Iranian Journal of Breast Diseases. 2021;14(3):46-56.

Original Article

Interactive Effect of 6 Weeks of Aerobic Exercise and Quercetin Supplementation on TIE-2 and VEGF-A Expression in Tumor Tissue of Female Mice with Breast Cancer

Jalali Z[1], Shahidi F[2*]

[1]Ph.D. Student in Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran
[2]Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Exercise Sciences, Shahid Rajaee Teacher Training University, Tehran, Iran

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-18]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]

[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

Receive: 29/5/2021
Accepted: 18/7/2021

***Corresponding Author:**
fereshteh_shahidi98@yahoo.com

Ethics Approval:
IR.SSRI.REC.1398.595

Abstract

Introduction: In recent decades, the significant role of angiogenesis in the growth and metastasis of cancer has led to much research in this field. The aim of this study was to investigate the interaction effect of 6 weeks of continuous aerobic training and quercetin on *TIE-2* and *VEGF-A* expression in female mice with breast cancer.

Methods: Twenty-four female BALB/c mice with breast cancer were randomly divided into 3 groups: tumor (T), tumor+aerobic exercise (T+AE), and tumor+aerobic exercise+quercetin (T+AE+Q). The T+AE group and the T+AE+Q group performed endurance running exercise on a treadmill for 6 weeks, 5 days per week, 60 minutes per session, with a gradual increase in intensity over the training period. The T+AE +Q group was injected with 110 $mg.kg^{-1}$ of quercetin solution for 6 weeks, /3 days per week/ in addition to exercise. Eventually, the mice were killed, and the tumor tissues were removed and frozen in liquid nitrogen. The expression of *TIE-2* and *VEGF-A* genes was measured using real-time PCR. ΔCt, ΔΔCt, and the fold change were calculated, and one-way analyses of variance with Tukey post hoc tests were used to analyze the data at a significance level of 0.05. Data analysis was conducted using the GenEx software.

Results: The results showed that T+AE+Q interaction significantly reduced VEGF-A expression (4.09 times decrease) compared with the T group ($P< 0.05$). Quercetin consumption in the T+AE+Q group significantly reduced VEGF-A expression (2.72 times) compared with the T+AE group ($P< 0.05$)., However, aerobic exercise alone had no effect on VEGF-A expression. Also, aerobic exercise alone or in combination with quercetin had no effect on TIE-2 expression.

Conclusion: The interaction of aerobic exercise and quercetin supplementation may be effective in inhibiting tumor angiogenesis.

Keywords: Breast Cancer, Aerobic Exercise, Quercetin, TIE-2 Receptor, Vascular Endothelial Growth Factor

فصلنامه بیماری های پستان ایران
٥٦-٤٦ :(٣)١٤ ؛١٤٠٠

مقاله پژوهشی

تاثیر تعاملی ۶ هفته تمرین هوازی و مصرف مکمل کوئرستین بر بیان TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

زهره جلالی[1]، فرشته شهیدی[2]*

[1]دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران
[2]گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۲/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۷

* **نویسنده مسئول:**
fereshteh_shahidi98@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در چند دهه اخیر، نقش چشمگیر آنژیوژنز در رشد و متاستاز سرطان باعث تحقیقات فراوان در این زمینه شده است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر تعاملی ۶ هفته تمرین هوازی تداومی و مکمل کوئرستین بر بیان فاکتورهای دخیل در آنژیوژنز همچون TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود.

روش بررسی: ۲۴ سر موش بالب سی ماده مبتلا به سرطان پستان، به طور تصادفی به ۳ گروه تومور (T)، تومور+ تمرین هوازی (T+AE) و تومور+ تمرین هوازی+ کوئرستین (T+AE+Q) تقسیم شدند. گروه T+AE و گروه T+AE+Q، تمرین استقامتی فزاینده دویدن روی نوارگردان را ۶ هفته/ ۵ روز/ ۶۰ دقیقه اجرا کردند. به گروه T+AE+Q، به جز تمرین، ۶ هفته/ ۳ روز/ مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، محلول کوئرستین تزریق شد. در پایان، موش‌ها کشته شدند، بافت تومور برداشته و در نیتروژن مایع فریز شدند. بیان ژن‌های TIE-2 و VEGF-A به روش Real Time-PCR سنجیده شد. ΔCt، ΔΔCt، Fold Change و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی، در سطح معناداری (P<۰/۰۵) با نرم‌افزار GENEX محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تعامل T+AE+Q باعث کاهش معنادار بیان ژن VEGF-A (کاهش ۴/۰۹ برابری) در مقایسه با گروه T شده است (P<0/05). مصرف کوئرستین در گروه T+AE+Q باعث کاهش معنادار بیان ژن VEGF-A (کاهش ۲/۷۲ برابری) در مقایسه با گروه T+AE شد (P<0/05)، اما تمرین هوازی به تنهایی بر بیان VEGF-A تاثیری نداشت. همچنین تمرین هوازی به تنهایی و تعامل تمرین هوازی و کوئرستین بر بیان TIE-2 بی‌تاثیر بود.

