مقاله پژوهشی

مقأیسه تأثیر ویتامین E بر بیان ژن های p53/PTEN غده پروستات موش های صحرایی نر در دو گروه با تمرینات تداومی و تناوبی شدید

امین اله دشتیان[1*]، محمد اسماعیل افضل پور[1]، نادر تنیده[2]، مسعود سپهری منش[3]

۱. گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
۲. مرکز تحقیقات تکنولوژی سلول های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۳. مرکز تحقیقات بیماری های دستگاه گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: فعالیت بدنی و رژیم غذایی، مهمترین عوامل تعیین کننده قابل تغییر در خطر ابتلا به سرطان می باشند. هدف از تحقیق حاضر، مقایسه تأثیر ویتامین E بر بیان ژن های p53/PTEN غده پروستات موش های نر در دو گروه با تمرینات تداومی و تناوبی شدید بود.

مواد و روش ها: برای این منظور، ۵۶ سر موش صحرایی نر بصورت تصادفی به ۷ گروهِ کنترل، شم، تمرین تداومی شدید، تمرین تناوبی شدید، تمرین تداومی شدید + ویتامین E، تمرین تناوبی شدید + ویتامین E و ویتامین E تقسیم شدند. پروتکل تمرین تداومی و تناوبی به مدت ۶ هفته، بصورت ۶ روز در هفته، با رعایت اصل اضافه بار بر روی تردمیل اجرا شد. میزان بیان ژن های تحقیق با استفاده از روش real-time PCR و سطح ویتامین E نیز با استفاده از روش HPLC اندازه گیری شد. همچنین از روش آماری پارامتریک تحلیل واریانس یک-طرفه برای بررسی اختلاف گروه ها استفاده شد.

نتایج: مصرف مکمل ویتامین E به همراه تمرین تداومی، باعث کاهش معنی داری در بیان ژن p53 نسبت به گروه کنترل شد ($p<۰/۰۰۴$). در مقابل، مصرف مکمل ویتامین E به همراه تمرین تناوبی، باعث کاهش معنی داری در بیان ژن p53 ($p<۰/۰۱۳$) و افزایش معنی داری در بیان ژن PTEN شد ($p<۰/۰۳۵$).

نتیجه گیری: تمرینات تداومی و تناوبی شدید، بیان ژن های سرکوب گر توموری p53 و PTEN را کاهش می دهد و مصرف مکمل ویتامین E به همراه این نوع تمرینات، می تواند تا حدودی باعث اثرات متفاوت در بیان این ژن ها شود.

کلمات کلیدی: ویتامین E، تمرینات تداومی، تمرین تناوبی، p53، PTEN، غده ی پروستات

مقدمه

مطالعات نشان می دهد رژیم غذایی نامناسب، سطوح پایین فعالیت بدنی و چاقی نقش مهمی در انواع سرطان ها، از جمله پیشرفت سرطان پروستات دارند (۳-۱). سطوح بالاتر فعالیت بدنی با کاهش نرخ کلی مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات همراه است. فعالیت بدنی می تواند اثرات پیشگیرانه، قبل و بعد از تشخیص بیماری سرطان داشته باشد، بدان معنا که ممکن است هم شروع و هم پیشرفت تومور را تحت تأثیر قرار دهد (۴).

ژن های سرکوبگر تومور یا ضد انکوژن ها، ژن هایی هستند که سلول ها را از رسیدن به سرطان باز می دارند. در میان این ژن ها، ژن های سرکوبگر p53 و PTEN، شایعترین ژن های غیر فعال شده و جهش یافته در انواع سرطان ها هستند. پروتئین p53 یک فاکتور رونویسی است که از طریق فعال سازی چندین ژن پایین دستی نظیرِ P21 باعث توقف مرحله G1 چرخه سلولی می شود. پروتئین p21 با اتصال به G1/S – CDK[1] و S – CDK آنها را غیرفعال کرده و بنابراین اجازه ورود سلول به مرحله S را نمی دهد. غیرفعال سازی ژن p53 یک رویداد شایع در توسعه اکثر انواع سرطان هاست (۵). p53، در پاسخ به عوامل استرس زای بی شمار نظیرِ استرس اکسیداتیوها فعال می شود (۶). در پاسخ به استرس، p53 مسیرهای فیزیولوژیکی را که توقف چرخه سلولی، ترمیم DNA، آپوپتوزیس، اُتوفاژی و سوخت و ساز بدن را تنظیم می کنند؛ فعال می کند. در یک سلول طبیعی، p53 بوسیله ی تنظیم کننده ی منفی خودش MDM2، غیرفعال می شود. به محض آسیب به DNA یا استرس های دیگر، مسیرهای متعددی منجر به جدایی کمپلکس p53 و MDM2

*نویسنده مسئول: امین اله دشتیان، گروه فیزیولوژی ورزش، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران
Email: amin.dashtiyan@gmail.com

1- Cyclin-dependent kinase

می شوند. به مجرد فعال سازی، p53 باعث تحریک توقف چرخه سلولی به منظور ترمیم و بقای سلول، یا آپتوز به منظور دور انداختن سلول آسیب دیده می شود (۷). اخیراً، p53 به عنوان یک عامل مولکولی کلیدی تنظیم کننده ی متابولیسم سوبستراها و بیوژنز میتوکندریایی ناشی از فعالیت ورزشی در عضلات اسکلتی نیز مطرح شده است. اختلال در محتوا و عملکرد میتوکندری با آسیب های بسیاری نظیرِ اختلالات متابولیکی، پیری، دیابت نوع ۲، چاقی و سرطان و همچنین کاهش عملکرد ورزشی همراه است (۸).

