای جلوگیری از بیماری است (۲۵). پیشگیری ثانویه از سرطان (غربالگری) به اعمال مداخله و استفاده از آزمایشات برای تشخیص سرطان قبل از ظهور همه علائم است (۲۶).

با توجه به آثار مثبت فعالیت ورزشی بر سرطان پستان، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر تمرین هوازی در فازهای پیشگیری مقدماتی، اولیه و ثانویه بر القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی موش‌های نژاد بالب سی انجام گرفته است.

## مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع توسعه‌ای به روش تجربی با طرح پس آزمون که شامل دوره‌های ۴ هفته ای تمرین هوازی قبل، حین و بعد از ایجاد تومور بود.

تعداد ۳۲ سر موش بالب سی (هفت تا هشت هفته ای با میانگین تودهٔ بدنی ۲۰-۱۸ گرم) از مؤسسه پاستور خریداری شدند و به حیوان‌خانه دانشکده علوم زیستی دانشگاه اصفهان منتقل گشتند. جهت تطابق فیزیولوژیک موش‌ها، دوره ۱۲ ساعته تاریکی ـ روشنایی رعایت گردید. دمای اتاق نیز بین ۲۴ـ۲۲ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۵٪ حفظ شد. قابل ذکر است که غذای حیوانات به صورت آزاد و دراختیار تا پایان پروتکل در دسترس موش‌ها قرار داشت. پس از آشناسازی موش‌ها با محیط، به ۴ گروه (تمرین هوازی در فاز پیشگیری مقدماتی، تمرین هوازی در فاز پیشگیری اولیه، تمرین هوازی در فاز پیشگیری ثانویه و کنترل) تقسیم شدند. لازم به ذکر است که در پایان مطالعه به دلیل مرگ و میر و غیره تعداد موش‌های هر گروه به ۶ سر کاهش یافت. ضمن اینکه طرح تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه اصفهان با شناسه IR.UI.REC.1398.012 تصویب شد.

**طرح تحقیق:**

**کشت سلولی:** در این تحقیق ابتدا رده سلولی 4T1 از بانک سلولی دانشکده فیزیولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تهیه شد. سپس سلول‌ها دفریز شده و بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 با ۱۰٪ سرم جنین گاوی در انکوباتور $CO_2$دار کشت داده شدند. سپس ۲ روز بعد برای پاساژ دادن ابتدا مایع رویی با پیپت پاستور تخلیه شده و سپس سطح سلول‌ها با 1ml PBS شستشو داده شد و مایع با پیپت پاستور تخلیه شد. سپس 2ml تریپسین در فلاسک حاوی سلول‌ها ریخته و به مدت ۳ الی ۴ دقیقه در انکوباتور قرار داده و پس از حصول اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، با پیپت پاستور کل محتوای ظرف را در یک فالکون ۱۵ ریخته و جهت خنثی کردن اثر تریپسین، محیط کشت حاوی FBS 10% را به میزان ۲ برابر تریپسین (4ml) در فالکون ریخته و در سانتریفیوژ با دور ۱۵۰۰۰ و به مدت ۴ دقیقه قرار داده شد. سپس همه مایع روی پلاک سلولی تشکیل شده کف فالکون را دور ریخته و 1ml محیط کشت روی پلاک سلول‌ها ریخته و خوب پیپتاژ شدند. سپس شمارش سلول‌ها روی لام در زیر میکروسکوپ انجام گرفت.

**تزریق سلول‌های 4T1:** برای ایجاد سرطان پستان، پس از بی‌هوشی، دو میلیون سلول 4T1 محلول در 100 µl PBS100 برای هر موش به صورت زیر جلدی به ناحیه کنار پای راست موش‌ها تزریق شد. حدود ۳ تا ۴ هفته بعد از تزریق، تومور زیر پوست موش‌ها، در ناحیه تزریق کاملا قابل لمس بود.