نتیجه‌گیری: تعامل تمرین هوازی و مصرف مکمل کوئرستین احتمالا در مهار آنژیوژنز تومور موثر است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، تمرین هوازی، کوئرستین، گیرنده TIE-2، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

مقدمه

سرطان پستان پس از سرطان ریه، شایع‌ترین سرطان و پنجمین علت شایع مرگ ناشی از سرطان، در سراسر جهان است (۱). در چند دهه اخیر، پی بردن به نقش چشمگیر آنژیوژنز[1] در رشد و متاستاز سرطان منجر به معطوف شدن تحقیقات فراوان به سوی مفاهیم بالینی و سازوکارهای تنظیمی آنژیوژنز در بیماران سرطانی شده است که در این راستا افزایش عوامل ضد آنژیوژنز با استفاده از داروهای ضد آنژیوژنزی و روش‌های مختلف از جمله فعالیت ورزشی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (۲). آنژیوژنز منجر به دسترسی سلول‌های تومور به مواد مغذی، اکسیژن، عوامل رشد، فاکتورهای انعقادی، آنزیم‌های پروتئولیتیک و عوامل فیبرینولیتیک می شود و در نتیجه نقش حیاتی در رشد و متاستاز تومور دارد (۳). تکثیر تومور تمایل به فعال کردن رگ‌زایی با تغییر در تعادل عوامل القاکننده و مهارکننده دارد تا از این طریق افزایش تقاضای اکسیژن و مواد مغذی مورد نیاز برای رشد تومور را فراهم آورد (۴). یکی از مسیرهای اصلی درگیر در فرآیند آنژیوژنز تومور، خانواده لیگاندها و گیرنده‌های فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) است. بیان بیش از حد VEGF به عنوان عامل پیش‌آگهی‌دهنده سرطان سینه، روده بزرگ، کلیه، کبد، ریه، پانکراس و پروستات و معده معرفی شده است و میزان بیان آن با پیشرفت تومور افزایش می‌یابد. شواهد تجربی زیادی نشان داده‌اند که دخالت در عملکرد VEGF می‌تواند مانع رشد تومور و آنژیوژنز تومور شود. VEGF-A در سلول‌های تومور، اطراف سلول‌های استرومائی از قبیل سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عضله صاف و فیبروبلاست‌ها و همچنین توسط سلول‌های مشتق شده از مغز استخوان بیان می‌شود. مطالعات هدفمند انتخاب ژن در موش‌ها، نشان داده است که VEGF-A برای آنژیوژنز تومور ضروری است. نقش مهم VEGF-A در آنژیوژنز تومور در مطالعات زیادی مشخص شده است که نشان دهنده آن است که مهارکننده‌های ضدVEGF می‌توانند در پیشگیری از آنژیوژنز و رشد تومور موثر باشند. یکی از اولین مطالعات استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال، آنتی‌بادی VEGF بود که آنژیوژنز و رشد تومور را مهار می‌کرد. VEGF در شروع آنژیوژنز، باعث افزایش نفوذپذیری عروق می‌شود. افزایش نفوذپذیری، منجر به خروج پروتئین‌های پلاسمایی و ورود آن‌ها به فضای میان‌بافتی و مهاجرت و تکثیر سلول‌های اندوتلیالی شده و در نتیجه می‌تواند موجب آنژیوژنز شود. اما فعال شدن کامل آنژیوژنز نیازمند پیام‌رسانی مناسب گیرنده TIE-2 است. TIE-2، گیرنده تیروزین کینازی مخصوص سلول‌های اندوتلیال است که توسط دو لیگاند اولیه ANGPT-1 و ANGPT-2 تنظیم می‌شود. ANGPT-1، گیرنده TIE-2 را فعال می‌کند و منجر به پایداری و استحکام اتصالات بین سلولی و اتصالات میان غشاء پایه و پریسیت‌ها و سلول‌های عضله صاف عروق با سلول‌های اندوتلیال می‌شود. ANGPT-2 با ANGPT-1 برای اتصال به TIE-2 رقابت می‌کند و باعث عدم اتصال سلول‌های اندوتلیال به غشاء پایه و پریسیت‌ها و عروق اولیه برای پاسخ به VEGF و پیشرفت آنژیوژنز می‌شود. در عروقی که مقادیر پیوند ANGPT-1 به TIE-2 زیاد است، به پیام رسانی VEGF به نسبت مقاوم‌ترند. در نتیجه هر چقدر مقادیر گیرنده TIE-2 زیادتر باشد، احتمال پیوند ANGPT-1 به آن بیشتر می‌شود، بنابراین پایداری عروق زیادتر شده و آنژیوژنز کمتر اتفاق می‌افتد (۵).

اکثر مطالعات پیشنهاد می‌کنند که فعالیت ورزشی منظم به‌طور کلی خطر ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهد و می‌تواند رشد تومور را کاهش دهد و این اثر به نوع سرطان، ارتباط ندارد. این اثرات مهارکننده رشد تومور، احتمالا توسط چندین مکانیسم مختلف متاثر می‌شود و سهم مهارکنندگی هر مکانیسم در اثر تمرین ورزشی ممکن است در میان انواع سرطان‌ها متفاوت باشد (۶). همچنین مشخص شده است که فعالیت ورزشی با تغییر مسیر VEGF-A و TIE-2، منجر به کاهش آنژیوژنز عروق تومور، بازسازی عروق تومور و در نتیجه کاهش رشد تومور می شود. اگرچه، سازوکارهای مسئول کاهش رشد تومور در این مسیرها، به‌طور کامل شناخته نشده است. در این مورد، شلمزاری و همکاران، نقش پیشگیرانه و درمانی ۶ هفته تمرین استقامتی تداومی را بر حجم تومور و سطح VEGF، در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی کردند. در این پژوهش، دو گروه از موش‌ها به مدت ۸ هفته تمرین استقامتی تداومی را انجام دادند و سپس با تزریق سلول‌های سرطانی وابسته به استروژن، همه

