● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست و دوم، شمارهٔ ۱، ص ۵۲-۴۲، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

اثر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان miR−155، $STAT_3$ و میزان پروتئین IL−6 توموری موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

عبدالرضا کاظمی[۱]، حمید آقا علی‌نژاد*[۲]، شعبان علیزاده[۳]، شیرین شهبازی[۴]، صادق امانی شلمزاری[۵]

خلاصه

مقدمه: تمرین استقامتی نقش بسزایی در پیشگیری و کمک به درمان سرطان پستان دارد. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثرات کمک درمانی تمرین استقامتی بر بیان miR–155 (ریزRNA– 155) و مبدل و فعال کننده پیام رونویسی–3 (Signal transducer and activator of transcription-3 یا $STAT_3$) در تومور پستان بود.

روش: ۱۶ موش ماده نژاد بالب سی به‌طور تصادفی به دو گروه تومور– ورزش (Exercise-Tumor یا ET) و تومور– استراحت (Rest-Tumor یا RT) تقسیم شدند. پس از آشناسازی، سلول‌های سرطانی وابسته به استروژن MC۴–L۲ به موش‌ها تزریق (یک میلیون سلول به هر موش) شد و گروه ET به مدت ۶ هفته (۵ روز در هفته) تمرینات استقامتی انجام دادند. حجم تومور هر هفته با کولیس دیجیتال اندازه گیری شد. در پایان موش‌ها قربانی شدند و بافت تومور استخراج و در دمای ۷۰– درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس استخراج RNA (Ribonucleic acid) و ساخت cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) به ترتیب با استفاده از پروتکل TRIzol و مطابق دستورالعمل کیت ساخت cDNA صورت گرفت. در نهایت روش Real-time PCR (Real-time polymerase chain reaction) انجام شد و داده‌ها جمع‌آوری گردید.

یافته‌ها: اختلاف معنی‌داری در بیان $STAT_3$، miR–155 و میزان پروتئین IL–6 در گروه‌های ET و RT مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). این نتایج با میزان پیشرفت تومور همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی بیان miR–155، $STAT_3$ و پروتئین IL–6 تومور پستان را کاهش می‌دهد. به نظر می‌رسد با کاهش بیان miR–155، ژن $STAT_3$ و پروتئین IL–6 در گروه ET، تمرین ورزشی استقامتی با کاهش بیان آنکوژن‌ها و عوامل التهابی نقش کمک درمانی دارد.

واژه‌های کلیدی: miR–155، ژن $STAT_3$، اینترلوکین 6، سرطان پستان، تمرین استقامتی

۱- استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران و مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

۲- دانشیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۳- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران ۵- مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران

*** نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** halinejad@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۱۰/۹ **دریافت مقاله اصلاح شده:** ۱۳۹۲/۱۲/۱۱ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۳/۱/۲۰

مقدمه

امروزه سرطان پستان یک تهدید جدی برای سلامتی زنان به شمار می‌رود. سرطان پستان انواع مختلفی دارد و بیشتر از نوع گیرنده استروژن مثبت (Estrogen receptor-Positive) است که برای رشد و گسترش به حضور استروژن نیازمند می‌باشد. حدود ۸۰ درصد انواع سرطان پستان در زنان ۴۵ سال به بالا از نوع گیرنده استروژن مثبت است (۱). التهاب رخداد کلیدی در رشد و گسترش سرطان پستان و انواع دیگر تومورها به شمار می‌رود. ارتباط بدیهی میان سرطان و التهاب وجود دارد. بنابراین بازداری از التهاب یک هدف احتمالی در پیشگیری و درمان سرطان می‌باشد (۲). بیش از ۲۵ درصد کل سرطان‌ها نتیجه عفونت مزمن و سایر انواع التهابات مزمن است (۳). التهاب می تواند بیان آنکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند ژن‌های هدف گذار پروتئینی و آنکومیرها) را به منظور ارتقای دگرگونی نئوپلاستیک تغییر دهد (۴).