**جدول ۱: طرح تحقیق**

| مدت زمان گروه‌ها | ۲ هفته | ۴ هفته | ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه دوره اول تمرینی | ۴هفته | ۴ هفته | ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **فاز پیشگیری مقدماتی** | آشناسازی با تردمیل | تمرین هوازی | تزریق سلول‌های 4T1 | بی‌تمرینی | بی‌تمرینی | قربانی کردن و بافت‌برداری |
| **فاز پیشگیری اولیه** | | بی‌تحرک | | تمرین هوازی | بی‌تمرینی | |
| **فاز پیشگیری ثانویه** | | بی‌تحرک | | بی‌تحرک | تمرین هوازی | |
| **کنترل** | بی‌تحرک | بی‌تحرک | | بی‌تحرک | بی‌تحرک | |

[ Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

**پروتکل تمرین هوازی:** برای اعمال مداخله تمرینی ابتدا به مدت دو هفته آشناسازی با تردمیل انجام گرفت. پس از آشناسازی، پروتکل تمرینی اصلی که شامل دوره‌های ۴ هفته‌ای و به مدت ۴۰ دقیقه دویدن بر روی تردمیل جوندگان در هر جلسه با سرعت ۱۸ متر بر دقیقه بود؛ که به صورت ۵ روز در هفته اجرا شد.

**اندازه‌گیری حجم تومور و رشد تومور:** ۳ تا ۴ هفته پس از تزریق سلول‌های سرطانی با پیدایش تومور، هر هفته حجم تومور محاسبه شد. برای اندازه‌گیری حجم تومور از فرمول جونز و همکاران ($\pi/6(L^2 \times W)$) استفاده شد (۲۲). لذا حجم تومور در دو بعد اندازه‌گیری شد. بزرگ‌ترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور در نظر گرفته شد و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به‌عنوان عرض (W) در نظر گرفته شد. حجم تومور در هر چهار گروه اندازه‌گیری شد. میزان رشد تومور از تقسیم حجم تومور در هفته پایانی بر حجم تومور در پایان هفته هشتم به دست آمد.

**قربانی کردن موش‌ها و بافت‌برداری:** ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، پس از بی‌هوشی با کتامین و زایلازین، موش‌ها قربانی شده و بافت تومور برداشته شد. پس از حذف قسمت نکروزی مرکزی در فریزر °C ۷۳- قرار داده شد.

**Real Time PCR Protocol:** برای بررسی میزان بیان ژن‌های BAX و BCL-2 ابتدا استخراج RNA توسط محلول ROUCHE Trizol انجام شد. بعد از انجام Spin غلظت نمونه با استفاده از دستگاه Nano Drop خوانده شد. برای تهیه اولین رشته از cDNA از روی RNA کل استخراج شده در مرحله قبل، از کیت با نام تجاری (TAKARA) استفاده گردید. این کیت بر اساس آنزیم ترانس کریپتاز معکوس تهیه شده است. سپس یک میکروگرم از cDNA سنتز شده وارد واکنشReal time PCR گردید که با کمک کیت سایبر گرین شرکت Takara انجام گرفت. جفت پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از نرم‌افزار oligo7 طراحی شد و توسط شرکت Roche سنتز شد. از β-Actin به‌عنوان ژن House keeping استفاده شد. نتایج آزمایش به روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج Fold change آنها گزارش شد.