[1] Angiogenesis

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

موش‌ها به سرطان پستان مبتلا شدند. گروه اول شامل موش‌هایی بود که قبل از ابتلا به سرطان تمرین نکرده بودند و گروه دوم، شامل موش‌هایی بود که قبل از ابتلا به سرطان، تمرین کرده بودند. گروه سوم، موش‌هایی بودند که قبل از ابتلا به سرطان، تمرین کرده بودند، اما بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، تمرین نکردند. گروه اول و دوم، پس از ابتلا به سرطان پستان، ۶ هفته/ ۵ روز در هفته تمرینات استقامتی تداومی را انجام دادند. آن‌ها گزارش کردند میزان رشد تومور و مقدار VEGF در گروه‌دوم که پس از سرطانی شدن تمرین استقامتی انجام دادند نسبت به دو گروهی که بعد از ابتلا، فعالیت نمی‌کردند کمتر بود (۷). در پژوهش دیگری تسای و همکاران ۴ هفته/ ۵ روز در هفته تمرین هوازی اینتروال و تاثیر ۴ هفته/ ۵ روز در هفته تمرین هوازی تداومی و را بر حجم تومور و سطوح VGEF در تومور کبد و ریه را در موش‌های مبتلا به سرطان بررسی کردند. آن‌ها افزایش غیرمعناداری در سطوح VEGF در هر دو گروه تمرین ورزشی هوازی تداومی و اینتروال نسبت به گروه کنترل گزارش کردند. همچنین بیان کردند که تمرین ورزشی تغییری در حجم تومور موش‌های مبتلا به سرطان ایجاد نکرده است (۸). فائستینو- روچا و همکاران، نیز تاثیر ۳۵ هفته تمرین استقامتی دویدن روی تردمیل را بر سطح VEGF-A بافت تومور، در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی کردند. آن‌ها گزارش نمودند که فعایت ورزشی طولانی مدت باعث افزایش بیان VEGF-A و افزایش عروق تومور می‌گردد (۹). در مطالعه دیگری، خلیق‌فرد و همکاران، تاثیر ۸ هفته تمرین هوازی تناوبی را بر بیان VEGF در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان، بررسی کردند و کاهش معنادار بیان VEGF پس از تمرین تناوبی را گزارش نمودند (۱۰). در مورد تاثیر فعالیت ورزشی بر بیان TIE-2 در بافت تومور، یک پژوهش یافت شد. بیشتر پژوهش‌ها تاثیر فعالیت‌های ورزشی بر بیان TIE-2 را در آزمودنی‌های سالم بررسی کرده‌اند. احمدیان و همکاران، تاثیر ۱۰ هفته/ ۵ روز در هفته/ ۶۰ دقیقه فعالیت استقامتی تداومی دویدن بر روی تردمیل با سرعت ۶۰ تا ۶۵ درصد را بر بیان TIE-2 در بافت تومور موش‌های بالب سی مبتلا به سرطان پستان را بررسی کردند و گزارش نمودند که تمرین استقامتی تداومی باعث کاهش معنادار بیان TIE-2 و کاهش حجم تومور می شود (۱۱).

از سویی دیگر، مکمل پلی‌فنولی کوئرستین (Quercetin) به عنوان مکملی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری، مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. کوئرستین یکی از رایج‌ترین فلاونوئیدهای غذایی است که در میوه‌ها و سبزیجات فراوان وجود دارد. پیاز مقدار زیادی از این فلاونوئید را دارد (تقریبا ۱/۳۱ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پیاز قرمز و ۰/۰۳-۰/۲۸ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم پیاز سفید و زرد). پژوهش‌ها نشان داده‌اند کوئرستین علاوه بر خاصیت ضداکسایشی و ضدسرطانی، دارای خواص ضدالتهابی، ضددیابتی و ضدمیکروبی نیز می‌باشد. خواص ضدسرطانی کوئرستین، به‌دلیل توانایی آن در القا آپوپتوز، کاهش تکثیر سلول‌های توموری، توقف چرخه سلولی و مهار آنژیوژنز، می‌باشد (۱۲). پژوهش‌های اندکی اثر کوئرستین بر بیان VEGF-A را بررسی کرده‌اند و پژوهشی که تاثیر تعاملی مصرف کوئرستین و فعالیت ورزشی هوازی را بر بیان VEGF-A و TIE-2 در سرطان پستان بررسی کرده باشد، یافت نشد.

مواد و روش‌ها

نوع پژوهش حاضر و روش آن تجربی و توسعه‌ای است و در آن همه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی به شماره IR.SSRI.REC.1398.595، رعایت شده است. ۲۴ سر موش ماده بالب‌سی (۳ تا ۵ هفته‌ای با میانگین وزن ۲ ±۱۸) از مرکز انستیتو پاستور تهیه و به محیط آزمایشگاه حیوانات دانشکده علوم ورزشی دانشگاه شهید رجایی منتقل گردید. پس از آشنایی با محیط جدید، موش‌ها به‌طور تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی تومور (T) (ایجاد تومور سرطان سینه)، گروه تومور+ تمرین هوازی (T+AE) و گروه تومور+ تمرین هوازی+ مکمل کوئرستین (T+AE+Q) تقسیم شدند. موش‌ها، برای سازگار شدن با محیط جدید در قفسه‌های پلکسی‌گلاس با درب توری با ابعاد ۲۵×۲۷×۴۳ سانتی‌متر، در گروه‌های ۵تایی نگهداری شدند. شرایط استاندارد در محیط آزمایشگاه (دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد و چرخه تاریکی روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته) رعایت شد. موش‌ها از غذای پلت ساخت شرکت بهپرور، که آزادانه در دسترس

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

آن‌ها بود، استفاده می‌کردند. آب مورد نیاز موش‌ها نیز آزادانه در دسترس آن‌ها بود. پس از یک هفته آشنایی با محیط، سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای گیرنده استروژن مثبت MC4L2 (+ER) در پهلوی راست موش‌ها و به روش زیر جلدی تزریق شد. مصرف مکمل کوئرستین و پروتکل فعالیت ورزشی ۱۰ روز پس از تزریق سلول‌های سرطانی آغاز شد.