به تازگی مشخص شده است برخی ریزRNAها (Ribonucleic acid) (گروهی از مولکول‌های تنظیم کننده) در سرطان و التهاب نقش دارند و ممکن است میانجی سرطان‌زایی (Carcinogenesis) القا شده به وسیله التهاب باشند (۵). به طور کلی ریزRNAهایی که در سرطان نقش دارند به دو دسته تقسیم می‌شوند: ۱- آن‌هایی که اثرات مهاری بر تومور دارند و ۲- آن‌هایی که اثرات تحریکی بر تومور داشته و سبب پیشرفت سرطان می‌شوند و به آن‌ها آنکومیر می‌گویند (۶). یکی از آنکومیرها miR-155 است (۷) که در شرایط التهابی در سرطان پستان افزایش می یابد (۸). همچنین ثابت شده است که تحریک آنکومیر- 155 از طریق IL-6 می‌تواند نقش مهمی در تومورزایی داشته باشد (۹). مطالعات افزایش بیان آنکومیر- 155 در انواع مختلف سرطان مانند سرطان پستان را نشان داده‌اند (۱۰، ۸). داده‌ها نشان می‌دهد آنکومیر- 155 به وسیله سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-6 و اینترفرون گاما فرابیانی می‌شود (۱۱). علاوه بر این، آنکومیر- 155 از طریق برخی عوامل از قبیل مبدل و فعال کننده پیام رونویسی (Signal transducer and activator of transcription-3 یا $STAT_3$) پل ارتباطی میان التهاب و سرطان است (۱۲).

$STAT_3$بر روی کروموزوم ۱۱ موش قرار دارد. موشی که دچار تخریب ژنی $STAT_3$گردد، تکثیر سایتوکاین IL-6 آن مختل می‌شود. همچنین ماکروفاژ این موش‌ها از $STAT_3$به IL-10 پاسخ نمی‌دهد (۱۳). بنابراین داده‌ها از نقش $STAT_3$در انتقال پیام در پاسخ به سایتوکاین‌ها مانند IL-6 حمایت می کند. $STAT_3$آنکوپروتئینی است که بقای سلولی، تکثیر و متاستاز را در خطوط سلولی سرطان پستان انسان تنظیم می کند (۱۴). افزایش بیان آنکومیر- 155 سیگنالینگ تومورزایی $STAT_3$را از طریق مسیر JAK (Janus kinase) در سلول سرطانی پستان ارتقا می بخشد. بنابراین آنکومیر- 155 از طریق $STAT_3$در سلول‌های اپی‌تلیال پستان به پیشرفت تومور منجر می‌شود (۵). علاوه بر این، سایتوکاین التهاب‌آور IL-6 سبب افزایش بیان آنکومیر- 155 و در نتیجه فراهم کردن ارتباط (Cross talk) میان IL-6 با آنکومیر- 155 و $STAT_3$و ایجاد ساز و کار جدیدی در تومورژنز مرتبط با التهاب می‌شود (۱۱). ساز و کار اثر تمرین و فعالیت بدنی در کاهش التهاب شاید کاهش رهایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی از قبیل IL-6 در پاسخ به انقباض عضلانی منظم باشد. با این وجود اثرات تمرین ورزشی بر التهاب محدود است و نتایج قانع کننده نیست (۱۵).

با توجه به ارتباط بدیهی میان سرطان و التهاب، تأثیر التهاب مزمن همراه با سرطان بر افزایش IL-6، آنکومیر- 155 و تأثیر آنکومیر- 155 بر سیگنالینگ JAK/$STAT_3$/SOCS۱ و همچنین تأکید مطالعات بر کشف داروها به منظور تنظیم مناسب ریزRNAها و وجود پژوهش‌های انگشت شمار در خصوص مکانیزم‌های مولکولی اثر تمرینات ورزش بر درمان سرطان، این سؤال

در ذهن محقق ایجاد شد که آیا فعالیت ورزشی از طریق کاهش التهاب بر میزان IL-6 و بیان ژن آنکومیر- 155 و $STAT_3$تومور پستان موش‌های ماده مبتلا به سرطان تأثیر دارد یا خیر؟