فسفاتاز و تنسین همولوگ (PTEN) یکی از شایعترین سرکوبگران توموری جهش یافته در سرطان های انسانی است. اختلال در تنظیم این سرکوبگر توموری، منجر به بیماری های متابولیکی و سرطان خواهد شد. بطور خاص، در سرطان پروستات، این ژن در بیشتر از ۵۰ ٪ موارد حذف می شود (۹). این پروتئین سطوح داخل سلولی فسفاتیدیل اینوزیتول-۳، ۴، ۵- تری فسفاتاز (PIP_3) را در سلول ها به طور منفی تنظیم کرده و از طریق تنظیم منفی مسیر سیگنالینگ PKB/AKT[2] به عنوان سرکوب کننده ی تومور عمل می نماید (۱۰).

مطالعات اخیر نشان داده اند که یک رابطه قوی بین PTEN و p53 وجود دارد. هم PTEN و هم p53، تکثیر و مرگ سلولی را تنظیم می کنند. از نظر مکانیسمی، شواهد بسیاری نشان می دهند که فعال سازی پروتئین کیناز B توسط PTEN، نقش اساسی در تعدیل تجزیه ی p53 وابسته به MDM2[3] بازی می کند. MDM2 یک تنظیم کننده ی منفی مهمِ p53 است، اما p53 یک پروتئین با عمر کوتاه است که تثبیتش برای عملکرد سرکوب کنندگی توموری آن، بسیار حیاتی است. پروتئین کیناز B به طور فیزیکی با MDM2 در ارتباط است و MDM2 را در باقیمانده های سرین، فسفوریله می کند؛ به عبارت دیگر، گامی کلیدی در انتقال هسته ای MDM2 و تجزیه ی p53 به واسطه ی MDM2 به حساب می آید. بنابراین، ممکن است فعال سازی پروتئین کیناز B در سلول های دارای کمبود PTEN، باعث تجزیه ی سریع تر p53 شود که این امر می تواند به نوبه ی خود به تومورزایی، آن هم به دلیل از دست رفتن PTEN، کمک کند. علاوه بر این، p53 می تواند به نواحی پروموتر PTEN متصل شده و آن را از لحاظ رونویسی فعال نماید. با این وجود، در خصوص اهمیت چنین تنظیمی، بحث و اختلاف نظر وجود دارد. جهش سلول های زاینده در p53 و PTEN، به ترتیب باعث سندرم لی-فرامنی و سندرم کاودن می شود؛ برخی همپوشی های فنوتیپی در این سندرم ها وجود دارد (۱۱).

در طول چند دهه گذشته، پژوهش های زیادی در خصوص ارتباط بین ورزش و خطر سرطان پروستات انجام شده است. بیش از نیمی از مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می دهند یک رابطه معکوس بین فعالیت بدنی و سرطان پروستات وجود دارد (۱۲-۱۴)، در حالی که مطالعات دیگری هم هستند که چنین رابطه ای را تأیید نمی کنند (۱۵-۱۷). در چهار مطالعه، حتی دریافته اند که ورزش خطر ابتلای به سرطان پروستات را افزایش می دهد (۱۸-۲۰). در همین راستا، هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرینات ورزشی تداومی و تناوبی شدید با و بدون مصرف ویتامین E بر میزان بیان ژن های سرکوبگر تومور p53 و PTEN غده پروستات بود.

مواد و روش ها

آزمودنی های تحقیق

در این تحقیق، ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگ-داولی با ۱۲ هفته سن از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شد. حیوانات مورد آزمایش در این تحقیق در دوره ی آشنایی و اجرای پروتکل‌های تمرینی، در محیطی با دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۳۰ تا ۷۰ درصد و چرخه ی روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت نگهداری شدند. مسائل اخلاقی در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی تحت نظر کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز (SU) انجام گردید. این حیوانات پس از انتقال به محیط تحقیق و آشنایی با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان، به طور تصادفی در ۷ گروه زیر جایگذاری شدند: ۱- گروه تمرین تداومی (ICT)[4]؛ ۲- گروه تمرین تناوبی (IIT)[5]؛ ۳- گروه تمرین تداومی + مکمل (ICT + VE) ، ۴- گروه تمرین تناوبی + مکمل (IIT + VE) ، ۵- گروه مکمل (VE)[6]؛ ۶- گروه کنترل (CON) ۷- گروه شم (S). دسترسی حیوانات به غذا و آب در تمامی مراحل این تحقیق آزاد بود.

[2] - Protein kinase B/AKT
[3] - Mouse double minute 2 homolog
[4] - Intensive Continuous Training
[5] - Intensive Intermittent Training
[6] - Vitamin E

مکمل سازی ویتامین E

در این تحقیق از بسته ی ۲۵ گرمی ویتامین E سوکسینات خریداری شده از شرکت سیگما ((+)-α- Tocopherol acid succinate, Sigma-Aldrich) استفاده شد و بصورت ۶ روز در هفته و ۳ ساعت قبل از اجرا ، ۶۰ میلی گرم ویتامین E به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ به موش‌های گروه کنترل مکمل، تمرین تداومی + مکمل و گروه تمرین تناوبی + مکمل داده شد. برای آماده سازی ویتامین E از روغن کنجد استفاده شد (۶۰ میلی گرم در ۱ میلی لیتر روغن کنجد). همچنین، به موش‌های گروه شم ۱ میلی لیتر روغن کنجد به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت گاواژ داده شد (۲۱).

پروتکل تمرین

تمرین تداومی به صورت دویدن روی نوارگردان برای ۶ روز در هفته اجرا شد. تمرین تداومی شامل ۳ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۶ متر در دقیقه، و سپس ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۷ متر در دقیقه بود (شدت نسبی معادل ۸۰ درصد حداکثر اکسیژن مصرفی یا ۷/۶ میلی لیتر اکسیژن در هر ۱۰۰ گرم رت در هر دقیقه). مدت زمان دویدن هر روز ۲ دقیقه اضافه شد تا به مدت زمان ۶۰ دقیقه در روز رسید و سپس، تا هفته ششم ثابت نگه داشته شد.