کشت سلول و نحوه ایجاد تومور

مراحل کشت سلول و ایجاد تومور در آزمایشگاه کشت سلول دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران، انجام شد. ابتدا سلول‌های MC4L2، در فلاسک‌های سایز T75 حاوی محیط کشت DMEM/F-12، FBS ۱۰٪ و پنی‌سیلین 100 ug/ml، کشت داده شدند و پس از تکثیر سلول‌ها، با استفاده از تریپان بلو و لام هماسیتومتر شمرده شدند (۷). سپس یک میلیون سلول به روش زیر جلدی و متمرکز، در پهلوی راست هر موش تزریق شد. قبل از تزریق سلول‌های سرطانی، به موش‌ها ترکیب زایلازین و کتامین به صورت زیر جلدی تزریق گردید و موش‌ها بیهوش شدند.

پروتکل تمرین هوازی

با هدف سازگار شدن موش‌های گروه T+AE و گروه T+AE+Q، با فعالیت ورزشی، آن‌ها ابتدا ۳ روز و هر روز به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰-۱۵ متر در دقیقه روی تردمیل دویدند. تمرین استقامتی به مدت ۶ هفته، ۵ روز در هفته بر روی تردمیل اجرا شد. در هفته اول جلسات تمرین به مدت ۳۳-۴۵ دقیقه با سرعت ۶-۱۴ متردر دقیقه، در هفته دوم جلسات تمرین ۴۸-۶۰ دقیقه با سرعت ۸-۱۶ متردر دقیقه و در هفته سوم تا هفته ششم ۶۰ دقیقه با سرعت ۱۰-۲۰ متر در دقیقه (اجرای پروتکل تمرینی با سرعت متوسط ۱۴ متر در دقیقه در نیم ساعت ابتدایی و سرعت متوسط ۱۸ متر در دقیقه در نیم ساعت دوم دوره پروتکل تمرینی) انجام شد (۱۳).

پروتکل تزریق زیر صفاقی کوئرستین

موش‌های گروه T+AE+Q، علاوه بر اجرای پروتکل تمرین هوازی، به مدت ۶ هفته، ۳ روز در هفته، به مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، محلول کوئرستین به‌صورت تزریق زیر صفاقی دریافت کردند.

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی

هر ۳ گروه پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی و در شرایط پایه (۴۸ ساعت پس از آخرین تزریق مکمل کوئرستین و فعالیت ورزشی هوازی) در شرایط یکسان، با کتامین و زایلوزین بیهوش شدند. سپس بافت تومور آن‌ها برداشته شد و در داخل پلیت حاوی PBS استریل قرار گرفت. قسمت نکروز شده مرکزی تومور و عروق خونی و بافت چربی اطراف تومور، حذف شدند. تومور به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد و در میکرو تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و بلافاصله در نیتروژن مایع فریز شد و سپس در دمای ۷۰- نگهداری شد. در آزمایشگاه دانشکده پیراپزشکی دانشگاه تهران، به منظور هموژن کردن بافت تومور، تقریبا ۱۰۰ میلی‌گرم بافت تومور به همراه یک سی‌سی ترایزول در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن گردید. مایع رویی لوله هموژن، برای استخراج RNA به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. مراحل استخراج RNA، با توجه به پروتکل ترایزول ساخت شرکت لایف تکنولوژی کشور آمریکا، انجام شد و برای رونویسی RNA به cDNA، طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA، Regent RT PrimerScript شرکت تاکارا کشور ژاپن (Cat#RR037A)، میزان بیان عوامل مورد نظر سنجیده شد. تمامی مراحل Real Time-PCR بر اساس دستورالعمل SYBER-Green شرکت تاکارا کشور ژاپن (Cat#RR820L)، انجام شد. از ژن ACTB به عنوان ژن کنترل استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول۱: توالی پرایمرهای ژن‌ها

نام ژن	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی
TIE-2	CACCAAGATCCACTGGAGGTTC (22N)	GCAGGTAGGAAGGATGCTTGTTG (23N)
VEGF-A	GTTTCGGGAACCAGACCTCTC (21N)	CCAAAGTGCTCCTCGAAGAGTC (22N)
ACT-b	CTGTCGAGTCGCGTCCAC (18N)	TCATCCATGGCGAACTGGTG (20N)

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

تجزیه و تحلیل داده‌ها

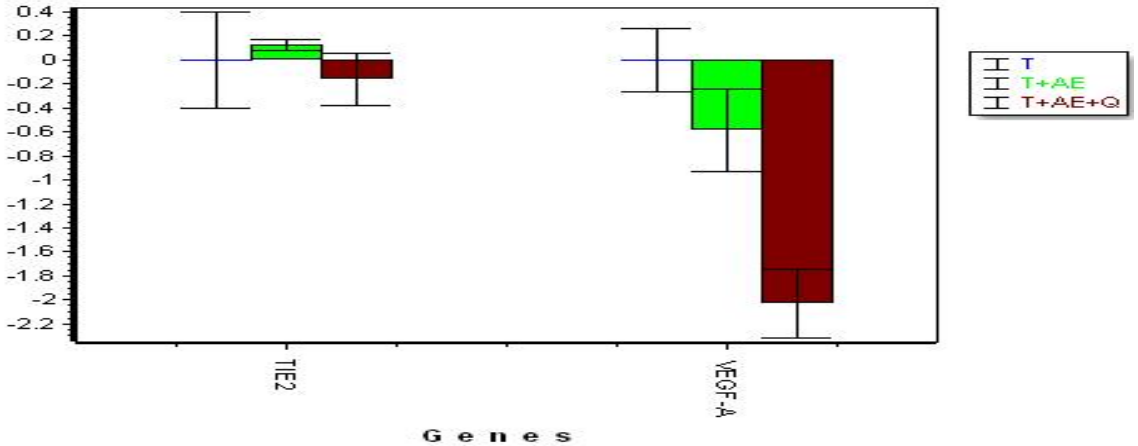
به‌منظور کمی‌سازی مقادیر بیان ژن، با تفریق CT[۲] (به مفهوم سیکلی است که در آن محصولات real time از یک حد آستانه فراتر رفته است) ژن مربوطه و CT ژن ACT-b (ژن رفرنس)، ΔCt[۳] ژن مورد نظر در هر نمونه محاسبه شد. سپس از تفریق ΔCtهای به دست آمده و ΔCt گروه تومور، ΔΔCt[۴] محاسبه شد. (نکته: ΔΔCt گروه تومور صفر می‌شود زیرا گروه کنترل است و با تفریق ΔCt گروه تومور از خودش که گروه کنترل است، صفر حاصل می‌شود) (نمودار ۱ و جدول ۲). سپس از فرمول ۲ به توان ΔΔCt-، مقدار Fold Change (به مفهوم چند برابر بیان شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) محاسبه شد (جدول ۳ و نمودار ۲، ۳، ۴). از آنجایی که توزیع داده‌ها طبیعی بود، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (مقدار P آنالیز واریانس یک طرفه در جدول ۳، نتایج آزمون توکی در جدول ۴). سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار جنکس[۵] نسخه ۶/۱ (نرم‌افزار اختصاصی تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time-PCR) انجام شد.