روش بررسی

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که به شیوه میدانی و آزمایشگاهی انجام شد. بدین منظور ۱۶ موش ماده نژاد بالب سی ۳ تا ۵ هفته ای با وزن ۱۵-۱۴ گرم از انیستیتو پاستور خریداری و به حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. پس از یک هفته آشناسازی با محیط، موش‌ها به دو گروه تمرین (Exercise-Tumor یا ET) (۸ سر) و شاهد (Rest-Tumor یا RT) (۸ سر) تقسیم گردیدند و همه آن‌ها با تزریق سلول (به هر موش یک میلیون سلول تزریق شد) سرطانی شدند. به منظور دستیابی به مقدار موردنظر از سلول‌های سرطانی، سلول‌ها در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) کشت داده شد. سپس موش‌ها به دو گروه هشت‌تایی تقسیم شدند و یک گروه به زندگی معمولی خود در قفس ادامه دادند (گروه شاهد یا RT) و گروه دیگر پس از پیدایش تومور، پروتکل تمرین استقامتی ارایه شده در جدول ۱ را انجام دادند (گروه تمرین یا ET). حجم تومور در طی اجرای پروتکل با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید. تمام موش‌ها در پایان اجرای پروتکل ورزشی (گروه ET و گروه RT) قربانی شدند و بلافاصله بافت تومور استخراج و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. میزان پروتئین IL-6 به روش ELISA و تغییرات بیان آنکومیر- 155 و بیان ژن $STAT_3$پس از استخراج RNA و ساخت cDNA (Complementary deoxyribonucleic acid) با استفاده از روش Real-time اندازه‌گیری گردید. پس از پیدایش تومور، گروه تمرین به مدت ۶ هفته تمرینات استقامتی تعدیل شده را بر روی تردمیل انجام دادند. پروتکل تمرینی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. *پروتکل تمرین ورزشی استقامتی بر روی نوار گردان*

دوره تمرین	سرعت (متر بر دقیقه)	زمان (دقیقه)	تکرار (روز در هفته)
مرحله آشناسازی	۶-۱۰	۲۰	۵
تزریق سلول سرطانی MC_4-L_2			
دو هفته اول	۱۴	۲۵	۵
دو هفته دوم	۱۶	۳۰	۵
دو هفته سوم	۱۸	۳۰	۵

سلول سرطانی از نوع کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (Estrogen receptor positive یا ER+) L2-MC4 بود (۱۶). سلول‌های L2-MC4 در فلاسک TV۵ در محیط کشت DMEM F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES (Hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid)، گلوتامین، پنی‌سلین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، استراپتومایسن ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و FBS (Fetal bovine serum) ۱۰ درصد کشت داده شد. پس از پر کردن ۹۰ درصد سطح فلاسک به وسیله سلول‌ها، مایع رویی برداشته و پس از شستشو با PBS (Phosphate buffered saline)، در مرحله بعد

با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵ از کف پلیت سلول ها جدا شد. پس از خنثی سازی آنزیم با محیط حاوی FBS ۱۰ درصد، کلیه محتویات فلاکس در داخل لوله فالکون ریخته و با سرعت ۱۲۰۰ دور به مدت ۵-۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی برداشته و پلاک سلولی در داخل محیط حاوی FBS ۱۰ درصد حل شد. در نهایت برای تعیین زنده ماندن و شمارش سلولی به ترتیب از تریپان بلو (Trypan blue) و لام هماسیتومتر استفاده شد. به منظور تزریق سلول ها برای ایجاد تومور، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه گردید. سپس به هر موش ماده نژاد بالب سی یک میلیون سلول به صورت زیر جلدی به ناحیه بالای سمت راست ران تزریق شد.