پروتکل تمرین تناوبی و تداومی تحقیق حاضر، بصورت ۶ روز در هفته (۳ روز زوج و ۳ روز فرد)، به مدت ۶ هفته و با رعایت اصل اضافه بار بر روی تردمیل موتوردار اجرا شد. تمرین تناوبی در روزهای زوج شامل ۳ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۶ متر در دقیقه، تناوب دویدن ۳ دقیقه‌ای با سرعت ۴۰ متر در دقیقه اجرا شد. فاصله بین هر تناوب (استراحت) ۶۰ ثانیه و با سرعت ۱۶ متر در ثانیه بود. برنامه تمرینی روزهای زوج در ابتدا ۲ تکرار را شامل بود که تا هفته چهارم به ۶ تکرار افزایش یافت، سپس همین روال تا هفته ششم ثابت نگه داشته شد. تمرین تناوبی در روزهای فرد شامل ۳ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۶ متر در دقیقه، تناوب‌های دویدن ۳۰ ثانیه‌ای با سرعت ۵۴ متر در دقیقه اجرا شد. فاصله بین هر تناوب (استراحت) ۶۰ ثانیه و با سرعت ۱۶ متر در دقیقه بود. برنامه تمرینی روزهای فرد در ابتدا شامل ۳ تکرار بود و تا هفته چهارم به ۲۰ تکرار افزایش یافت، سپس تا هفته ششم همین روال حفظ شد (۲۲).

نمونه برداری و ارزیابی آزمایشگاهی

۴۸ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها توسط اِتر بیهوش و کشته شدند و پروستات آنها جدا شده و با استفاده از سرم فیزیولوژیکی شستشو و در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد. برای آنالیز بیوشیمیایی ویتامین E بافت پروستات موش های صحرایی نر، از روش HPLC و برای آنالیز بیوشیمیایی بیان ژن P53 و PTEN از روش RT-PCR استفاده گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA تام با استفاده از معرّف TRIzol (*Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA,USA*) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده، از بافت پروستات موش های صحرایی استخراج شد. غلظت و خلّوص RNA تام، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتری (NanoDrop™ 2000c, *Thermo Scientific, USA*) اندازه گیری شد. جهت بررسی یکپارچگی RNA، از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده گردید. از ۵۰۰ نانوگرم RNA تام و حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر جهت ساخت cDNA با استفاده از کیت Prime Script™ RT (*EURX, E0801-03*) و مطابق دستورالعمل آن استفاده گردید. بعد نمونه ها با برنامه ی ۱۰ دقیقه با دمای ۲۵ درجه، ۴۰ دقیقه با دمای ۵۰ درجه و ۵ دقیقه با دمای ۸۵ درجه جهت پیش گرمایش در دستگاه Thermal Cycler گذاشته شد. بدین ترتیب cDNA حاصل برای PCR آماده شد و برای استفاده ی بعدی در یخچال ۲۰- نگهداری شد.

اجرای Real-time PCR

برای اندازه گیری بیان mRNA با استفاه از روش real-time PCR، از دستگاه StepOne real-time PCR (*ABI, Applied Biosystems, USA*)، همراه با کیت SYBER Green High ROX (*RealQ-PCR 2x Master Mix, Ampliqon, Denmark*) استفاده شد. جهت بررسی بیان ژن‌ها با استفاده از real-time PCR تمام پرایمرها توسط نرم افزار Gene Runner و Primer 3 طراحی شد (جدول ۱) و از ژن B2M[7] بعنوان کنترل داخلی استفاده گردید. واکنش Real-time PCR با ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix، ۱ میکرولیتر پرایمر Forward (۵ پیکومولار)، ۱ میکرولیتر پرایمر Reverse (۵ پیکومولار)، ۲ میکرولیتر cDNA (۲۰ نانوگرم) به همراه ۸/۵ میکرولیتر آب و تا حجم کلی ۲۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط واکنش (پروتکل دستگاه PCR) بصورت زیر بود:

۱۰ دقیقه در دمای ۹۵، ۴۵ سیکل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه

[7] - beta-2-microglobulin

سانتی گراد و ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد. همه نمونه ها بصورت ۳ تایی گذاشته شد و هر منحنی مشکوک حذف شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای p53، PTEN و B2M را نشان می دهد.

Accession No.	Symbol Gene	Forward	Reverse	product length (bp)
NM_030989.3	P53	5’-ATTTCACCCTTAAGATCCGTGGG-3’	5’-AGACTGGCCCTTCTTGGTCT-3’	۱۴۹
NM_031606.1	PTEN	5’-GGAAAGGACGGACTGGTGTAA-3’	5’-AGTGCCACTGGTCTGTAATCC-3’	۱۹۹
NM_012512.2	B2M	5’-TACGTGTCTCAGTTCCACCC-3’	5’-TTGATTACATGTCTCGGTCCCA-3’	۲۲۹

Efficiency برای p53، PTEN و B2M توسط PCR از طریق الگوی رقّت های مختلف cDNA برآورد شد. دلیل انتخاب ژن B2M، تولید یکنواخت و با نرخ ثابت این ژن در تمام بافت ها به جز گلبول های قرمز خون است. میزان سیکل آستانه (CT)[8]همه نمونه ها اندازه گیری شد.

اندازه گیری ویتامین E پروستات

جهت اندازه گیری ویتامین E بافت پروستات موش های صحرایی، ابتدا با استفاده از ترازو، ۵۰ میلی گرم بافت پروستات از نمونه های پروستات موش های صحرایی جدا و وزن شد. سپس مقداری نیتروژن مایع بر روی آن ریخته شد و بدقت پودر شد. در این مرحله ۵ میلی لیتر اتانول خالص سرد به بافت پودر شده اضافه شد. بعد ۱۰ میلی لیتر هگزان سرد به آن اضافه شد و ورتکس شد. پس از آن، محلول بدست آمده برای ۱۵ دقیقه با دمای ۵°C با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در آخر حدود ۵۰ میکرولیتر از لایه فوقانی برداشته شد و به دستگاه HPLC تزریق شد (۲۳).