یافته‌ها

یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد پروتکل تمرین هوازی، تاثیر معناداری بر بیان TIE-2 و VEGF-A در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان در گروه T+AE نسبت به گروه T نداشت. همچنین، پروتکل تمرین هوازی همراه کوئرستین تاثیر معناداری بر بیان TIE-2 در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان در گروه T+AE+Q در مقایسه با گروه T و گروه T+E نداشت، اما باعث کاهش معنادار بیان VEGF-A در مقایسه با گروه T و گروه T+E شد (جدول ۳). بیان VEGF-A در گروه T+E در مقایسه با گروه T، ۱/۵۰ برابر کاهش (غیرمعنادار) و بیان TIE-2، ۱/۰۸ برابر افزایش (غیرمعنادار) یافت (جدول ۳، نمودار ۲) به علاوه، در گروه T+AE+Q در مقایسه با گروه T، بیان VEGF-A، ۴/۰۹ برابر کاهش (معنادار) و بیان TIE2، ۱/۱۲ برابر کاهش (غیرمعنادار) یافت. (جدول ۳، نمودار۳) و در گروه T+AE+Q در مقایسه با گروه T+AE بیان VEGF-A، ۲/۷۲ برابر کاهش (معنادار) و بیان TIE2، ۱/۲۱ برابر کاهش (غیرمعنادار) یافت (جدول ۳، نمودار ۴).

جدول۲: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (ΔΔCt-) متغیرهای پژوهش

	VGEF-A	TIE2
تومور(T)	۰/۰۰ ± ۰/۲۵	۰/۰۰ ± ۰/۳۹
تومور+هوازی(T+E)	-۰/۵۸ ± ۰/۳۴	۰/۱۱ ± ۰/۴۰
تومور+هوازی+کوئرستین(T+AE+Q)	-۲/۰۳ ± ۰/۲۸	-۰/۱۵ ± ۰/۲۲



نمودار۱: مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (ΔΔCt-) متغیرهای پژوهش

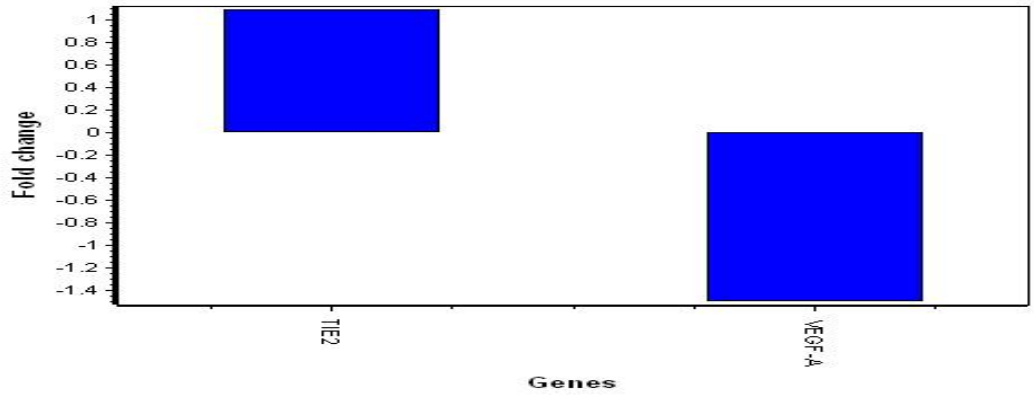
[2] Cycle of Threshold
[3] Delta CT
[4] Delta Delta CT
[5] GENEX

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

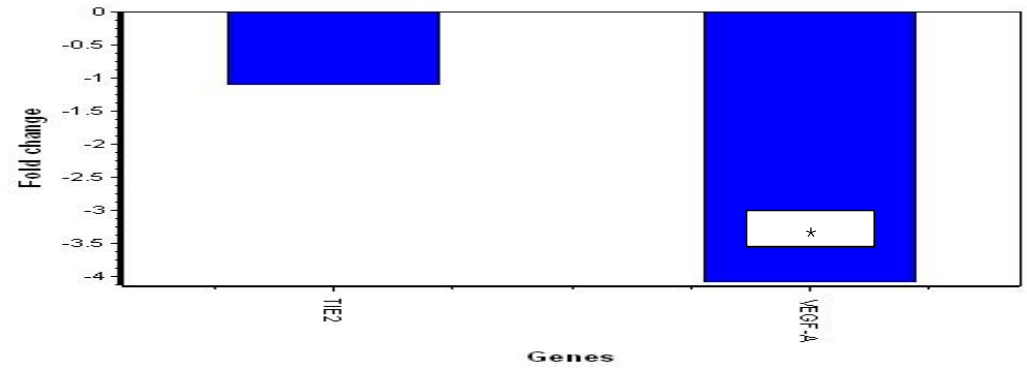
جدول ۳: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q) و گروه تومور+هوازی (T+AE) در مقایسه با گروه تومور(T)، نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q) در مقایسه با گروه تومور+هوازی (T+AE)، (Fold Change)، مقدار p و نتیجه تغییرات متغیرهای پژوهش

