

تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن $HIF-1\alpha$ ، $miR-21$ و $VEGF$ در موش های ماده بلب / سی مبتلا به سرطان پستان

راحله سلطانی^۱، محمدرضا کردی^{۲*}، عباسعلی گائینی^۳، رضا نوری^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه پردیس بین الملل کیش دانشگاه تهران، کیش، ایران

۲- دانشیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استاد، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه پردیس بین الملل کیش دانشگاه تهران، کیش، ایران

یافته / دوره بیست و یکم / شماره ۱ / بهار ۹۸ / مسلسل ۷۹

چکیده

دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۲۱۳ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۱/۱۳

مقدمه: سرطان سینه یکی از مهم ترین عوامل خطر و شایع ترین سرطان در زنان است که آنژیوژنز را تحت تأثیر قرار می دهد. تمرینات ورزشی می توانند فرایند آنژیوژنز در بافت تومور را کاهش دهند. هدف از تحقیق حاضر، بررسی تأثیر ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن $HIF-1\alpha$ ، $miR-21$ و $VEGF$ در موش های ماده بلب / سی مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش ها: ۱۶ سر موش ماده بلب سی (سن: سه تا پنج هفته و وزن: $0.1 \pm 17/1$ گرم) انتخاب و به شکل تصادفی به دو گروه تمرین هوازی و کنترل تقسیم شدند. تمرین هوازی شامل هشت هفته و پنج جلسه در هفته دویدن با شدت ۲۰-۱۴ متر بر دقیقه بود. بیان ژن $HIF-1\alpha$ ، $miR-21$ و $VEGF$ روش $RT\&PCR$ بررسی شدند. برای تجزیه و تحلیل داده ها از تحلیل واریانس مکرر، آزمون تعقیبی بانفرونی و تی مستقل استفاده شد و سطح معنی داری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته ها: نتایج نشان داد، تمرین هوازی موجب اختلاف معنادار در رشد حجم تومور و افزایش معنادار بیان ژن $HIF-1\alpha$ شد. همچنین تمرین هوازی باعث کاهش معنادار بیان ژن $miR-21$ شد درحالیکه تغییرات بیان ژن $VEGF$ معنادار نبود.

بحث و نتیجه گیری: به نظر می رسد، تمرین هوازی از طریق کاهش بیان ژن $miR-21$ و $VEGF$ موجب کاهش حجم تومور و بهبود سرطان شده است.

واژه های کلیدی: آنژیوژنز، سرطان پستان، تمرین هوازی، $HIF-1\alpha$ ، $miR-21$ ، $VEGF$.

*آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده علوم تربیت بدنی و علوم ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

پست الکترونیک: MrKordi@ut.ac.ir

مقدمه

فرایند آنژیوژنز، رشد مویرگ های جدید از مویرگ های قبلی تعریف شده است و شامل آغاز، تخریب غشاء پایه، مهاجرت، تکثیر، شکل گیری تیوب، تثبیت، ساخت غشاء پایه جدید باشد (۱). وقتی فاکتورهای رشد آنژیوژنیک نسبت به مهار کننده های آنژیوژنیک بیشتر ترشح می شوند، تعادل به سمت رشد عروق خونی پیش می رود. برعکس، وقتی مهار کننده ها به مقدار زیاد هستند، آنژیوژنز متوقف می شود. برای مثال در طی پیشرفت تومور در سرطان ها، عمل تنظیم کننده های مثبت غالب است و آنژیوژنز فعال است (۲،۳). سرطان پستان یکی از دلایل اصلی مرگ زنان در جهان بشمار می رود و آنژیوژنز بخش مهمی از این بیماری است (۴). آنژیوژنز تومور، فرایندی حیاتی در شکل گیری عروق خونی جدید می باشد و نقش بحرانی در رشد تومور، تهاجم و متاستاز بازی می کند (۱). بطور کلی، تومورها نمی توانند بدون شکل گیری عروق جدید جهت انتقال اکسیژن و مواد مغذی، بیشتر از ۱ تا ۲ میلی متر مکعب رشد قطری داشته باشند (۵) از این رو نیازمند فرایند آنژیوژنز هستند (۶). عامل رشد اندوتلیال عروقی (Vascular endothelial growth factor (VEGF))، یکی از فاکتورهای پیش آنژیوژنیک قوی است که تکثیر سلول های اندوتلیال را تحریک می کند و نفوذپذیری سلول ها را افزایش می دهد (۷). این فاکتور درگیر در رشد و متاستازی تومور می باشد (۸).