**پروتکل وسترن بلات:** برای تعیین بیان پروتئین‌های BCL-2 از آنالیز وسترن بلات استفاده شد. بدین منظور، سلول‌ها روی یخ در ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز RIPA ( 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% sodium dodecyl sulfate, 150 mM sodium chloride, 0.5% sodium deoxycholate, and 1.0% NP-40) همگن شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی جمع‌آوری شد و غلظت پروتئین با استفاده از روش برادفورد با استفاده از معرف‌های تجاری Bio-Rad کمی شد ( Bio-Rad Laboratories, CA, USA). پروتئین‌ها توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید 12 SDS٪ جدا شده و سپس به غشاهای فلوراید پلی وینیلیدین (PVDF) از قبل فعال شده با متانول منتقل شدند. برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی، غشاها به مدت ۲ ساعت با یک لرزش آرام در محلول مسدود کننده (آلبومین نسخه خطی پذیرفته شده سرم گاوی (BSA) ۱٪ در محلول نمکی بافر فسفات (PBS) به علاوه ۰/۱٪ توئین -۲۰) انکوبه شدند. پس از آن، لکه‌ها با آنتی‌بادی‌های مختلف اولیه خرگوش ( anti- Bcl-2 (1:500), (sc-492, (sc-7480), and anti β-actin (1:300), (sc-47778) یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از چهار بار شستشو با PBS، لکه‌ها سرانجام با آنتی‌بادی‌های ثانویه ضد خرگوش HRP[1] ( mouse anti-rabbit IgG-HRP: sc-2357 and m-IgGκ BP-HRP: sc-516102; Santa Cruz, USA (1:5000)) به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند. توسعه باند پروتئین با استفاده از روش شیمی لومینسانس افزایش یافته (ECL) تجسم یافته و توسط نرم‌افزار Image J کمی شده است. در این مطالعه از β-اکتین به‌عنوان کنترل بارگذاری داخلی استفاده شد.

**روش آنالیز آماری:** برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن، ΔCt ژن در هر نمونه از تفریق CT ژن مربوطه و CT ژن GAPDH (به عنوان ژن رفرنس) محاسبه شد. سپس ΔΔCt از تفریق ΔCtهای به‌دست آمده و ΔCt گروه کنترل محاسبه گردید. پس از آن Fold Change (به مفهوم چند برابر شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) از فرمول ۲ به توان ΔΔCt- محاسبه شد، سپس

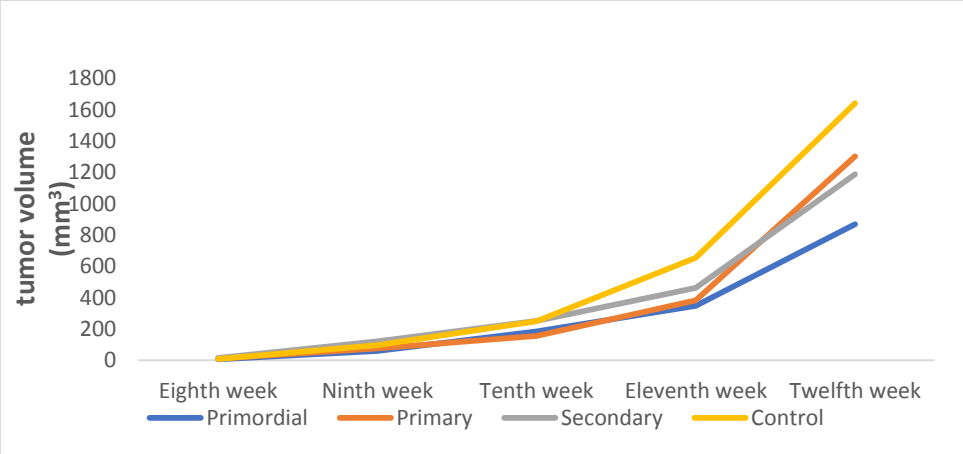
[1] Horseradish Peroxidase

[ Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

از آمار توصیفی برای محاسبه میانگین و انحراف استاندارد همچنین برای تحلیل داده‌های تحقیق از آمار استنباطی استفاده شد. ابتدا برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها از آزمون شاپیرو ویلک استفاده شد و سپس از آزمون لوین برای تعیین تجانس واریانس متغیرها استفاده شد. با توجه به وجود چهار گروه در تحقیق حاضر و مقایسه متغیرهای تحقیق در پس آزمون، برای تحلیل داده‌های تحقیق از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. همچنین سطح معنی‌داری برای تمام آزمون‌ها $P\leq0/05$ در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