تجزیه و تحلیل آماری داده ها

از روش مقایسه ای $2^{-\Delta\Delta CT}$ جهت آنالیز کمّی داده ها استفاده شد و نتایج براساس تغییرات چند برابری[9]سطوح بیان ژن بیان گردید. از میانگین ۳تایی برای همه محاسبات استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نسخه ۲۲ بسته آماری برای علوم اجتماعی (SPSS) استفاده شد. از آزمون شاپیرو-ویلک برای تعیین نحوه توزیع داده‌ها روی تمامی گروه‌ها استفاده شد. از روش آماری پارامتریک تحلیل واریانس یک طرفه برای بررسی اختلاف گروه ها استفاده شد. از آزمون تعقیبی LSD برای بررسی تفاوت بین جفت زوج‌ها استفاده شد. برای رسم نمودارهای تحقیق از نرم افزار گرف پد نسخه ۶/۰۱ استفاده گردید. تفاوت معنی-داری داده‌ها در سطح P< ۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج

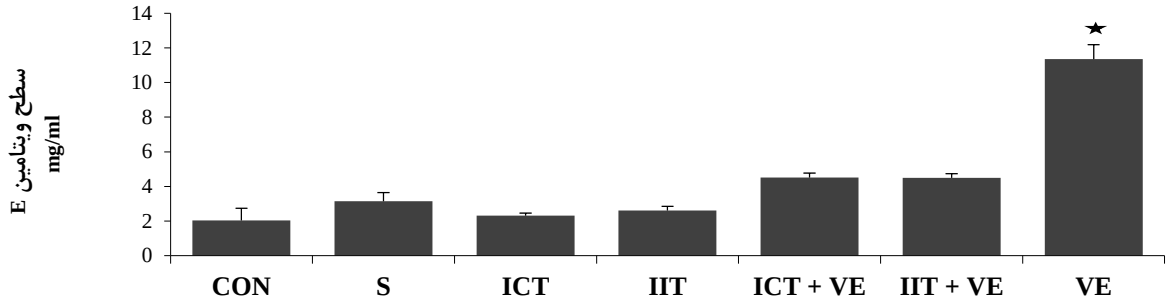
اندازه گیری ویتامین E پروستات که با استفاده از روش HPLC صورت گرفت، نشان داد که سطح ویتامین E در گروه ویتامین E (VE) بطور معنی داری بالاتر از گروه های دیگر است (p <۰/۰۰۰) (نمودار ۱). پس از انجام تمرینات تداومی شدید به مدت ۶ هفته، بیان ژن p53 در گروه ICT و ICT+ VE نسبت به گروه CON به طور معنی داری کاهش یافت (به ترتیب؛ p <۰/۰۰۱ و p <۰/۰۰۴). کاهش مشاهده در گروه ICT+ VE به نسبت، کمتر از گروه ICT بود (نمودار ۲).

سطح بیان ژن PTEN نیز پس از ۶ هفته تمرین تداومی شدید، در گروه ICT نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما این کاهش معنی دار نبود (p <۰/۰۹۴). در گروه ICT + VE، میزان بیان PTEN پس از ۶ هفته تمرین نسبت به گروه ICT افزایش معنی داری یافت (p <۰/۰۰۴)، اما این نتایج نسبت به گروه کنترل از لحاظ آماری معنی دار نبود (p<۰/۰۵۴) (نمودار ۳). پس از انجام تمرینات تناوبی شدید به مدت۶ هفته، بیان ژن p53 در گروه IIT و IIT+ VE نسبت به گروهCON به طور معنی داری کاهش یافت (به ترتیب؛ p <۰/۰۱۳، p <۰/۰۰۰) (نمودار ۲). البته این کاهش در گروه IIT+ VE نسبت به گروه IIT، کمتر بود. سطح بیان ژن PTEN نیز پس از ۶ هفته تمرین تناوبی شدید، در گروه IIT نسبت به گروه کنترل کاهش معنی داری یافت (p<۰/۰۳۱)؛ در حالی که در گروه IIT + VE، میزان بیان PTEN پس از ۶ هفته تمرین نسبت به گروه IIT و CON افزایش معنی داری نشان داد (به ترتیب؛ p <۰/۰۳۵، p<۰/۰۱۴) (نمودار ۳).

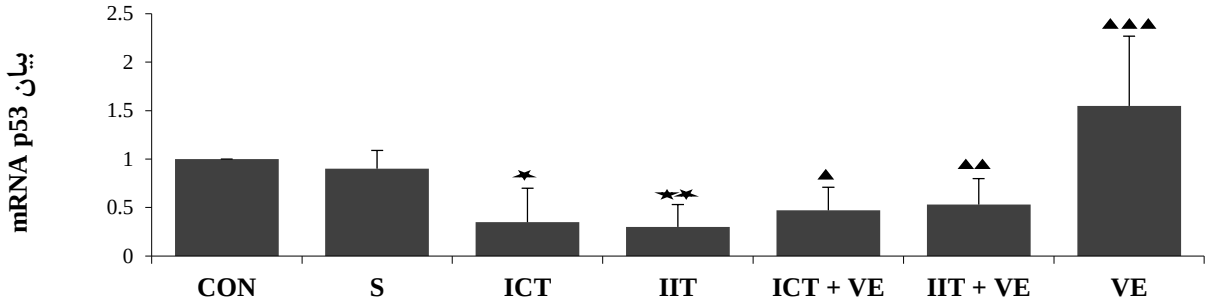
[8] - Threshold cycle

[9] - Fold change

کاهش بیان p53 و PTEN بعد از ۶ هفته تمرین تناوبی در گروه IIT نسبت به گروه شم (S) نیز معنی دار بود (به ترتیب؛ ناچار نتایج تحقیق حاضر را با بافت های دیگر مقایسه می کنیم. پس از انجام تمرینات تداومی و تناوبی شدید به مدت ۶ هفته،



نمودار ۱. سطح ویتامین E برحسب میکروگرم/میلی لیتر در بافت پروستات رت ها را در گروه های کنترل (CON)، شم (S)، تداومی (ICT) و تناوبی (IIT)، تداومی + ویتامین E (ICT + VE)، تناوبی + ویتامین E (IIT + VE) و ویتامین E (VE) نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، سطح ویتامین E در گروه ویتامین E (*) اختلاف معنی داری نسبت به تمام گروه ها دارد (P<۰/۰۵).