برای تعیین حجم تومور، طول آن به عنوان بزرگ ترین بعد و عرض آن به عنوان بعد دیگر اندازه گیری گردید. طول و عرض تومور هفته ای یک بار توسط کولیس دیجیتال اندازه گیری و با استفاده از فرمول محاسباتی حجم تومور Jones و همکاران (۱۷) (فرمول ذیل) میزان آن تعیین شد. برای دستیابی به داده خام موردنظر عدد محاسباتی روز آخر بر عدد روز اول تقسیم شد.

$$[V = \pi/۶ (w \times L۲)]$$

مراحل استخراج RNA بر اساس پروتکل TRIzol به صورت دقیق اجرا شد. با این تفاوت که برای استخراج miR-155 پس از اضافه نمودن ایزوپروپانول، سوپرناتانت به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید و سپس مراحل بعدی استخراج به ترتیب انجام گرفت. برای سنتز cDNA از کیت‌های مخصوص استفاده شد. برای سنتز cDNA ژن $STAT_3$از کیت شرکت کیاژن ۲۰۵۳۱۱ و برای ساخت cDNA ،miR-155 از کیت استراتاژن با Cat No: ۶۰۰۵۸۳ استفاده گردید.

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 (Real-time polymerase chain reaction) بر روی دستگاه کوربت (Corbett) برای ژن $STAT_3$شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و برای miR-155 شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۵ سیکل 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) و U۶ به عنوان ژن کنترل به ترتیب برای $STAT_3$و miR-155 استفاده شد. در جدول ۲ پرایمر miR-155 و ژن مورد اندازه‌گیری آمده است.

جدول ۲. *توالی پرایمرهای مورد استفاده برای miR-155 و ژن $STAT_3$در Real-time*

	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی	NCBI *
miR-۱۵۵	UUAAUGCUAAUUGUGAUAGGGGU	-	NR_029738
U٦	GCGCGTCGTGAAGCGTTC	GTGCAGGGTCCGAGGT	NR_003027
$STAT_3$	ACCCAACAGCCGCCGTAG	CAGACTGGTTGTTTCCATTCAGAT	NM_009741
GAPDH	TCAACAGCAACTCCCACTCTTCC	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	NM_008084

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
*: National Center for Biotechnology Information

پس از قربانی نمودن موش‌ها و به منظور اندازه‌گیری سطوح IL-6، بلافاصله بافت تومور برداشته و قسمت مرکزی آن (قسمت نکروز شده) حذف و قسمت رویی در نیتروژن مایع فریز و در دمای ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. در آزمایشگاه ۱۰۰ میلی گرم بافت تومور در ظرف هموژنایزر حاوی محلول لیزات قرار داده شد تا بافت کامل خرد شود و سپس سوسپانسیون رویی در میکروتیوب جدید منتقل شد و با سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه، ۱۵۰۰ گرم و ۴ درجه سلسیوس) قطعات بزرگ رسوب کردند و از سوپرناتنت رویی برای اندازه گیری IL-6 به روش Bradford استفاده گردید. محلول لیزات حاوی KCl (کلرید پتاسیم)، NaCl (کلرید سدیم)، Na2HPO4 (سدیم هیدروژن فسفات)، KH2PO4 (پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات) و PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) بود که در ۹۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید و پس از تنظیم pH (۷/۴-۷/۲) محلول با سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال به حجم یک لیتر رسانده شد. تعیین میزان IL-6 با روش آزمایشگاهی ELISA بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. برای اندازه گیری IL-6 از کیت ELISA ab۱۰۰۷۱۳ ساخت شرکت Abcam استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ (version 19, SPSS Inc., Chicago, IL) صورت گرفت و جهت تعیین معنی‌دار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری Independent t استفاده گردید (معنی‌داری در سطح $\alpha = ۰/۰۵$). برای تعیین سطح بیان ژن‌ها از نرم‌افزار Excel و فرمول $۲^{-\Delta\Delta ct}$ استفاده شد.