نام ژن‌ها	VEGF-A	TIE-2
Fold Change گروه تومور+هوازی نسبت به گروه تومور	-۱/۵۰	۱/۰۸
Fold Change گروه تومور+هوازی+کوئرستین نسبت به گروه تومور	-۴/۰۹	-۱/۱۲
Fold Change گروه تومور+هوازی+کوئرستین نسبت به گروه تومور+هوازی	-۲/۷۲	-۱/۲۱
P	* ۰/۰۰	۰/۷۶
نتیجه	اختلاف معنادار	اختلاف غیرمعنادار

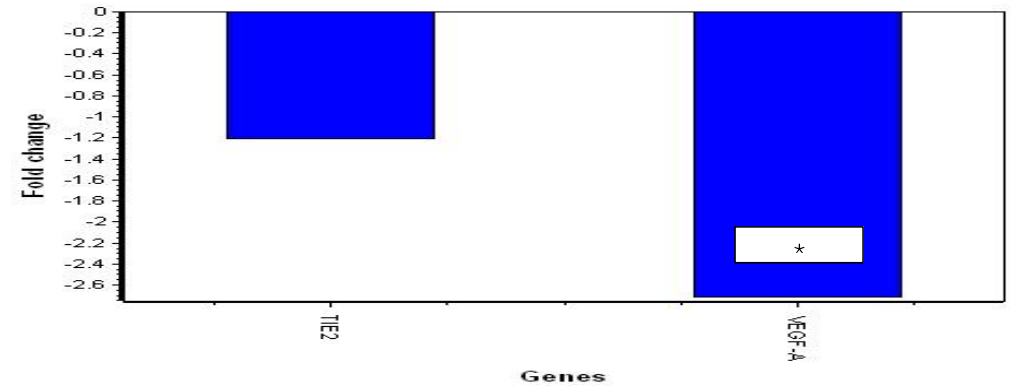
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)



نمودار ۲: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی (T+AE) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)



نمودار ۳: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)



نمودار ۴: نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q) در مقایسه با گروه تومور+هوازی (T+AE) (Fold Change)
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

جدول۴: آزمون توکی ویژه TIE-2 و VEGF-A در گروه‌های مختلف پژوهش

گروه‌ها	میانگین اختلاف (ΔΔCt)	مقدار P
آزمون توکی ویژه TIE-2		
تومور (T)		
تومور+هوازی (T+AE)	۰/۱۱	۰/۹۴
تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q)	۰/۱۵	۰/۹۰
آزمون توکی ویژه TIE-2		
تومور+هوازی (T+AE)	۰/۲۷	۰/۷۴
تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q)		
آزمون توکی ویژه VEGF-A		
تومور (T)		
تومور+هوازی (T+AE)	۰/۵۸	۰/۳۵
تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q)	۲/۰۳	*۰/۰۰
آزمون توکی ویژه VEGF-A		
تومور+هوازی (T+AE)	۱/۴۴	*۰/۰۰
تومور+هوازی+کوئرستین (T+AE+Q)		

*** نشانگر معنادار بودن اختلاف است (P<۰/۰۵)**

بحث

پژوهش‌ها نشان دادند که هم‌راستا با افزایش متاستاز و رشد تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان، مقادیر VEGF نیز افزایش می‌یابد. به همین علت VEGF به‌عنوان مهمترین عامل موثر بر آنژیوژنز، به‌عنوان یک هدف درمانی در سرکوب تومور در نظر گرفته می‌شود. پژوهش‌ها در زمینه فعالیت ورزشی نشان داده‌اند که ترکیب هایپوکسی با تمرین ورزشی منجر به تغییراتی در بیان VEGF می‌شود (۱۴).

در ارتباط با تاثیر تمرین ورزشی بر بیان VGEF-A در تومور، نتایج پژوهش حاضر با پژوهش تسای همسو و با نتایج پژوهش‌های خلیق‌فرد، شلمزاری، فائستینو روچا ناهمسو بود که ممکن است به دلیل متفاوت بودن نوع تمرین، طول دوره تمرین و یا شدت آن باشد. از طرفی احمدیان و همکاران، کاهش پروتئین TIE-2 را پس از ۲۰ هفته تمرین استقامتی تداومی در موش‌های بالب سی ماده مبتلا به سرطان پستان، گزارش داده اند (۱۱). اما در پژوهش حاضر ۶ هفته تمرین هوازی به تنهایی و یا بصورت تعاملی با مکمل کوئرستین، هیچ تاثیر معناداری بر بیان TIE-2 نداشت که امکان دارد به دلیل تفاوت در طول دوره تمرین باشد. غیر از این مورد، پژوهش دیگری که تاثیر تمرین ورزشی هوازی را بر بیان TIE-2 در بیماران سرطانی بررسی کرده باشد، یافت نشد. فواید تمرینات ورزشی برای بیماران مبتلا به سرطان به طور فزاینده‌ای آشکار شده است. مشخص شده است که تمرینات فیزیکی باعث کاهش بروز سرطان و مهار رشد تومور می‌شوند (۱۵). اما سازوکار تاثیر فعالیت ورزشی بر آنژیوژنز تومور و بافت تومور به‌طور کامل شناخته نشده است. مشخص شده است که تومور دارای محیطی ناهمگن با جریان خون و فشار برشی متغیر است. اندوتلیوم عروق تومور به دلیل تکثیر سریع سلول‌های تومور، در معرض PH کم و هیپوکسی است که این عوامل منجر به افزایش تولید عوامل پروآنژیوژنزی مانند VEGF می‌شود. از طرفی جریان خون و فشار برشی در عروق تومور نسبت به بافت سالم کمتر است که این امر نیز منجر به تحریک آنژیوژنز می‌شود، زیرا پژوهش‌ها نشان داده‌اند که هم پر خونی و فشار برشی زیاد و هم جریان خون کم و فشار برشی اندک (شرایط عروق تومور)، از طریق یک رابطه سینرژیک میان عوامل بیوشیمیایی و مکانیکی (فعال‌سازی کانال‌های یونی، کانال‌های کاتیونی و کانال‌های حساس به کشش در سلول‌های اندوتلیال، افزایش طولانی مدت Ca+2 درون سلولی و افزایش قابل توجه تولید نیتریک