نمودار ۱ میزان افزایش حجم تومور را از پایان هفته هشتم تا پایان هفته دوازدهم نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار قابل مشاهده است میزان حجم تومور در چهار گروه افزایش یافته است، اما این افزایش در گروه کنترل نسبت به دیگر گروه‌ها بیشتر است. جدول شماره ۲ میانگین و انحراف استاندارد و نتایج تحلیل واریانس یک طرفه در رشد تومور، بیان ژن و پروتئین BCL-2 در گروه‌های پیشگیری مقدماتی، پیشگیری اولیه، پیشگیری ثانویه و کنترل را نشان می‌دهد. نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری در میزان رشد تومور وجود ندارد ($F_{3,20}$=2/467, P=0/092). اما تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در میزان بیان ژن BCL-2 وجود دارد ($F_{3,20}$=111/533, P=0/001). پس از بررسی آزمون تعقیبی توکی تفاوت معنی‌دار بین دو گروه پیشگیری مقدماتی و کنترل (P=0/001)، پیشگیری اولیه و کنترل (P=0/001) و پیشگیری ثانویه و کنترل (P=0/001) مشاهده شد اما تفاوت بین دیگر گروه‌ها معنی‌دار نبود. همچنین بر اساس آزمون تحلیل واریانس یک طرفه تفاوت بین گروه‌ها در میزان پروتئین BCL-2 معنی‌دار بود ($F_{3,20}$=5/903, P=0/005) که با بررسی آزمون تعقیبی توکی این تفاوت معنی‌دار بین گروه پیشگیری مقدماتی و کنترل (P=0/011) و پیشگیری ثانویه و کنترل (P=0/007) مشاهده شد؛ اما بین دیگر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

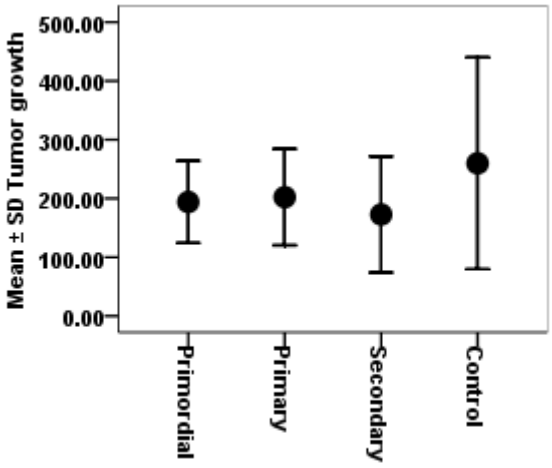



**نمودار ۱: میزان حجم تومور موش‌ها از پایان هفته هشتم تا پایان هفته دوازدهم مطالعه**

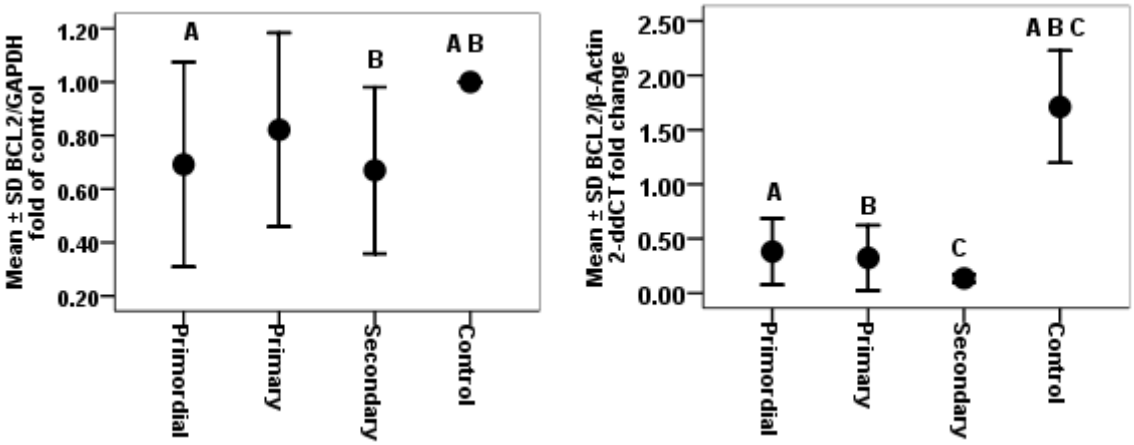
**جدول ۲: نتایج تحلیل واریانس یک راهه متغیرهای تحقیق در ۴ گروه**