بیان VEGF در سلول های تومور تحت کنترل فاکتور القا کننده ی هایپوکسی ۱ آلفا (Hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)، فاکتور رونویسی ای که در شرایط هایپوکسی القا می شود، است و شامل دو زیر واحد HIF-1 α و HIF-1 β می باشد (۸). فاکتور فعال کننده ی رونویسی وابسته به اکسیژن یعنی HIF-1 α ، نقش مهمی در تنظیم تعداد زیادی از ژن های درگیر در آنژیوژنز، سازگاری متابولیکی نسبت به اکسیژن کم و بقا بازی می

کند (۹). در حضور اکسیژن، HIF-1 α سریعاً توسط پروتئازوم ها بعد از اصلاح رونویسی، تجزیه می شود (۱۰). اما در شرایط هایپوکسی، HIF-1 α ثابت باقی می ماند، در هسته جایگیری می کند و بصورت هتروداپمر با HIF-1 β ، تعداد زیادی از ژن های درگیر در بقا و رشد سلول های سرطانی را فعال می کند (۹). فراوانی HIF-1 α با پیش بینی سلول های سرطانی مرتبط می باشد (۱۱). طی آنژیوژنز تومور، فعالیت عامل القا کننده ی HIF-1 α در سلول های هایپوکسی شده، آغاز کننده ی بیان VEGF و گیرنده آن (VEGF receptors, VEGFR) است که رشد عروق داخل بافت های تومور هایپوکسی شده را تحریک می کند (۶). پژوهش های اخیر نشان داده اند مسیر پیام دهی HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 درگیر در تکثیر سلول اندوتلیال، تمایز، مهاجرت و نیز نفوذ پذیری عروقی است (۱۲).

میکرو RNA ها (miRNAs)، به عنوان گروه خاصی از تنظیم کننده های ژنی، خانواده ای از RNAs تک رشته ای کوچک اندوژنی با طول بین ۲۱ و ۲۵ نوکلئوتید هستند. مطالعات اخیر نشان داده اند miRNAs به عنوان سرکوب کننده ی تومور یا انکوژنز عمل می کنند و نقش های کلیدی در تکثیر سلول های تومور و اپوپتوز سلول های تومور بازی می کنند (۱۳،۱۴). در تنظیم بیان VEGF نیز نقش دارند (۱۳،۱۴). مطالعات آزمایشگاهی بر چندین نوع سرطان نشان داده اند که تخریب miR-21 باعث سرکوب تکثیر سلولی و رشد تومور می شود، و نیز کاهش تهاجم متاستازی را به دنبال دارد (۱۵،۱۶). فعالیت بدنی و تمرین ورزشی به عنوان فاکتورهایی که می توانند اثرات مفیدی در جلوگیری و کنترل سرطان داشته باشند، پیشنهاد شده اند. با این وجود، ارتباط پیچیده ی بین این فاکتورها و رفتار بیولوژیکی سرطان بطور کامل مشخص نمی باشد (۱۷). قبلاً بیان کرده اند تمرین ورزشی، نقش حفاظتی در برابر سرطان های مختلف مانند ریه، بازی می کند (۱۷).

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه‌ی تجربی، ۱۶ سر موش ماده بآل سی (Balb/c) سه تا پنج هفته و دامنه وزن $0/1 \pm 17/1$ گرم در شرایط کنترل شده در دمای 22 ± 3 درجه سانتیگراد تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد قرار گرفتند و بدون هیچگونه محدودیتی در غذا و آب، در قفس‌های پلی اتیلن نگهداری شدند. سپس، موش‌ها به مدت دو هفته برای آشناسازی با اجرای برنامه ورزشی به تمرین پرداختند و به شکل تصادفی به دو گروه تمرین (T) و کنترل (C) تقسیم شدند. پس از مشخص شدن گروه‌ها، همه‌ی موش‌ها در دو گروه با تزریق زیر جلدی سلول‌های سرطانی MC4-L2 به سرطان مبتلا شدند. گروه تمرین، پس از ایجاد سرطان، تمرینات را به مدت هشت هفته ادامه دادند. موش‌های گروه کنترل نیز به زندگی طبیعی خود همراه با حمل تومور، ادامه دادند. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه‌ی تمرین، موش‌ها برای سنجش متغیرهای پژوهشی قربانی شدند. در مراحل مختلف، ضمن رعایت مسایل اخلاقی سعی شد از هر گونه آزار جسمی و روش غیر ضروری اجتناب گردد (مجوز کد اخلاق از پژوهشگاه تربیت بدنی به شماره IR.SSRI.REC.1395.129).

برنامه تمرین هوازی شامل دویدن بر روی نوار گردان (بصورت اجباری) به مدت هشت هفته و پنج جلسه در هفته بود. تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه شروع شد و در نهایت در دو هفته آخر به سرعت ۲۰ متر در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه افزایش یافت. از آن جایی که در تمرین هوازی روی نوارگردان، شدت و مدت تمرین به راحتی تحت کنترل پژوهشگر می‌باشد، در پژوهش حاضر از مدل تمرینی فوق استفاده شد (۲۶). جزئیات هر جلسه تمرینی در جدول ۱ ارائه شده است.