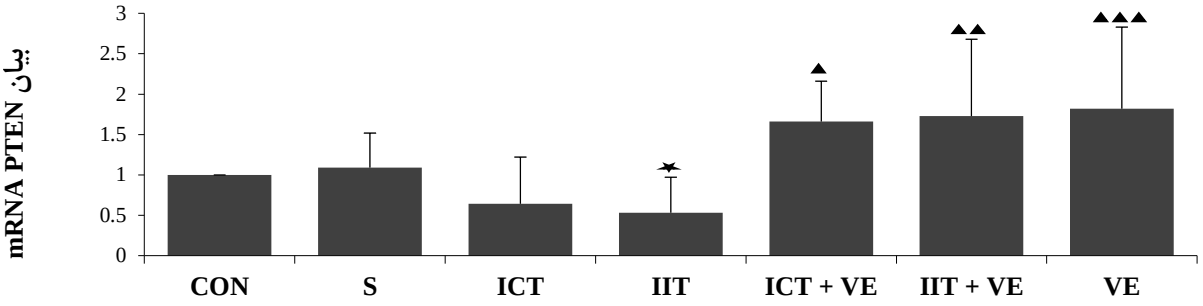


نمودار ۲. میزان بیان mRNA ژن p53 را در گروه های کنترل (CON)، شم (S)، تداومی (ICT) و تناوبی (IIT)، تداومی + ویتامین E (ICT + VE)، تناوبی + ویتامین E (IIT + VE) و ویتامین E (VE) نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، میزان بیان ژن p53 در گروه های تداومی (ICT) (*) و تناوبی (IIT) (**) شدید نسبت به گروه کنترل (CON)، شم (S) و ویتامین E (VE) بطور معنی داری کاهش یافته است. همچنین در گروه تمرین تداومی + ویتامین E (ICT + VE) (▲) و تمرین تناوبی + ویتامین E (IIT + VE) (▲▲) میزان بیان p53 بطور معنی داری پس از ۶ هفته نسبت به گروه کنترل و ویتامین E کاهش یافت. میزان بیان p53 در گروه ویتامین E (▲▲▲) نیز پس از ۶ هفته مکمل سازی ویتامین E افزایش معنی نداری نسبت به تمامی گروه پیدا کرد (P<۰/۰۵).

p<۰/۰۱۶، p<۰/۰۰۱).

بحث

بر اساس اطلاعات ما، این اولین مطالعه کنترل شده در زمینه بررسی تأثیر مصرف ویتامین E همراه با فعالیت های هوازی تداومی و تناوبی شدید بر ژن های سرکوبگر تومور p53 و PTEN غده ی پروستات موش های نر می باشد. به دلیل اینکه تا امروز هیچ تحقیقی در مورد اثرات تمرینات هوازی شدید بر روی بیان ژن های p53 و PTEN بافت پروستات صورت نگرفته است، به بیان ژن p53 در گروه تمرین تداومی، گروه تناوبی، گروه تداومی + ویتامین E و گروه تناوبی + ویتامین E نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. این کاهش سطوح p53 پس از تمرینات هوازی، در تحقیقات دیگر نیز مشاهده شده است (۲۷-۲۴). ضیاء الدینی و همکاران (۲۰۱۵)، تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی بر روی نوارگردان را در عضلات اسکلتی موش های صحرایی جوان (سه ماهه) و پیر (هشت ماهه) مورد ارزیابی قرار دادند. پس از ۶ هفته تمرین هوازی، سطوح p53 هم در موش



نمودار۳. میزان بیان mRNA ژن PTEN را در گروه های کنترل (CON)، شم (S)، تداومی (ICT) و تناوبی (IIT)، تداومی + ویتامین E (ICT + VE)، تناوبی + ویتامین E (IIT + VE) و ویتامین E (VE) نشان می دهد. پس از انجام تمرینات تداومی و تناوبی شدید به مدت ۶ هفته، میزان بیان ژن PTEN در گروه های تداومی (ICT) و تناوبی (IIT) شدید کاهش یافت، این کاهش نسبت به گروه CON در گروه IIT (*) معنی دار، ولی در گروه ICT غیر معنی دار بود (به ترتیب؛ p<۰/۰۳۱، p<۰/۲۱۴). میزان بیان PTEN در گروه ICT+ VE (▲)، IIT+ VE (▲▲) و VE (▲▲▲) همچنین نسبت به گروه های متناظر خود یعنی ICT، IIT و CON افزایش معنی داری نشان دادند (P<۰/۰۵).

های پیر و هم در موش های جوان کاهش یافت، اما این کاهش معنی دار نبود (۲۴). الجراح و همکاران (۲۰۱۲)، تأثیر ۴ هفته تمرینات هوازی را بر روی تردمیل را در عضلات قلب موش های صحرایی دیابتی و غیر دیابتی مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان که میزان بیان p53 عضله قلب در گروه کنترل دیابتی غیرفعال بطور معنی داری نسبت به گروه کنترل غیرفعال افزایش یافت (P <۰/۰۲). پس از اجرای پروتکل تمرین نیز میزان بیان p53 بطور معنی داری در گروه دیابتی نسبت به همنوعان کنترل شان کاهش پیدا کرد، اما تفاوت معنی داری بین بیان p53 در گروه کنترل فعال سالم و کنترل غیرفعال سالم مشاهده نشد (۲۵). سلیم و همکاران (۲۰۰۹)، همچنین مشاهده کردند که حتی یک انقباض عضلانی حاد (در قالب یک پروتکل تحریک الکتریکی خسته کننده)، باعث تغییر دو برابری در فسفوریلاسیون p53 در سرین ۱۵ (یک تغییری که به طور معمول با افزایش ثبات و فعالیت همراه است) بلافاصله بعد از ورزش می شود. این تغییر در وضعیت فسفوریلاسیون، با همکاری فسفوریلاسیون کلاسیک ناشی از تمرینِ AMPK و p38MAPK نیز رخ می دهد. از این رو، این کینازها ممکن است به عنوان کینازهای بالا دستی تغییر فعالیت p53 ایفای نقش کنند (۲۶). با توجه به آنچه گفته شد، روشن است یک جلسه حاد فعالیت بدنی بعنوان یک استرس بدنی باعث افزایش بیان p53 خواهد شد؛ اما چرا تمرین در درازمدت باعث کاهش میزان بیان این ژن می شود؟ نشان داده شده است که تمرینات منظم باعث کاهش استرس اکسیداتیو و بالا رفتن دفاع آنتی اکسیدانی بدن می شوند (۲۷)، بنابراین چون یکی از دلایل افزایش ژن p53، افزایش استرس اکسیداتیو است، می توان انتظار داشت سطوح بیان ژن p53 نیز بدلیل مهار استرس اکسیداتیو، کاهش پیدا کند.