نتایج

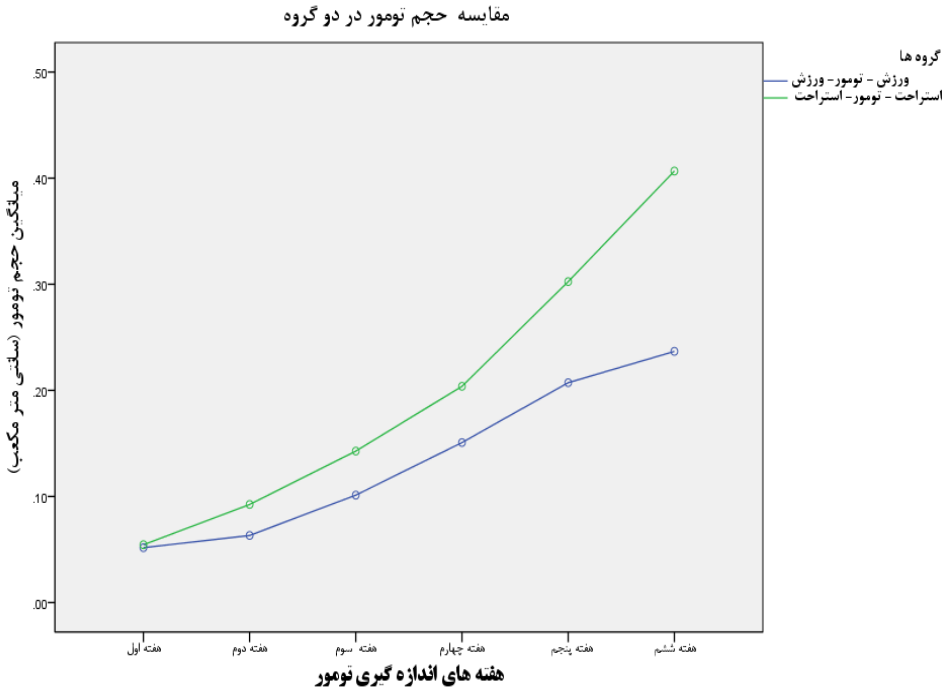
انجام تمرین استقامتی سبب کاهش بیان ژن آنکومیر-155، $STAT_3$و میزان پروتئین IL-6 در بافت تومور موش های ماده مبتلا به سرطان پستان شد. گروه ET که تمرینات استقامتی را پس از سرطانی شدن انجام می دادند نسبت به گروه RT مقادیر IL-6 پایین تری داشتند (جدول ۳). رشد تومور در دو گروه در حال افزایش بود، اما میزان رشد در گروه ET شیب کمتری داشت. حجم تومور در گروه RT بالاتر از ET می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳. *میزان پروتئین IL-6 و حجم تومور در گروه تمرین و شاهد (میانگین ± انحراف معیار)*

گروه‌های پژوهش / متغیرها		ورزش- تومور	استراحت- تومور
IL-6 (پیکوگرم در دسی‌لیتر)		۷۵/۱ ± ۳۸/۵	۱۹۵/۸ ± ۵۹/۷
حجم تومور (سانتی‌متر مکعب)	هفته اول	۰/۰۵۲ ± ۰/۰۰۱	۰/۰۵۴ ± ۰/۰۱۲
	هفته ششم	۰/۲۴۰ ± ۰/۰۱۴	۰/۴۱۶ ± ۰/۱۱۰
	هفته ششم بر هفته اول	۴/۵۷ ± ۰/۲۴	۷/۵۷ ± ۱/۶۷

نتایج آزمون Independent t نشان داد که در بیان ژن آنکومیر- 155 ($P = ۰/۰۱۰$ ،$F = ۸/۸۵$)، $STAT_3$($P < ۰/۰۰۱$ ،$F = ۸/۴۰$)، مقادیر پروتئین IL-6 ($P = ۰/۰۰۱$ ،$F = ۸/۱۶$ ،$P = ۰/۰۰۱$ ،$F = ۲۶/۲۰$) بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تمرین استقامتی منجر به کاهش بیان آنکومیر- 155، $STAT_3$و میزان پروتئین IL-6

توموری در گروه ET در مقایسه با گروه RT شد. این نتایج حاکی از اثرات مفید تمرینات استقامتی است. همچنین رشد تومور در گروه ET در مقایسه با گروه RT کاهش داشت (P = ۰/۰۰۱). نحوه رشد تومور در گروه RT و ET در طول اجرای پروتکل تمرین استقامتی در شکل ۱ آمده است. شیب رشد تومور در گروه ET کندتر و حجم اولیه تومور در گروه RT و ET برابر بود، اما میزان رشد نهایی در گروه ET کمتر شد.