مطالعات مروری نتیجه گرفتند تمرین یک مداخله‌ی حمایتی ایمن و قابل اجرای مرتبط با بهبود معنی دار در کیفیت زندگی، خستگی، تحمل تمرین و قدرت عضلانی در جمعیت سرطانی می‌باشد (۱۸). به علاوه، چندین مطالعه‌ی اپیدمیولوژیکی نشان دادند تمرین منظم با شدت متوسط با کاهش ۳۰-۵۰٪ در خطر مرگ ناشی از سرطان در ارتباط می‌باشد (۱۸، ۱۹). تمرین ورزشی بخصوص نوع استقامتی با تاثیر بر مراحل آنژیوژنز می‌تواند باعث تغییر در فرایند آنژیوژنز (۲۰) و کاهش آنژیوژنز در بافت تومور پستان گردد (۲۱). نتایج یک مطالعه‌ی مروری بیان کرده است که تمرین حاد می‌تواند بطور موقت بیان *miR-21* را تنظیم مثبت کند (۲۲). با مرور مطالعات پیشین می‌توان به نقش دوگانه‌ی تمرین ورزشی بر فرایند آنژیوژنز در افراد سالم و بیمار پی برد. برای مثال، اجرای تمرین ورزشی در افراد سالم منجر به افزایش فرایند آنژیوژنز در بافت‌های مختلف بخصوص بافت عضلانی (۲۳)، در افراد بیمار مبتلا به دیابت نوع دو باعث افزایش آنژیوژنز در بافت قلب (۲۴) و کاهش آنژیوژنز در بافت کلیه (۲۵) و در بیماران مبتلا به سرطان پستان موجب کاهش آنژیوژنز در بافت تومور (۲۱) می‌گردد. تفاوت در اثرات ناشی از تمرین ورزشی بر فرایند آنژیوژنز بافت‌ها، نشان دهنده اثربخشی تمرین ورزشی از طریق فعال کردن یا مهار کردن مکانیسم‌های موثر بر فرایند آنژیوژنز در آن بیماری و بافت می‌باشد.

تاکنون پژوهش‌های بسیار محدودی بطور مستقیم در مورد تاثیر تمرین هوازی بر بیان فاکتورهای *HIF-1 α* ، *miR-21* و *VEGF* در سرطان صورت گرفته است و با توجه به نقش کلیدی این متغیرها و فاکتورهای دیگر در التهاب، رشد و متاستاز سلول‌های توموری و تاثیر احتمالی تمرینات هوازی بر میزان بیان این فاکتورها در سرطان، پژوهش حاضر به بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان فاکتورهای *HIF-1 α* ، *VEGF* و *miR-21* در موش‌های مبتلا به سرطان پستان پرداخته است.

تومور از فرمول جونز و همکاران $V=\pi/6(L2 \times W)$ استفاده شد (۱۸).

۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های هر دو گروه، پس از بیهوش شدن با محلول کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) قربانی شدند. سپس بافت تومور آنها جدا گردید و قسمت نکروز شده آن حذف شد و قسمت رویی تومور بلافاصله در ازت مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. در آزمایشگاه ۱۰۰-۵۰ میلی گرم بافت تومور به همراه یک سی سی ترایزول در لوله هموژن دستی ریخته شد و بافت هموژن شد. سپس سوسپانسیون رویی حاصل جهت استخراج RNA به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد. میکروتیوپ ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد با ۱۵۰۰ سانتریفوژ شدند تا اجزاء بزرگتر رسوب نمایند. برای بررسی بیان ژن های HIF- α ، miR-21 و VEGF در هر گروه بررسی بافت ها با تکنیک Real Time PCR استفاده شد.

مراحل استخراج RNA تام بر اساس دستور العمل استفاده از ترایزول بطور دقیق اجرا شد، با این تفاوت که برای استخراج miR-21 پس از اضافه نمودن ترایزول، انکوبه نمودن در دمای ۷۰- درجه به مدت یک شبانه روز انجام شد. به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- نگهداری شد و سپس مراحل بعدی استخراج به ترتیب انجام شد. برای ساخت cDNA miR-21، VEGF و HIF- α کیت استراتاژن مورد استفاده قرار گرفت. در ابتدای کار میزان غلظت بهینه cDNA و همچنین پرایمرهای مربوط به هر ژن با استفاده از آزمایش سریال غلظت برای هر کدام به طور جداگانه مشخص شد. برنامه Real time & PCR بر روی دستگاه کوریت برای ژن HIF-1 α و VEGF در دمای ۹۵ °C به مدت ۵ دقیقه و سپس ۴۵ سیکل ۹۵ °C به مدت ۲۰ ثانیه و ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه بود. برای miR-21 شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل

جدول ۱. پروتکل تمرین هوازی در مراحل آشنا سازی و دوره هشت هفته ای تمرین

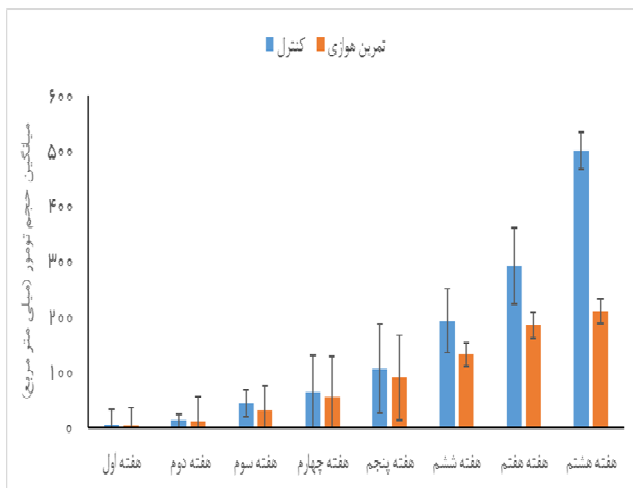
دوره تمرین	سرعت (متر/دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار
مرحله آشناسازی	۱۲-۱۰	۳۰	۵
دو هفته اول	۱۴	۳۰	۵
دو هفته دوم	۱۶	۳۵	۵
دو هفته سوم	۱۸	۴۰	۵
دو هفته چهارم	۲۰	۴۵	۵