میزان بیان p53 در گروه تمرین تداومی + ویتامین E و تمرین تناوبی + ویتامین E نیز به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. تأثیرات سلولی ویتامین E اساساً مبتنی بر فعالیت آنتی اکسیدانی است، اما نشان داده شده است که ویتامین E علاوه بر تنظیم چندین مسیر سیگنال دهی، بیان ژن های اصلی مرتبط با تکثیر سلولی و فرآیندهای التهابی را نیز تنظیم می کند. کاهش بیان p53 در گروه تمرین تداومی + ویتامین E و تمرین تناوبی + ویتامین E ممکن است به علت عمل آنتی اکسیدانی ویتامین E باشد که به نوبه ی خود بطور معنی داری سطوح پراکسیداسیون لیپید پلاسما را کاهش می دهد. کاهش سطوح استرس اکسیداتیو در سلول ها، متعاقباً منجر به کاهش آسیب به DNA و سطوح پروتئین p53 می شود (۲۸). با توجه به اینکه یکی از عوامل افزایش فعال سازی p53، محرومیت غذایی است (۲۹)، می توان چنین احتمال داد که فراهمی ویتامین E می تواند از برخی افزایش های این ژن جلوگیری کند. با توجه به آنچه گفته شد، نمی توان انتظار داشت که مصرف ویتامین E همراه با تمرین تأثیر چندانی در افزایش بیان ژن p53 داشته باشد. در مطالعه ما، سطح بیان ژن PTEN نیز پس از ۶ هفته تمرین تداومی هوازی در دو گروه تمرین تداومی و گروه تمرین

تناوبی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، اما این کاهش فقط در گروه تمرین تناوبی معنی دار بود. این نتایج با نتایج مطالعات دیگر همسو بود (۳۱ و ۳۰). دینگ و همکاران (۲۰۰۹) تأثیر ۸ هفته تمرین استقامتی بر روی PTEN را در عضلات دوقلو و نعلی موش های صحرایی مورد مطالعه قرار داده و بیان کرده اند که بعد از ۸ هفته، بیان mRNA مربوط به PTEN و همچنین پروتئین PTEN در عضله دوقلو کاهش یافت، اما بیان mRNA مربوط به PTEN در عضله نعلی بعد از ۸ هفته بدون تغییر و پروتئین آن با کاهش همراه بود (۳۰). در همین راستا، ما و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر ۸ هفته تمرین شنا را بر روی موش های ویستار نر مورد ارزیابی قرار داده و مشاهده کرده اند که پس از ۸ هفته، بیان ژن و همچنین پروتئین PTEN در عضله بطن چپ موش ها کاهش می یابد (۳۱).

اثبات شده است که PTEN با p53 تعامل پیچیده ای دارد. علیرغم اینکه آنها دارای عملکرد متفاوتی هستند، اما نشان داده شده است که همکاری دو جانبه ای دارند، بطوریکه تصور می شود PTEN، پایداری p53 را تنظیم می کند و p53 رونویسی PTEN را افزایش می دهد. با این حال، به محض از دست رفتن PTEN، مسیر p53 شدیداً فعال می شود. بعلاوه، فقدان PTEN با فقدان p53 همراه می شود و باعث پیشرفت سرطان خواهد شد. ژن PTEN می تواند بوسیله ی فاکتور رونویسی-۱ تنظیم شده با رشد اولیه؛[1] PPARγ[2]، p53[11] و فاکتور فعال کننده ی رونویسی ۲ (ATF2)؛[12] تنظیم مثبت شود در حالی که، فاکتور رشد دگرگونگر بتا (TGF-β)[3] فاکتور هسته ای-کاپا بی (NF-κB)[4] و Jun می توانند آنرا بطور منفی تنظیم کنند (۱۱). بدین ترتیب، p53 و MDM2، تشکیل یک حلقه ی بازخوردی تنظیمی را می دهند که در آن p53 بیان MDM2 را تنظیم مثبت و MDM2 سطوح پروتئین p53 را تنظیم منفی می کند. بدین ترتیب ممکن است PTEN از تجزیه ی p53 به واسطه ی MDM2 محافظت کند و p53 نیز می تواند رونویسی PTEN را افزایش دهد (۱۱). از این رو، غیرفعال سازی هر کدام از این ژن ها، منجر به پایین رفتن سطوح پروتئینی ژن دیگر می شود. بنابراین، با توجه به رابطه مستقیم بین p53 و PTEN، می توان یکی از دلایل احتمالی کاهش سطح بیان PTEN را کاهش بیان p53 دانست. از طرف دیگر، همانطور که قبلاً اشاره شد تمرینات منظم باعث کاهش سطح استرس اکسیداتیوها می شود و این امر نیز به نوبه ی خود می تواند سطح بیان PTEN را در پروستات کاهش دهد.