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-09-26]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

اکساید) باعث تحریک آنژیوژنز می‌شود (۱۶). بنابراین از آنجایی‌که فشار برشی عروق تومور کمتر از فشار برشی عروق بافت سالم است، اگر تمرین ورزشی باعث افزایش فشار برشی و در نتیجه طبیعی شدن سطح فشار برشی در عروق تومور شود، ممکن است آنژیوژنز و بیان عوامل آنژیوژنزی همچون VEGF-A و TIE-2 کاهش یابد. در پژوهش حاضر ۶ هفته تمرین هوازی با شدت متوسط، باعث تغییر معناداری در بیان VEGF-A و TIE-2 نشد که ممکن است به دلیل این باشد که شدت تمرین برای بالا بردن فشار برشی به میزان کافی نبوده است.

همچنین فعالیت ورزشی، ممکن است به‌طور مستقیم از طریق توزیع مجدد برون ده قلبی، تاثیر مستقیمی بر فیزیولوژی تومور داشته باشد. در هنگام فعالیت ورزشی، جریان خون به عضلات اسکلتی فعال در پاسخ به پیام‌های موضعی عروق، به منظور رفع نیازهای متابولیسم، به‌طور قابل توجهی افزایش و از اکثریت اندام‌های احشایی و عضلات غیرفعال از طریق انقباض عروقی، کاهش می‌یابد. برخلاف تصور، پژوهشی در یک مدل موش مبتلا به سرطان پروستات، نشان داد که جریان خون تومور در زمان تمرین در حدود ۲۰۰٪ در مقایسه با گروه غیرفعال، افزایش می‌یابد و منجر به کاهش ۵۰٪ هیپوکسی در عروق تومور می شود که ممکن است این رخداد، در نتیجه کاهش همزمان گیرنده‌های مربوط به انقباض عروق (مخصوصا کاهش گیرنده آلفا آدرنرژیک) و کاهش تون میوژنیک (تون حاصل از فشار بالای داخل رگ) روی دهد (۱۷). در نتیجه اگر شدت تمرین به گونه‌ای باشد که باعث افزایش جریان خون تومور و در نتیجه کاهش هیپوکسی و اسیدوز در عروق تومور شود، ممکن است باعث کاهش بیان VEGF-A و TIE-2 و سایر عوامل پروآنژیوژنزی شود. بنابراین ممکن است دلیل دیگر بی‌تاثیر بودن پروتکل تمرینی پژوهش حاضر بر بیان VEGF-A و TIE-2 کم شدت بودن و یا کم بودن دوره تمرینی باشد. از طرفی در پژوهش حاضر تاثیر تعاملی تمرین هوازی و مصرف مکمل کوئرستین بر بیان VEGF-A و TIE-2 نیز بررسی شده است و نتایج پژوهش نشان داد که تعامل تمرین هوازی و کوئرستین باعث کاهش معنادار بیان VEGF-A نسبت به گروه تومور و گروه تمرین هوازی شد. اگرچه بر بیان TIE-2 تاثیر معناداری نداشت. کوئرستین با تعدیل مسیرهای WNT/catenin، PI3K / Akt / mTOR ،MAPK/ ERK1/2 و سایر مسیرهای ضدسرطانی، باعث کاهش رشد تومور می‌شود. کوئرستین با فعال‌سازی کاسپاز ۳، کاهش کاتنین و HIF-1 و مهار فسفوریلاسیون AKT، mTOR و ERK باعث از بین رفتن قابلیت زنده ماندن سلول‌های سرطانی می‌شود و باعث اتوفاژی و آپوپتوز در آن‌ها می‌شود. کوئرستین همچنین با کاهش ترشح VEGF و سطح MMP از آنژیوژنز و متاستاز جلوگیری می‌کند (۱۲). در این رابطه لینگکوان و همکاران، نیز تاثیر مصرف کوئرستین به میزان ۳٪ وعده غذایی موش‌ها، به مدت ۲۸ هفته، را بر بیان فاکتورهای آنژیوژنزی مانند فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) و پروتئین H-ras بررسی کردند و گزارش نمودند که مصرف کوئرستین باعث کاهش بیان تمامی این عوامل و مهار آنژیوژنز در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان می‌شود (۱۸). داکسیان ژائو و همکاران، نیز فعالیت‌های ضد آنژیوژنیک کوئرستین را در جنین گورخر ماهی و در سلول‌های اندوتلیال سیاهرگ بندناف انسانی[2] (HUVECs) بررسی کردند. نتایج نشان داد که کوئرستین، حیات سلول را در HUVECs مختل و بیان گیرنده فاکتور رشد اندوتلیال عروقی ۲ و تشکیل عروق جدید را مهار کرد. آن‌ها بیان کردند که کوئرستین دارای فعالیت ضدآنژیوژنیک قوی است و ممکن است به عنوان یک عامل ضد سرطان برای پژوهش‌های آتی، گزینه مناسبی باشد (۱۹). نتایج پژوهش حاضر با این دو پژوهش همسو بود. اگرچه هیچ پژوهشی که تاثیر تعاملی تمرین هوازی و کوئرستین را بر VEGF-A و TIE-2 در بیماران سرطانی، بررسی کرده باشد، یافت نشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش، تعامل تمرین هوازی و مصرف مکمل کوئرستین با کاهش بیان VEGF-A، می‌تواند روند آنژیوژنز بافت تومور را مختل و رشد تومور سرطان پستان را کاهش دهد. از این رو می‌توان تمرین ورزشی هوازی و مصرف کوئرستین را به‌عنوان راهکاری در کاهش رشد تومور در سرطان پستان پیشنهاد داد. اما چون پژوهش‌های اندکی اثر کوئرستین بر بیان VEGF-A را بررسی کرده‌اند و پژوهشی که تاثیر تعاملی مصرف