سلول های کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (MC4-L2) در فلاکس T75 در محیط DMEM/F-12 یا ۱۵ میلی مول بافر HEPES، پنی سیلین ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ ، گلوتامین، استرپتومایسین ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ و PBS ۱۰ درصد کشت داده شدند. مایع رویی پس از پر کردن ۹۰ درصد سطح فلاکس بوسیله سلول ها برداشته شد و بعد از شستشوی آن با PBS، با آنزیم تریپسین ۲۵ درصد کف پلیت سلول ها جدا شده و پس از خنثی سازی آنزیم با محیط حاوی PBS ۱۰ درصد، همه محتویات فلاکس داخل لوله فالکون ریخته شد و به مدت سه تا پنج دقیقه با ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد، سپس مایع رویی برداشته شد و در داخل محیط حاوی PBS ۱۰ درصد حل شد. در نهایت از تریپان پلو و لام هماسیتومتر برای تعیین زنده ماندن و شمارش سلولی استفاده شد.

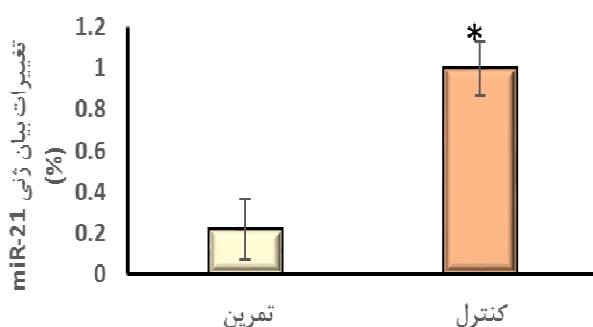
پس از کشت سلول ها، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی لیتر بافر PBS تهیه شد. موش ها توسط کتامین (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (۱۰ mg/kg) (۱۰ بیهوش شدند و یک میلیون سلول به شکل زیر جلدی به ناحیه بالای ران سمت راست تزریق گردید. شمارش بعد از ۱۰ الی ۱۴ روز، تومور در محل تزریق قابل لمس بود و با روش های آزمایشگاهی و تشخیص پزشکی از طریق مشاهده تصویر پاتولوژیکی، تومور سرطانی تایید شد. پس از پیدایش تومور، هر هفته بزرگ ترین بعد تومور به عنوان طول (L) و بعد دیگر به عنوان عرض (W) با کولیس دیجیتالی اندازه گیری شد. برای محاسبه حجم

معناداری وجود دارد ($t_{14}=6/32, P<0/001$). همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌کنید در گروه تمرین ($1/9 \pm 0/6$) کاهش معنادار در بیان ژن HIF-1 α نسبت به گروه کنترل ($1/00 \pm 0/1$) روی داده است.

نتایج آزمون t مستقل برای بیان ژن VEGF نشان داد که بین دو گروه اختلاف معناداری وجود ندارد ($t_{14}=1/72, P<0/087$). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌کنید در گروه تمرین ($0/71 \pm 0/38$) عدم کاهش معنادار در بیان ژن VEGF نسبت به گروه کنترل ($0/2 \pm 0/1$) روی داده است.



شکل ۱. روند تغییرات حجم تومور در دو گروه پژوهش ($p<0.05$).



شکل ۲. روند تغییرات بیان ژن miR-21 بر حسب fold change در دو گروه. * نشانگر تفاوت معنادار دو گروه می‌باشد ($p<0.05$).

۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. از GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) به عنوان ژن کنترل و HIF- α و VEGF و از U6 به عنوان ژن کنترل miR-21 استفاده شد.

آنالیز آماری

داده‌ها توسط نرم افزار SPSS با ورژن ۱۶ تحلیل شدند. ابتدا طبیعی بودن داده‌ها توسط آزمون کلموگروف اسمیرنوف تایید شد. جهت بررسی تغییرات رشد حجم تومور از تحلیل واریانس مکرر و آزمون تعقیبی بن فرونی و برای بررسی تغییرات بیان ژن HIF- α ، miR-21 و VEGF از آزمون تی مستقل استفاده شد. سطح معنی داری $P<0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

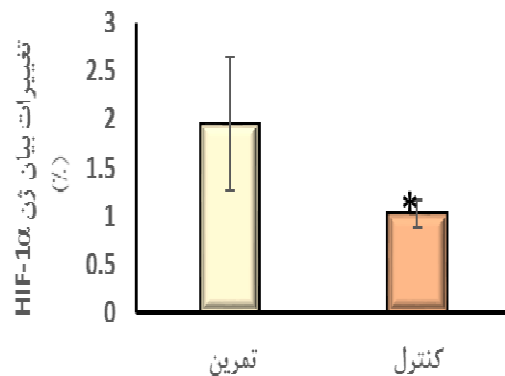
نتایج نشان داد، بین رشد حجم تومور دو گروه، اختلاف معناداری وجود دارد ($t_{14}=3/68, P=0/028$). همچنین با در نظر گرفتن تعامل بین زمان‌های اندازه‌گیری تومور و نوع گروه نیز، نتایج وجود اختلاف معناداری را نشان داد ($P=0/001$). با مراجعه به شکل تعامل مشخص می‌شود که از هفته‌های ششم تا هشتم تفاوت معنادار در حجم تومور وجود دارد و حجم تومور در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل میزان افزایش بسیار کمتری داشته است (شکل ۱).