شکل ۱. *تغییرات حجم تومور در دو گروه*

بحث

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بیان آنکومیر- 155، $STAT_3$و همچنین میزان پروتئین IL-6 با تمرین استقامتی در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان کاهش معنی‌داری داشت و این امر حاکی از اثرات مثبت تمرین استقامتی در سطح بافت تومور است. مطالعات مختلف نشان داده اند که ورزش سبب کاهش التهاب سیستمیک می‌شود (۱۸، ۱۵). همچنین التهاب مزمن می تواند در شکل گیری انواع بیماری های التهابی و از جمله سرطان پستان نقش مهمی داشته باشد (۱۹). $STAT_3$به وسیله سایتوکاین‌های خانواده اینترلوکین ۶ از قبیل IL-6 و IL-۱۱ فعال می‌شود (۲۰). علاوه بر نقش $STAT_3$بر رشد سلول‌های سرطانی، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که $STAT_3$از سلول‌های سرطانی نیز در مقابل آپوپتوز محافظت می کند (۲۱).

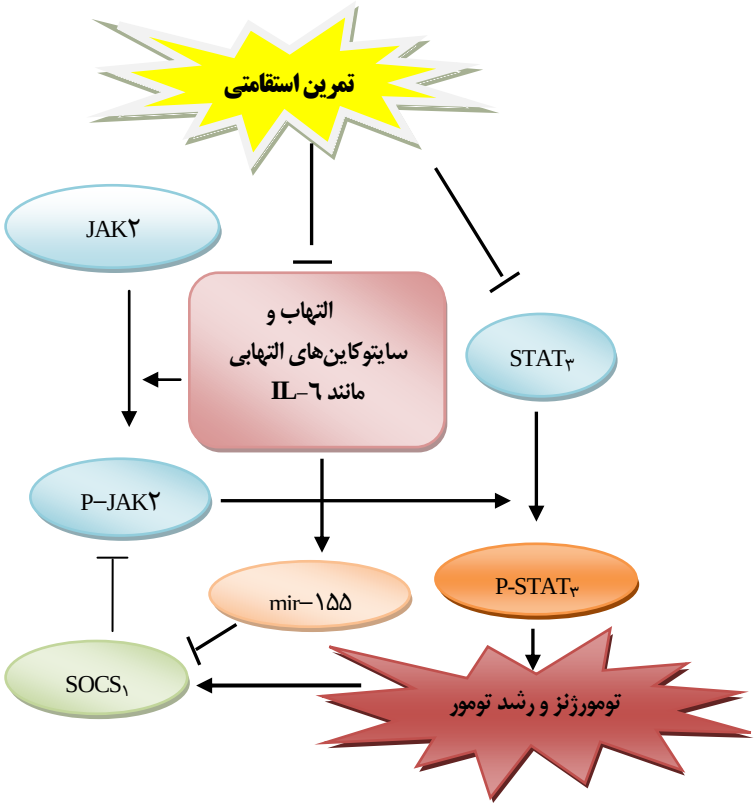
بر طبق نتایج حاصل شده از تحقیقات، بیان زیاد آنکومیر- 155در سلول های سرطانی پستان موجب فعال شدن پیوسته $STAT_3$به وسیله مهار SOCS۱ می شود. این شواهد نشان می دهد که اختلال در بیان آنکومیر- 155 می‌تواند مسیر $STAT_3$را که نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد، تحت تأثیر قرار دهد (۲۲). بیان شده است که بیان $STAT_3$در ۷۰ درصد از انواع سرطان به صورت ناخواسته افزایش می یابد و به عنوان یک آنکوپروتئین عمل می کند و پیام رسانی مداوم آن در بیشتر موارد منجر به تنظیم افزایشی سیگنال‌های پیش‌آنژیوژنیک و التهاب‌آور و در

نهایت منجر به رشد تومور می گردد (۲۳). امروزه $STAT_3$به عنوان یک هدف امیدوار کننده برای متوقف کردن در درمان سرطان مورد توجه است (۱۱، ۵).