[2] Human Umbilical Vein Endothelial Cells

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

کوئرستین و فعالیت ورزشی هوازی را بر بیان VEGF-A در سرطان پستان بررسی کرده باشد، نیز یافت نشد، لذا پیشنهاد می‌شود در پژوهش‌های آتی، برای روشن شدن مکانیسم اثر، فاکتورها و دیگر عوامل درگیر در فرآیند آنژیوژنز ارزیابی شوند و تاثیر دوزهای مختلف مکمل کوئرستین بر بیان VEGF-A بررسی شود.

از طرفی براساس نتایج پژوهش حاضر، تمرین هوازی با شدت متوسط و یا تعامل تمرین هوازی با شدت متوسط و مکمل کوئرستین تاثیر معناداری بر بیان TIE2 نداشت و چون پژوهشی که اثر کوئرستین بر TIE-2 را به تنهایی و یا همراه با فعالیت هوازی بررسی کرده باشد، یافت نشد، لذا پیشنهاد می‌شود، در مطالعات آتی تاثیر تمرین هوازی با شدت های بالاتر و دوزهای مختلف مکمل کوئرستین بر بیان TIE2 بررسی شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تربیت دبیر شهید رجایی طبق قرارداد شماره ۳۲۲۹۳ مورخ ۹۷/۱۲/۲۶ انجام گردیده است و از تمامی افرادی که در این پژوهش همکاری کرده‌اند، به‌ویژه سرکار خانم دکتر فرشته شهیدی که در تمامی مراحل پژوهش، در کنارم بودند، تقدیر و تشکر می‌نمایم.

تعارض منافع

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

References

1. Jiang Y, Zou L, Lu WQ, et al. Foxo3a expression is a prognostic marker in breast cancer. PLoS One. 2013; 8(8):e70746.
2. Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, et al. The role of angiogenesis in solid tumours: an overview. Eur J Intern Med. 2009; 20(7):663-71.
3. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. The New England journal of medicine. 2008; 358(19): 2039-49.
4. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature. 2005; 438(7070):932-6.
5. Teicher, Beverly A, Ellis, Lee M, editors. Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy. 2nd ed. Texas: Humana Press. 2008; 208-12.
6. Hojman P, Gehl J, Christensen JF, Pedersen BK. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. Cell Metab. 2018; 27(1):10-21.
7. Shalamzari SA, 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.
8. Tsai MS, Kuo ML, Chang CC, Wu YT. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. Cancer Biomark. 2013; 13(5): 307-13.
9. Faustino-Rocha AI, Silva A, Gabriel J, Gil da Costa RM, Moutinho M, Oliveira PA, et al. Long-term exercise training as a modulator of mammary cancer vascularization. Biomed Pharmacother. 2016; 81(7):273-80.
10. Khalighfard S, Rajbi H, Gharakhanlou R, Setoudeh V. The Effect of 8 Weeks of Interval Aerobic Exercise before and after Induction of Breast Cancer on Serum Level of Irisin and Tumor Growth in Balb/c mice. Journal of Isfahan Medical School. 2018; 35(459):1775-84.
11. Ahmadian M, Azizbeigi K, Delfan M, Atashak S. Effects of 10 week continuous endurance training on angiopoietin-1 gene expression and the tie2 protein in mice with breast cancer. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2019; 41(1):7-13.
12. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The anti-cancer effect of quercetin: molecular implications in cancer metabolism.

[Downloaded from ijbd.ir on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]

International journal of molecular sciences. 2019; 20(13):3177.

13. Schebeleski-Soares C, Occhi-Soares RC, Franzoi-de-Moraes SM, et al. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against Trypanosoma cruzi infection in mice. Appl Physiol Nutr Metab. 2009; 34(4):659-65.
14. Nasiri M, Peeri M, Matinhomaei H. Endurance Training Attenuates Angiogenesis Following Breast Cancer by Regulation of MiR-126 and MiR-296 in Breast Cancer Bearing Mice. International Journal of Cancer Management. 2014; 17(4):231-58.
15. Moore SC, Lee IM, Weiderpass E, Campbell PT, Sampson JN, Kitahara CM, et al. Association of Leisure-Time Physical Activity With Risk of 26 Types of Cancer in 1.44 Million Adults. JAMA Intern Med. 2016; 176(6):816-25.
16. Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear stress regulated gene expression and angiogenesis in vascular endothelium. Microcirculation. 2014; 21(4):290-300.
17. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer. 2017; 17: 620-32.
18. Kong L, Wu K, Lin H. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis of experimental mammary carcinoma. Chinese Journal of Clinical Oncology. 2005; 2: 631-6.
19. Zhao D, Qin C, Fan X, Li Y, Gu B. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells. Eur J Pharmacol. 2014; 723: 360-7.

[Downloaded from ijbdi.com on 2022-06-18]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1400.14.3.6.7]
[DOI: 10.30699/ijbd.14.3.46]