نتایج تحلیل آماری با استفاده از آزمون t مستقل برای بیان ژن miR-21 نشان داد که بین دو گروه اختلاف معناداری وجود دارد ($t_{14}=1/84, P<0/034$). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌کنید در گروه تمرین ($0/2 \pm 0/05$) کاهش معنادار در بیان ژن miR-21 نسبت به گروه کنترل ($1/00 \pm 0/09$) روی داده است.

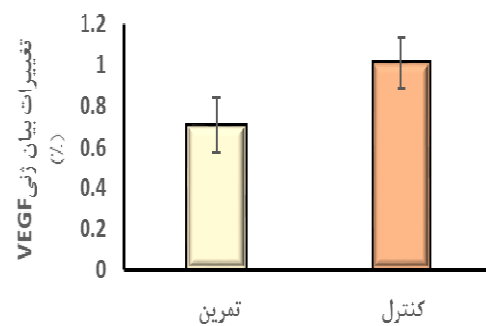
نتایج تحلیل آماری با استفاده از آزمون t مستقل برای بیان ژن HIF-1 α نشان داد که بین دو گروه اختلاف

و آنژیوژنیک اش را از طریق رسپتور تیروزین کیناز که رسپتورهای VEGFR1 و VEGFR2 نامیده می شود، اعمال می کند، این رسپتورها بر روی سلول های اندوتلیال سرخرگ قرار دارند. تومورها برای زنده ماندن از عروق خونی استفاده می کنند و رشد سلول های تومور به آنژیوژنز منجر می شود (۲۷،۲۸). HIF-1 α در سلول های هایپوکسی شده، فعال می شود و آغاز کننده ی بیان VEGF می باشد (۶). بر اساس شواهد، مهار عصبی عروقی از طریق سرکوب مسیر پیام دهی HIF-1 α /VEGF/VEGFR2 می تواند رشد تومور را به تاخیر اندازد و حتی سلول های توموری از گرسنگی بمیرند (۲۹). افزایش بیان HIF-1 α و یا VEGF منجر به فعال شدن آنژیوژنز می شود که مرتبط با افزایش رشد سرطان، افزایش تهاجم و متاستازی سلول های تومور می باشد (۹-۱۱). miR-21 نیز از طریق هدف قرار دادن PTEN (Phosphatase and tensin homolog) منجر به فعال شدن سیگنالینگ AKT و ERK1/2 (Extracellular signal-regulated kinases 1/2) شده و از این رو بیان HIF-1 α و VEGF افزایش یافته که در نهایت، آنژیوژنز را موجب می شود (۳۰).

مطالعات بیان کرده اند اجرای فعالیت بدنی قبل و بعد از تشخیص سرطان پستان، مرتبط با کاهش خطر عود یا مرگ ناشی از سرطان می باشد (۲۸،۳۱). همچنین یافته های اخیر در موش های نر نشان داده اند که تمرین ورزشی، قادر به کاهش گسترش متاستازی سلول های سرطانی در مغز می باشد (۳۲). نتایج مطالعات نشان داده اند ۴ تا ۶ هفته فعالیت بدنی، زمان زنده ماندن بیمار سرطانی را افزایش می دهد درحالیکه بعضی از مطالعات دیگر آن را تایید نکرده اند (۲۸،۳۱). مطالعات دیگری گزارش کرده اند زنانی که دارای ۲۱۹ هفته یا بیشتر فعالیت بدنی هستند، در مقایسه با زنان بی تحرک، دارای ریسک کمتر مرگ ناشی از سرطان هستند (۲۷،۲۸). در



شکل ۳. روند تغییرات ژن HIF-1 α بر حسب fold change در دو گروه. * نشانگر تفاوت معنادار دو گروه می باشد (p<0.05).



شکل ۴. روند تغییرات ژن VEGF بر حسب fold change در دو گروه (p<0.05).

بحث و نتیجه گیری

هدف از مطالعه ی حاضر، بررسی اثر ۸ هفته تمرین هوازی بر بیان ژن miR-21، VEGF و HIF-1 α در موش های مبتلا به سرطان پستان بود. نتایج نشان داد، هشت هفته تمرین هوازی باعث کاهش معنادار رشد تومور، بیان ژن miR-21، افزایش معنادار بیان ژن HIF-1 α و عدم تغییر (کاهش غیر معنادار) بیان ژن VEGF در گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل شد. یافته های بدست آمده از مطالعات بیان کردند که القای سرطان در موش ها موجب افزایش معنادار بیان VEGF می شود. VEGF، یکی از فاکتورهای بسیار مهم محرک آنژیوژنز می باشد که فعالیت های میتوژنیک