| متغیرهای تحقیق | | پیشگیری مقدماتی | پیشگیری اولیه | پیشگیری ثانویه | کنترل | F | P |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| رشد تومور | میانگین | ۱۹۳/۹۲۰ | ۲۰۲/۲۰۷ | ۱۷۲/۷۵۶ | ۲۵۹/۷۶۷ | ۲/۴۶۷ | ۰/۰۹۲ |
| | انحراف استاندارد | ۳۵/۰۲۰ | ۴۱/۰۰۱ | ۴۹/۴۰۰ | ۹۰/۰۸۰ | | |
| بیان ژن BCL-2 | میانگین | ۰/۴۸۱۲ | ۰/۳۲۲۸ | ۰/۰۳۵۲ | ۱/۷۱۰۷ | ۱۱۱/۵۳۳ | ۰/۰۰۱ |
| | انحراف استاندارد | ۰/۱۵۲۴ | ۰/۱۴۹۷ | ۰/۰۱۸۴ | ۰/۲۵۸۰ | | |
| BCL-2 protein fold of control | میانگین | ۰/۶۹۱۹ | ۰/۸۲۱۵ | ۰/۶۶۹۷ | ۱/۰۰۰۰ | ۵/۹۰۳ | ۰/۰۰۵ |
| | انحراف استاندارد | ۰/۱۹۱۳ | ۰/۱۸۱۰ | ۰/۱۵۵۶ | ۰/۰۰۰۰ | | |

[ Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]




**نمودار ۲: میانگین و انحراف استاندارد میزان رشد تومور در گروه‌های مطالعه**




A: تفاوت معنی‌دار فاز مقدماتی و کنترل (بیان ژن)
B: تفاوت معنی‌دار فاز اولیه و کنترل (بیان ژن)
C: تفاوت معنی‌دار فاز ثانویه و کنترل (بیان ژن)

A: تفاوت معنی‌دار فاز مقدماتی و کنترل (پروتئین)
B: تفاوت معنی‌دار فاز ثانویه و کنترل (پروتئین)

**نمودار ۳: میانگین و انحراف استاندارد بیان ژن و پروتئین BCL-2 در گروه‌های مطالعه**

## بحث

این پژوهش با هدف بررسی اثر چهار هفته تمرین هوازی در فازهای مختلف بر بیان ژن و پروتئین BCL-2 و رشد تومور انجام شد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تمرین هوازی در فازهای مختلف بر بیان ژن و پروتئین BCL-2 اثر معنی‌داری داشت. نتایج مطالعه حاضر با نتایج De lima و همکاران (۲۳)، کردی و همکاران (۲۸) و رفیعی و همکاران (۲۹) همسو بود. همچنین نتایج در مورد بیان ژن و پروتئین BAX تاثیر معنی‌دار تمرین هوازی در فازهای مختلف را نشان داد. این نتایج با نتایج تحقیقات کردی و همکاران (۲۸)، رفیعی و همکاران (۲۹) و علیزاده و همکاران (۳۰) همسو بود. گزارش شده است که IL-6 در سرطان سینه و برخی سلول‌های توموری دیگر با افزایش BCL-2 باعث افزایش مقاومت در مقابل آپوپتوز می‌شود (۳۰). از آنجایی‌که ورزش منظم منجر به کاهش سطوح IL-6 می‌شود (۲۸، ۳۱)، بنابراین یکی از مکانیسم‌های احتمالی کاهش Bcl-2 می‌تواند کاهش IL-6 باشد. از طرفی BCL-2 با جلوگیری از انتقال BAX از سیتوزول به میتوکندری می‌تواند منجر به کاهش BAX در میتوکندری شود (۳۲). همچنین مشخص شده است که بیان mRNA مربوط به Bcl-2 در سلول‌های تحت درمان با antimiR-21 کاهش یافته است. miR-