در گروه تمرین تداومی + ویتامین E، تمرین تناوبی + ویتامین E و گروه ویتامین E میزان بیان PTEN پس از ۶ هفته تمرین نسبت به گروه کنترل افزایش معنی داری یافت. به نظر می رسد مصرف ویتامین E باعث بیش بیانی این ژن شده باشد، زیرا که در گروه در دو گروه تمرین تداومی و گروه تمرین تناوبی چنین اتفاقی رخ نداده است (P<۰/۰۹۴). مکانیسمی که از طریق آن ویتامین E باعث بیش بیانی PTEN می شود، هنوز شناخته نشده است. با توجه به اینکه یکی از اهداف رونویسی p53، PTEN می باشد. یکی از راه هایی که بوسیله آن p53 تولید PIP3 را بطور غیر مستقیم مهار می کند، تحریک بیان PTEN است. PTEN، سطح p53 و همچنین فعالیت آن را از طریق تنظیم منفی رونویسی MDM2 و فعالیت اتصالی p53، تنظیم مثبت می کند. با این حال، در غیاب p53، PTEN ممکن است با کمک MDM2، از طریق تنظیم رونویسی MDM2 و انتخاب ایزوفورم ها، نوعی نقش مهار سرطان زایی داشته باشد (۱۱). با توجه به آنچه گفته شد بدلیل اینکه بیان PTEN برای تثبیت p53 ضروری است، می توان چنین نتیجه گرفت که مصرف ویتامین E به همراه تمرین می تواند بهترین شرایط را برای حفظ این حلقه ی بازخوردی فراهم کند. مکانسیم های این تغییرات به روشنی توضیح داده نشده است. به نظر می رسد مکمل ویتامین E همراه با تمرین تناوبی و تداومی باعث تنظیم مثبت ژن PTEN می شود. با توجه به عدم وجود پیشینه ی کافی تشخیص مکانسیم های درگیر در این تنظیم مثبت دشوار می باشد.

نتیجه گیری

این یافته ها نشان می دهد که برخی از مکانیسم های زیربنایی حداقل از نظر کمّی در دو روش تمرینی مشابه هستند. به نظر می رسد بدلیل تعامل پیچیده p53 و PTEN و وجود مسیرهای پیچیده مشترک (۱۱)، این امکان وجود دارد که بیان این ژن ها بیشتر تحت تأثیر خود استرس هستند تا نوع استرس و هر مسیری که بتواند در اُرگانیسم زنده استرس ایجاد کند، قادر به برانگیختن پاسخ این ژن ها خواهد بود. نتایج تحقیق ما نشان داد

[1] - early growth regulated transcription factor 1
[2] - peroxisome proliferator activated receptor γ
[3] - activating transcription factor 2
[4] - transforming growth factor-β
[5] - nuclear factor κB

که پرداختن به تمرینات منظم تناوبی و تداومی شدید باعث کاهش بیان ژن های سرکوبگر p53 و PTEN می شود. کاهش میزان بیان این ژن ها را می توان از دو جنبه احتمالی مورد بررسی قرار داد؛ ۱- پرداختن به تمرین منظم شدید باعث کاهش سطح رادیکال های آزاد در اُرگانیسم می شود و لزوم فعال شدن این ژن ها را کاهش می دهد ۲- پرداختن به تمرینات منظم شدید و در نتیجه تولید رادیکال های آزاد، باعث آسیب به DNA این ژن ها می گردد و متعاقب آن بیان این ژن ها را کاهش می دهد. از طرف دیگر، مصرف مکمل ویتامین E به همراه این نوع تمرینات، می تواند تا حدودی از کاهش بیش از حد بیان این ژن ها جلوگیری کند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان نامه مصوب دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی دانشگاه بیرجند با کد ۲۳۷۴۸۳۵ و با حمایت دانشگاه بیرجند و دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام گرفته است. بدین وسیله از آقایان دکتر جمهیری، امیرزاده و مرادپور و همچنین خانم ها زارعتیان و نجابت که در کلیه مراحل انجام پژوهش همکاری کرده اند، کمال تشکر را دارم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1- Food N. Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Washington, DC. 2007.
2- Diet, nutrition, physical activity and prostate cancer: WCRF, AIRC. Washington, DC. 2014.
3- Cancer facts and figures: American Cancer Society. Atlanta; 2008.
4- Rogers CJ, Colbert LH, Greiner JW, Perkins SN, Hursting SD. Physical activity and cancer prevention. Sports Medicine. 2008; 38(4): 271-96.
5- Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. Current opinion in oncology. 2010; 22(1): 64-9.
6- Han E-S, Muller FL, Pérez VI, Qi W, Liang H, Xi L, et al. The in vivo gene expression signature of oxidative stress. Physiological genomics. 2008; 34(1): 112-26.
7- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. Science. 2004; 303(5659): 844-8.
8- Voskuil DW, Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, van Leeuwen FE. Physical activity and endometrial cancer risk, a systematic review of current evidence. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2007; 16(4): 639-48.
9- Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN hamartoma tumor syndromes. European Journal of Human Genetics. 2008; 16(11): 1289-300.
10- PTEN phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1): Entrez Gene. Reference Sequences (RefSeq); Gene ID. 2014; 44(D1): 5728-5733.
11- Nakanishi A, Kitagishi Y, Ogura Y, Matsuda S. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review). International journal of oncology. 2014; 44(6): 1813-9.
12- Andersson S-O, Baron J, Wolk A, Lindgren C, Bergström R, Adami H-O. Early life risk factors for prostate cancer: a population-based case-control study in Sweden. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 1995; 4(3): 187-92.
13- Bairati I, Larouche R, Meyer F, Moore L, Fradet Y. Lifetime occupational physical activity and incidental prostate cancer (Canada). Cancer Causes & Control. 2000; 11(8): 759-64.
14- Brownson RC, Chang JC, Davis JR, Smith CA. Physical activity on the job and cancer in Missouri. American Journal of Public Health. 1991; 81(5): 639-42.
15- Dosemeci M, Hayes RB, Vetter R, Hoover RN, Tucker M, Engin K, et al. Occupational physical activity, socioeconomic status, and risks of 15 cancer sites in Turkey. Cancer Causes & Control. 1993; 4(4): 313-21.
16- Giovannucci E, Leitzmann M, Spiegelman D, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, et al. A prospective study of physical activity and prostate cancer in male health professionals. Cancer Research. 1998; 58(22): 5117-22.
17. Hsing AW, McLaughlin JK, Zheng W, Gao Y-T, Blot WJ. Occupation, physical activity, and risk of prostate cancer in Shanghai, People's Republic of China. Cancer Causes & Control. 1994; 5(2): 136-40.
18- Cerhan JR, Torner JC, Lynch CF, Rubenstein LM, Lemke JH, Cohen MB, et al. Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States). Cancer Causes & Control. 1997; 8(2): 229-38.