نشان داد که مستقل از سطوح فعالیت ورزشی، افراد دارای VO_{2max} بالاتر از کاهش بیان ژن $miR-21$ پایه در مقایسه با آزمودنی های با VO_{2max} کمتر برخوردار هستند (۳۷). مکانیسم تأثیر فعالیت ورزشی و بخصوص تمرین هوازی بر miR ها و رابطه ی آنها با $VEGF$ بخوبی مشخص نشده است اما احتمالاً فعالیت ورزشی، $miRNAs$ درگیر در تکثیر سلول، تهاجم و متاستازی را تنظیم می کند. $miR-21$ توسط تمرین مقاومتی و استقامتی تغییر می کند (۳۸) و همچنین در تهاجم تومور شرکت دارد. در حقیقت، مطالعات آزمایشگاهی نشان داده اند که در چندین نوع از سرطان، نقص $miR-21$ در موش، سرکوب تکثیرزایی سلول و رشد تومور را نشان داده است و تهاجم و متاستازی نیز کاهش یافته است (۱۵). به علاوه، $miR-21$ بطور منفی سرکوب کننده ی تومور مرگ برنامه ریزی شده $4 (PDCD4)$ و تنظیم پایین دستی هدف های پیام دهی در ردیف سلول های کلورکتال می باشد (۳۷). تمرین هوازی می تواند بطور موقت بیان $miR-21$ را تنظیم کرده و کاهش دهد (۳۸). با کاهش بیان $miR-21$ در داخل سلول های سرطانی، تمرین، فعالیت $PDCD4$ و $PTEN$ را بازیابی می کند و تکثیر سلول های سرطانی را محدود می کند. این مسیر، توسط مطالعات پیشین که بیان کرده اند فعالیت ورزشی قادر به تنظیم $miR-21$ داخل بافت ها و یا مایعات مانند بافت عضله در موش ها (۳۹) و نیز در پلاسمای آزمودنی های انسانی سالم و بیماران مبتلا به سرطان پستان (۴۰) است، تایید شده است. مهار $miR-21$ با تمرین هوازی باعث سرکوب مسیر پیام دهی می شود. همچنین مهار $miR-21$ به کاهش معنادار در رشد تومور و فعالیت کاسپاز منجر می شود (۳۷).

پژوهش های اخیر نشان داده اند مسیر پیام دهی $HIF-1\alpha/VEGF/VEGFR2$ درگیر در تکثیر سلول اندوتلیال، تمایز، مهاجرت و نیز نفوذ پذیری عروقی است

مطالعه ی ما، گروه تمرین هوازی نسبت به گروه کنترل دارای افزایش معناداری در بیان ژن $HIF-1\alpha$ بود. تمرینات طولانی مدت هوازی منجر به افزایش هایپوکسی در بیماران می گردد و در این شرایط افزایش چشمگیری در بیان ژن و پروتئین $HIF-1\alpha$ رخ می دهد. کمپلکس $HIF-1\alpha$ بعد از شکل گیری می تواند عناصر واکنش دهنده به هایپوکسی را که روی ژن های هدف قرار دارند، شناسایی کند (۳۳). تمرین یک محرک فیزیولوژیک قوی است که عمیقاً تقاضای میتوکندری برای O_2 / تحویل سوبسترا در عضله ی اسکلتی و عضله ی قلبی را افزایش می دهد. این تغییر در تقاضا می تواند بصورت غیر مستقیم O_2 / سوبسترا را از تومور به بافت هایی که از نظر متابولیسی فعال هستند (برای مثال، قلب، عضله ی اسکلتی) هدایت کند. در این حالت جهت در دسترس سوبسترا، $HIF-1\alpha$ جهت حفظ هومئوستازی سلولی، فعال می شود (۳۴،۳۵). تلاش های تکراری تمرین استقامتی می تواند فعالیت $HIF-1\alpha$ را افزایش دهد و منجر به افزایش پرفیوژن شود (۳۴). تمرین موجب افزایش رهایی سایتوکاین های مشتق شده از عضلات و افزایش لیگاندهای متصل به اتصالات گیرنده های تیروزین کیناز بر روی تومور و سلول های اندوتلیال شود تا بیان $HIF-1\alpha$ به ثبات برسد که این امر بر اثر سازگاری نسبت به تمرین رخ می دهد (۳۶). $HIF-1\alpha$ هدف پایین دستی مهم $miR-21$ در تنظیم کردن آنژیوژنز تومور می باشد (۳۰). احتمالاً کاهش بیان ژن $miR-21$ در بافت تومور به اندازه ای نبوده که بتواند بیان آن را کاهش دهد.

نتایج ما همچنین نشان داد که تمرین هوازی باعث کاهش معنادار بیان ژن $miR-21$ و کاهش غیر معنادار بیان ژن $VEGF$ در گروه تمرین هوازی می شود. همسو با نتایج ما، نیلسن و همکاران گزارش کردند بیان پایه $miR-21$ بعد از فعالیت ورزشی مزمین کاهش می یابد در حالیکه نتایج بدست آمده از مشاهدات بای و همکاران

در نهایت، نتایج نشان داد اجرای تمرین هوازی باعث افزایش بیان ژن HIF-1 α ، کاهش غیر معنادار بیان ژن VEGF، کاهش معنادار بیان ژن miR-21 شد. بطور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد، تمرین هوازی منظم می تواند نقش مؤثری در کاهش فعالیت miR-21 و حجم تومور داشته و احتمالاً اثر تنظیم کنندگی بر تولید HIF-1 α و VEGF نیز دارا می باشد و از این طریق می تواند موجب کاهش روند رشد تومور پستان در موش ها شود.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر برگرفته از بخشی از رساله دکتری با گرایش فیزیولوژی ورزشی می باشد و بدین وسیله از زحمات اساتید بزرگوار و دوستان عزیز که در اجرای پژوهش همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