[ Downloaded from ijbd.com 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

21 ممکن است به طور غیرمستقیم بیان Bcl-2 را تنظیم کند (۳۳). بر این اساس، یک توضیح احتمالی می‌تواند اثرات سرکوبگرانه بیان ژن antimiR-21 با تنظیم منفی بعدی بیان Bcl-2 باشد. STAT3 همچنین می‌تواند بیان تعدادی از پروتئین‌های ضد آپوپتوز در سطح رونویسی مانند Bcl-2 را تعدیل کند (۳۴). بنابراین، اثر STAT3 بر miR-21 ممکن است نقش مهمی در کنترل بیان Bcl-2 داشته باشد. در مطالعه حاضر، تمرین ورزشی پروتئین Bax را در بافت‌های تومور موش‌ها افزایش داده است. استروژن می‌تواند از طریق تحریک Bcl-2 آپوپتوز را مهار کند (۳۵). شواهد در حال رشد وجود دارد که فعالیت بدنی باعث تعدیل سرطان‌زایی ناشی از استروژن در سرطان پستان از طریق چندین مکانیسم بیولوژیکی قابل قبول می‌شود (۳۶) بنابراین ورزش با کاهش سطوح استروژن می‌تواند منجر به افزایش آپوپتوز از طریق کاهش BCL-2 شود. تفاوت بین گروه پیشگیری اولیه و کنترل در میزان پروتئین Bcl-2 معنی‌دار نبود. از آنجا که تزریق سلول‌های توموری در گروه پیشگیری اولیه همزمان با تمرین ورزشی صورت گرفت، ممکن است اثرات حاد فعالیت ورزشی که باعث افزایش عوامل التهابی می‌شود منجر به عدم معنی‌داری در کاهش میزان پروتئین Bcl-2 بوده باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد بیماران مبتلا به سرطان و پزشکان معالج می‌توانند تمرینات هوازی را در کنار درمان‌های مرسوم دیگر برای کاهش عوارض سرطان به‌کار گیرند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها در میزان رشد تومور وجود نداشت. نتایج تحقیق حاضر با تحقیقات جونز و همکاران (۳۷) و نورشاهی و همکاران (۳۸) همسو و با تحقیقات رفیعی و همکاران (۲۹) و آقاعلی‌نژاد و هاشمی (۳۹) غیرهمسو بود. یکی از دلایل احتمالی اختلاف نتایج تحقیق حاضر با تحقیق رفیعی و همکاران می‌تواند طول دوره تمرینی بیشتر در مطالعه مذکور باشد. همچنین در تحقیق رفیعی و همکاران شاخص حجم تومور مورد مقایسه قرار گرفته است حال آنکه در تحقیق حاضر میزان رشد تومور مورد بررسی قرار گرفته است. از طرفی در مطالعه آقاعلی‌نژاد و هاشمی اثر تمرین هوازی به همراه نانو ذرات سلنیوم بر روی حجم تومور مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق مذکور تمرین هوازی به تنهایی کاهش معنی‌داری را در حجم تومور نشان نداد. دوره تمرینی کوتاه مدت می‌تواند یکی از دلایل احتمالی عدم کاهش رشد تومور در تحقیق حاضر باشد. از طرفی گروه‌های قبل و حین به ترتیب ۸ و ۴ هفته detraining پس از ۴ هفته تمرین ورزشی هوازی داشتند. Detraining بر خلاف تمرین منظم باعث افزایش رشد تومور می‌شود (۴۰). به‌نظر می‌رسد طول دوره‌های تمرینی در گروه‌های تجربی برای کاهش حجم تومور کافی نبوده و برای ایجاد اثرات بیشتر بر روی رشد تومور باید دوره‌های تمرینی طولانی‌تر مورد بررسی قرار گیرد.

در این مطالعه تاثیر دوره‌های تمرینی چهار هفته‌ای بر روی رشد تومور و بیان ژن و پروتئین BCL-2 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه رشد تومور در گروه‌های تجربی نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت بنابراین پیشنهاد می‌شود برای اثربخشی بیشتر تمرین در مطالعات آینده دوره‌های تمرینی طولانی‌تر بررسی شود و همچنین دوره‌های مختلف تمرینی با هم مقایسه شود.