19- Lacey JV, Deng J, Dosemeci M, Gao Y-T, Mostofi F, Sesterhenn IA, et al. Prostate cancer, benign prostatic hyperplasia and physical activity in Shanghai.China. International journal of epidemiology. 2001; 30(2): 341-9.
20- Sung JF, Lin RS, Pu YS, Chen YC, Chang HC, Lai MK. Risk factors for prostate carcinoma In Taiwan. Cancer. 1999; 86(3): 484-91.
21- Metin G, Atukeren P, GüMüSTAS MK, Belce A, Kayserilioglu A. The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats. The Tohoku journal of experimental medicine. 2002; 198(1): 47-53.
22- Chilibeck P, Bell G, Farrar R, Martin T. Higher mitochondrial fatty acid oxidation following intermittent versus continuous endurance exercise training. Canadian journal of physiology and pharmacology. 1998; 76(9): 891-4.
23- Kramer JK, Blais L, Fouchard RC, Melnyk RA, Kallury KM. A rapid method for the determination of vitamin E forms in tissues and diet by high-performance liquid chromatography using a normal-phase diol column. Lipids. 1997; 32(3): 323-30.
24- Ziaaldini MM, Koltai E, Csende Z, Goto S, Boldogh I, Taylor AW, et al. Exercise training increases anabolic and attenuates catabolic and apoptotic processes in aged skeletal muscle of male rats. Experimental gerontology. 2015; 67(4): 9-14.
25- Al-Jarrah M, Ahmad MB, Maayah M, Al-Khatib A. Effect of Exercise Training on the Expression of p53 and iNOS in the Cardiac Muscle of Type I Diabetic Rats. Journal of Endocrinology and Metabolism. 2012; 2(4-5): 176-80.
26- Saleem A, Adhihetty PJ, Hood DA. Role of p53 in mitochondrial biogenesis and apoptosis in skeletal muscle. Physiological genomics. 2009; 37(1): 58-66.
27- Qi Z, He J, Zhang Y, Shao Y, Ding S. Exercise training attenuates oxidative stress and decreases p53 protein content in skeletal muscle of type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. Free Radical Biology and Medicine. 2011; 50(7): 794-800.
28- Wawrzyniak A, Górnicka M, Hamułka J, Gajewska M, Drywień M, Pierzynowska J, et al.A α-Tocopherol, ascorbic acid, and β-carotene protect against oxidative stress but reveal no direct influence on p53 expression in rats subjected to stress. Nutrition research. 2013; 33(10); 868-875.
29- Levine AJ, Moshe O. "The first 30 years of p53: growing ever more complex." Nature Reviews Cancer. 2009; 9(10): 749-758.
30- Ding S, Qi Z, Li H, Chen C, Lu J. Different Effects Of Endurance Exercise On Muscle Growth Between Gastrocnemius And Soleus. Medicine & Science in Sports & Exercise. 2000; 41(5);73-77.
31- Ma Z, Qi J, Meng S, Wen B, Zhang J. Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. European journal of applied physiology. 2013; 113(10): 2473-86.

Original Article

The Comparison of the Effect of Vitamin E on the Expression of P53/PTEN of Prostate Gland of Male Rats in Two Groups of Intensive Continuous and Intermittent Exercise Training

Dashtiyan A[1]*, Afzalpour ME[1], Tanideh N[2], Sepehrimanesh M[3]

1. Department of Exercise Physiology, University of Birjand, Birjand, Iran
2. Stem Cell Technology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3. Gastrointestinal and Liver Diseases Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Received: 12 Jan 2017 Accepted: 25 Jul 2017

Abstract

Background & Objective: Physical activity and diet are the most important modifiable determinants of cancer risk. The aim of this study was to investigate the comparison of the effect of vitamin E on the expression of p53/PTEN prostate gland of male rats in two groups of intensive continuous and intermittent exercise training.

Materials & Methods: For this purpose, 56 male rats were randomly divided into 7 groups: [1] control group, [2] sham group, [3] intensive continuous training, [4] intensive intermittent training, [5] intensive continuous training + vitamin E, [6] intensive intermittent training + vitamin E, [7] vitamin E. The research training protocols were conducted in compliance with the principle of overload on the treadmill for six days a week, lasting 6 weeks. To measure expression changes of p53 and PTEN genes in rats' prostate, real-time PCR method was used and HPLC method was used to measure vitamin E. The One-way analysis of Variance test was used for comparisons among groups.

Results: Vitamin E in combination with continuous training induced a significant decrease in the p53 gene expression of IIT + VE group ($p < 0/004$) compared to the control group. In contrast, vitamin E in combination with intermittent training induced a significant decrease in expression of p53 ($p<0/013$) and a significant increase in the PTEN gene expression ($p<0/035$).

Conclusion: The results showed that physical exercise training reduced PTEN and p53 tumor suppressing gene expression by reducing oxidative stress, and vitamin E can be a somewhat increased expression of these genes.

Key Words: Vitamin E; Continuous training; intermittent training; p53; PTEN; Prostate Gland

***Corresponding Author: Amin Allah Dashtiyan,** Department of Exercise Physiology, University of Birjand, Birjand, Iran.
E-mail: amin.dashtiyan@gmail.com