(۱۲). از آنجا که بیان ژن HIF-1 α بر اثر تمرین هوازی افزایش یافته است و این فاکتور یکی از عوامل موثر بر فعال شدن بیان ژن VEGF می باشد ما انتظار افزایش بیان ژن VEGF در تومور سرطانی را داشتیم ولی کاهش غیر معنادار آن در این مطالعه را می توان به کاهش معنادار بیان ژن miR-21 در این گروه نسبت داد. miR-21 انکوژن کلیدی است که بطور وسیعی در اکثر سرطان ها بیان می شود (۴۱). عیسی نژاد و همکاران به بررسی اثر ترکیب تمرین اینتروال با هر یک از دو داروی تاموکسیفن و لتروزول بر miR-21 و VEGF در موش های مبتلا به سرطان پستان پرداختند. نتایج، کاهش معنادار و تنظیم پایینی miR-21 و VEGF را نشان دادند که همسو با نتایج مطالعه ی حاضر بود، همچنین کاهش حجم تومور را در گروه تمرینی و هر دو نوع دارو نشان دادند (۴۰) که همسو با نتایج ما بود. همسو با نتایج مطالعه ی ما، تمرین اینتروال شدید با ۸۵٪ VO₂max، سه جلسه در هفته و ۳۰ دقیقه در روز به مدت ۱۰ هفته سبب افزایش طول عمر و کاهش رشد تومور در رت های ویستار مبتلا به تومور شد (۴۲). با توجه به کاهش حجم تومور در گروه تمرین هوازی، احتمالاً اثرات تمرین ورزشی بر حجم تومور و آنژیوژنز آن بستگی به شدت، مدت و نوع تمرین دارد که می تواند به عنوان محرک یا مهار کننده ی بیان ژن های موثر بر فرایند آنژیوژنز نقش خود را ایفا کند.

References

1. Kota SK, Meher LK, Jammula S, Kota SK, Krishna S, Modi KD. Aberrant angiogenesis: The gateway to diabetic complications. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2012;16(6):918.
2. Kalkunte S, Brard L, Granai CO, Swamy N. Inhibition of angiogenesis by vitamin D-binding protein: characterization of anti-endothelial activity of DBP-maf. *Angiogenesis*. 2006;8(4):349.
3. Roskoski Jr R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2007;62(3):179-213.
4. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-92.
5. Ribatti D. The discovery of antiangiogenic molecules: a historical review. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(4):52-345.
6. Zhao D, Tu Y, Wan L, Bu L, Huang T, Sun X, et al. In vivo monitoring of angiogenesis inhibition via down-regulation of mir-21 in a VEGFR2-luc murine breast cancer model using bioluminescent imaging. *PloS one*. 2013;8(8):e71472.
7. Karamysheva A. Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 2008;73(7):751.
8. Lv D, Cui P-L, Yao S-W, Xu Y-Q, Yang Z-X. Melatonin inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2012;2. 6-310:(4)4.
9. Li G, Shan C, Liu L, Zhou T, Zhou J, Hu X, et al. Tanshinone IIA inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway. *PloS one*. 2015;10(2):e0117440.
10. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-8.
11. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(6):1831-7.
12. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *Journal of clinical oncology*. 2005;23(5):1011-27.
13. Shi M, Guo N. MicroRNA expression and its implications for the diagnosis and therapeutic strategies of breast cancer. *Cancer treatment reviews*. 2009;35(4):328-34.
14. Lowery AJ, Miller N, McNeill RE, Kerin MJ. MicroRNAs as prognostic indicators and therapeutic targets: potential effect on breast cancer management. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(2):360-5.
15. Si M, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007;26(19):2799.
16. Wang N, Zhang C-q, He J-h, Duan X-f, Wang Y-y, Ji X, et al. MiR-21 down-regulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in

- esophageal carcinoma. *Digestive diseases and sciences*. 2013;58(7):1863-70.
17. Westerlind KC. Physical activity and cancer prevention—mechanisms. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2003;35(11):1834-40.
 18. 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*. 2009;108(2):343-8.
 19. Holick CN, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Titus-Ernstoff L, Bersch AJ, Stampfer MJ, et al. Physical activity and survival after diagnosis of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2008;17(2):379-86.
 20. Egginton S. Invited review: activity-induced angiogenesis. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*. 2009;457(5):963.
 21. 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*. 2017;10(6).
 22. Tonevitsky AG, Maltseva DV, Abbasi A, Samatov TR, Sakharov DA, Shkurnikov MU, et al. Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC physiology*. 2013;13(1):9.
 23. Wahl P, Jansen F, Achtzehn S, Schmitz T, Bloch W, Mester J, et al. Effects of high intensity training and high volume training on endothelial microparticles and angiogenic growth factors. *PLoS One*. 2014;9(4):e96024.
 24. Valizadeh S, Motamedi P, Karami H, Rajabi H. The Effects of Endurance Training on Gene Expression of VEGF and VEGFR2 of Cardiac Tissue in Type 2 Diabetic Male Wistar. *Journal of Arak University of Medical Sciences*. 2018;21(6):107-18.
 25. Faleiros CM, Francescato HD, Papoti M, Chaves L, Silva CG, Costa RS, et al. Effects of previous physical training on adriamycin nephropathy and its relationship with endothelial lesions and angiogenesis in the renal cortex. *Life sciences*. 2017;169:43-51.
 26. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350.
 27. Shirali S, Barari A, Hosseini SA, Khodadi E. Effects of six weeks endurance training and aloe vera supplementation on COX-2 and VEGF levels in mice with breast cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. 2017;18(1):31.
 28. Thill M, Fischer D, Becker S, Cordes T, Dittmer C, Diedrich K, et al. Prostaglandin metabolizing enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines. *Anticancer research*. 2009;29(9):3619-25.
 29. Kafousi M, Vrekoussis T, Tsenteliero E, Pavlakis K, Navrozoglou I, Dousias V, et al. Immunohistochemical study of the angiogenic network of VEGF, HIF1 α , VEGFR-2 and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human breast cancer. *Pathology & Oncology Research*. 2012;18(1):33-41.