## نتیجه‌گیری

ورزش هوازی از طریق مکانیسم‌های مختلف، رشد سلول‌های تومور را کاهش می‌دهد، یکی از آنها ایجاد آپوپتوز در سلول‌های تومور است. به‌نظر می‌رسد بهتر است که تأثیر دوره‌های تمرین هوازی طولانی‌تر بر رشد تومور انجام شود. ظهور آپوپتوز در سلول‌های توموری یکی از اولین پدیده‌هایی است که می‌تواند رشد تومور را کنترل کند، در نتیجه می‌توان نتیجه گرفت که ورزش هوازی با افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی ممکن است سلامت بیمار را بهبود بخشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان از سرکار خانم دکتر دانا به خاطر آموزش صبورانه و کمک‌های ایشان در راستای اجرای هرچه بهتر این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

[ Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

## References


1. Poorkiani M, Hazrati M, Abbaszadeh A, Jafari P, Sadeghi M, Dejbakhsh T, et al. Does arehabilitation program improve quality of life in breast cancer patients. Payesh. 2010; 9(1):61-8.
2. Nafissi N, Saghafinia M, Motamedi MH, Akbari ME. A survey of breast cancer knowledge and attitude in Iranian women. J Cancer Res Ther. 2012; 8(1): 46-9.
3. Banegas MP, Bird Y, Moraros J, King S, Prapsiri S, Thompson B. Breast cancer knowledge, attitudes, and early detection practices in United States-Mexico border Latinas. J Womens Health (Larchmt). 2012; 21(1): 101-7.
4. Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Ann Oncol.2011; 22(1):93-7.
5. Xue F, Michels KB. Diabetes, metabolic syndrome, and breast cancer: a review of the current evidence. J Clin Nutr. 2007; 86: 823-35.
6. Hoffman LG, Wahnefried WD, Goran MI, McTiernan A, Reichman ME. Possible mechanism mediating an association between physical activity and breast cancer. Cancer Supplement. 1998;83(3):621-28.
7. Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SI, Henson DA, Butterworth DE, Fagoaga OR, Warren BJ, et al. Immune response to obesity and moderate weight loss. Int. J. Obes. 1996; 20: 353-60.
8. SY Wong. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment Rebecca. Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2011; 30: 87.
9. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. Physiol. Rev. 2007; 87(1): 99-163.
10. Campbell K, Tiernan A, Li SS, Sorensen BE, Yasui Y, Lampe JW, et al. Effect of a 12-month exercise intervention on the apoptotic regulating proteins bax and Bcl-2 in colon crypts: A randomized controlled trial. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 2007;16(9): 1767-74.
11. Foo JB, Yazan LS, Tor YS, Wibowo A, Ismail N, How CW, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from Dillenia suffruticosa root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway. J Ethnopharmacol. 2015;166: 270-8.
12. Aruoma OI, Bahorun T, Agnihotri AK. Cancer risks and perspectives: Molecular mechanisms. Mutat. Res. 2014; 768: 1-5.
13. McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5(4): a008656.
14. Cory S, Adams J M. The BcL2 family: Regulators of the cellular life-or-death switch. Nature Reviews Cancer. 2002; 2(9): 647-56 .
15. Kim R, Emi M, Tanabe K, Toge T. Therapeutic potential of antisense Bcl- 2 as a chemosensitizer for cancer therapy. Cancer. 2004; 101(11): 2491-502.
16. Friedenreich CM, Cust AE. Physical activity and breast cancer risk: impact of timing, type and dose of activity and population subgroup effects. Br J Sports Med. 2008; 42(8): 636-47.
17. Eliassen AH, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC. Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women. Arch Intern Med. 2010; 170(19): 1758-64.
18. Siegel RL, Miller KD & Jemal A. Cancer statistics. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2018; 68(1): 7-30.
19. Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, Van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, et l. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). International Journal of Cancer. 2004; 111(5): 762-71.
20. Moodi M, Sharifirad GR, Tahergorabi Z, Mostafavi F. [Get to Know Breast Cancer Pathway toward Health. 1 Th ed]. Isfahan University of Medical Sciences Publisher. Isfahan 2012.
21. O'Connell S, Asnltzr B, Sami P. Disease in women and breast and genitals- urinary male. Tehran: Tohfeh. 2004; 144
22. 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.
23. Lima C, Alves L, Fabíola, J, Machado A, Kryczyk M, Yamazaki R, et al. Tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats performing anaerobic exercise: participation of Bcl-2, Bax, apoptosis, and peroxidation. Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2011;36(4):533-8.


[ Downloaded from ijbd.com 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]

24. Strasser T. Reflections on cardiovascular diseases. Interdiscip Science Rev. 1978; 3: 225-30.

25. Danaei G, et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet. 2005; 366(9499):1784-93.

26. Eddy DM. Secondary prevention of cancer: an overview. Bulletin of the World Health Organization. 1986; 64(3): 421-9

27. Almassi Nokiani F, Akbari H, Madani H, Izadi B. Prevalence of Breast Cancer in Breast Sample Reports in Iran, 2001–2004. The Breast Journal 2007; 13(5): 536.

28. Khori V, Amani Shalamzari S, Isanejad A, Alizadeh AM, Alizadeh S, Khodayari S, Khodayari H, Shahbazi Sh, Zahedi A, Sohanaki H, Khaniki M, Mahdian R, Saffari M, Fayad R. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. European Journal of Pharmacology. 2015; 765:179-87.

29. Rafiei M, Gaeini A, Kordi MR, Nuri R. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercise on Gene Expression of Cytochrome C, Caspase 9 and Tumor Volume in Mice with Breast Cancer. Report of Health Care. 2018; 4(4): 55-60

30. Alizadeh AM, Heydari Z, Rahimi M, Bazgir B, Shirvani H, Alipour S, Heidarian Y, Khalighfard S, Isanejad A. Oxytocin mediates the beneficial effects of the exercise training on breast cancer. 2017;103(2):222-35.

31. I Garcia-Tun˜o´n, M Ricote, A Ruiz, B Fraile, R Paniagua & M Royue. IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. Histopathology 2005; 47: 82-9.

32. Amani Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh Sh, Shahbazi Sh, Kashani Khatib Z, Kazemi A, Saei MA, Minayi N. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(4):231-58.

33. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. Cell Death and Differentiation. 2000; 7: 102-11.

34. Yan LX, Wu QN, Zhang Y, Li YY, Liao DZ, Hou JH, et al. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth. Breast Cancer Res. 2011; 13(1):1-14

35. Isomoto H, Kobayashi S, Wemeburg NW, Bronk SF, Guicciardi ME, Frank DA, Gores G. Interleukin 6 upregulates myeloid cell leukemia-1 expression through a STAT3 pathway in cholangiocarcinoma cells. Hepatology. 2005; 42(6):1329-38.

36. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995; 92(12):5510-14.

37. Yvonne M. Coyle. Physical activity as a negative modulator of estrogen-induced breast cancer. Cancer Causes Control 2008; 19:1021-9.

38. W Jones L, L Viglianti B, A Tashjian J, M Kothadia S, T Keir S, J Freedland S, Q Potter M, Moon E, Schroeder T, E. Herndon J, and W. Dewhirst M. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. J Appl Physiol. 2010; 108(2): 343-8.

39. Agha-Alinejad H, Hashemi Jokar E. Effect of Six Weeks of Interval Exercise Training along with Selenium Nanoparticle Ingestion on Bcl-2 and LC3 Genes expression in the Tumor Tissue of Breast Tumor-Bearing Mice. Iranian Quarterly Journal of Breast Disease. 2019; 12(2): 26-37.

40. Zhanyang Fei, Dengke Li, Kaiming Li, Ming Zhou, Yong Li, Yiqun Li, Zhenxiao Sun. Detraining after tumor-bearing accelerates tumor growth while continuous training decreases tumor growth in mice. Journal of Traditional Chinese Medical Sciences. 2020; 7(1):75-81.

[ Downloaded from ijbdi.com 2022-06-20 ]
[ DOR: 20.1001.1.17359406.1399.13.4.6.2 ]
[ DOI: 10.30699/ijbd.13.4.67 ]