30. Liu L-Z, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, et al. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PloS one*. 2011;6(4):e19139.
31. Roy R, Yang J, Moses MA. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(31):5287.
32. Wolff G, Davidson SJ, Wrobel JK, Toborek M. Exercise maintains blood-brain barrier integrity during early stages of brain metastasis formation. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;463(4):811-7.
33. Myllyharju J, Koivunen P. Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylases: common and specific roles. *Biological chemistry*. 2013;394(4):435-48.
34. Jones LW, Antonelli J, Masko EM, Broadwater G, Lascola CD, Fels D, et al. Exercise modulation of the host-tumor interaction in an orthotopic model of murine prostate cancer. *Journal of applied physiology*. 2012;113(2):263-72.
35. Wagner PD. Muscle intracellular oxygenation during exercise: optimization for oxygen transport, metabolism, and adaptive change. *European journal of applied physiology*. 2012;112(1):1-8.
36. Hojman P, Dethlefsen C, Brandt C, Hansen J, Pedersen L, Pedersen BK. Exercise-induced muscle-derived cytokines inhibit mammary cancer cell growth. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2011;301(3):E504-E10.
37. Dufresne S, Rébillard A, Muti P, Friedenreich CM, Brenner DR. A Review of Physical Activity and Circulating miRNA Expression: Implications in Cancer Risk and Progression. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 2018;27(1):11-24.
38. Baggish AL, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker BA, Thompson PD, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *Journal of applied physiology*. 2014;116(5):522-31.
39. Aoi W, Naito Y, Mizushima K, Takanami Y, Kawai Y, Ichikawa H, et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2010;298(4):E799-E806.
40. Isanejad A, Alizadeh AM, Shalamzari SA, Khodayari H, Khodayari S, Khori V, et al. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life sciences*. 2016;151:30-40.
41. Melnik BC. MiR-21: an environmental driver of malignant melanoma? *Journal of translational medicine*. 2015;13(1):202.
42. Tsai M-S, Kuo M-L, Chang C-C, Wu Y-T. The effects of exercise training on levels of vascular endothelial growth factor in tumor-bearing mice. *Cancer Biomarkers*. 2013;13(5):307-13.

The effects of 8 weeks aerobic training on HIF-1 α , miR-21 and VEGF gene expression in female Balb/c with breast cancer

Soltani R¹, Kordi M^{*2}, Gaeini A³, Nuri R⁴

1. PHD student, Department of Exercise Physiology, University of Tehran Kish International campus, Kish, Iran

2. Associate professor, Department of Exercise Physiology, University of Tehran, Tehran, Iran, MrKordi@ut.ac.ir

3. Professor, Department of Exercise Physiology, University of Tehran, Tehran, Iran

4. Assistant professor, Department of Exercise Physiology, University of Tehran Kish International campus, Kish, Iran

Received: 13 Jan 2019

Accepted: 2 Feb 2019

Abstract

Background: Breast cancer, which is a major cancer for women, affects the angiogenesis process. Exercise training can decrease the process of angiogenesis in tumor tissue. The aim of present study was to investigate the effects of 8 weeks of aerobic training on HIF-1 α , miR-21 and VEGF gene expression in female Balb/c mice with breast cancer.

Materials and Methods: 16 female Balb/c mice (age: 3-5 weeks and weight: 17/1 \pm 0.1 g) were selected and randomly divided into two groups: aerobic training and control. The aerobic training involved running with intensity of 14-20 m/min for 5 sessions per week over 8 weeks. The gene expression of HIF-1 α , miR-21 and VEGF was examined by RT&PCR. The repeated measurement ANOVA, Bonferroni post hoc test and the independent T-test were used to analyse the data, with a significant level set at p<0.05.

Results: The results showed that aerobic training induced significant differences in the growth of tumor volume and an increase in HIF-1 α . In addition, aerobic training caused a significant decrease in the gene expression of miR-21, whereas the changes in gene expression of VEGF were not significant.

Conclusion: It appears that aerobic training caused a reduction in the gene expression of miR-21 and VEGF, which in turn, induced a decrease in the tumor volume and a corresponding improvement in the cancer.

Keywords: Angiogenesis, Breast Cancer, Aerobic training, HIF-1 α , miR-21, VEGF.

***Citation:** Soltani R, Kordi M, Gaeini A, Nuri R. The effects of 8 weeks aerobic training on HIF-1 α , miR-21 and VEGF gene expression in female Balb/c with breast cancer. *Yafte*. 2019; 21(1):63-74.