آنکومیر- 155 در بیشتر سیگنال های التهابی تومورژنز $STAT_3$را از طریق فعال‌سازی غیر مستقیم تحت تأثیر قرار می دهد و فعال سازی پیوسته این مسیرهای سیگنالینگ موجب رشد، متاستاز و التهاب گسترش دهنده سرطان می‌شود (۲۴). همان گونه که ذکر شد، بیان آنکومیر- 155 نیز در نتیجه افزایش التهاب در سرطان افزایش می یابد (۱۲). ساز و کارها و اثرات مفید ورزش بر سرطان پستان بسیار پیچیده و چند وجهی است و ساز و کارهای اثرگذاری مثبت فعالیت بدنی بر سرطان پستان هنوز به طور کامل شناخته نشده است (۲۴). علاوه بر پژوهش حاضر، برخی مطالعات اثرات مثبت تمرین ورزشی بر کاهش بروز سرطان پستان را نشان دادند (۲۶، ۲۵). فعالیت بدنی خطر سرطان پستان را در زنان کاهش می‌دهد، اما ساز و کارهای درگیر در مدل های حیوانی و انسانی به طور کامل شناخته نشده اند (۲۷-۲۵). Ligibel و همکاران اظهار داشتند که فعالیت ورزشی خطر سرطان پستان را کاهش می دهد، اما ساز و کارهایی که این تأثیر را تنظیم می کنند هنوز به خوبی شناخته نشده‌اند (۲۶). یکی از ساز و کارهای احتمالی می‌تواند از طریق کاهش التهاب سیستمیک باشد (۲۸).

فعالیت ورزشی افراد را در مقابل بیماری‌هایی که به التهاب وابسته هستند از قبیل آترواسکلروز، دیابت و حتی سرطان محافظت می کند (۲۷، ۲۴، ۱۸، ۱۵). فعالیت ورزشی می‌تواند از طریق تعدیل سایتوکاین‌های التهابی از جمله اینترلوکین ۶، اثر ضد التهابی داشته باشد (نقش اینترلوکین ۶ ترشح شده از عضله با اینترلوکین ۶ که در التهاب سیستمیک افزایش می‌یابد، متفاوت است) (۱۵). در واقع فعالیت ورزشی یک ریزمحیط ضد التهابی را از طریق تولید حاد اینترلوکین ۶ از عضله اسکلتی ایجاد می کند. بر این اساس، فعالیت ورزشی منظم را می توان به عنوان یک عامل درمانی ضد التهابی و پیشگیری کننده در درمان سرطان در نظر گرفت (۱۵). به نظر می‌رسد که ورزش در واقع از طریق عوامل زیادی از قبیل اثرگذاری بر مسیر $JAK/STAT_3$ (که دربردارنده التهاب، IL-6، آنکومیر- 155 و $STAT_3$است) می تواند سبب بهبود در ریزمحیط تومور شود. به گونه‌ای که تمرین استقامتی منجر به کاهش التهاب IL-6 توموری، کاهش بیان ژن $STAT_3$و کاهش بیان آنکومیر- 155 و تمرین استقامتی از این مسیر سبب کاهش تکثیر سلولی، تغییر شکل سلولی، متاستاز و حجم تومور می‌شود (۱۱، ۵). در مطالعه حاضر تغییرات ریزمحیط تومور با کمتر بودن رشد و حجم تومور در گروه ET همسو بود. مطالعات دیگر نیز کاهش حجم تومور در نتیجه ورزش را نشان داده‌اند (۳۰، ۲۹، ۲۵)، اما ساز و کار کاهش حجم تومور به طور دقیق مشخص نشده و مسیر پیشنهاد شده در این پژوهش یک ساز و کار احتمالی است.

نتایج پژوهش حاضر به طور کلی حاکی از اثرت مفید ورزش در پیشگیری و کاهش سرعت پیشرفت تومور در موش های مبتلا به سرطان پستان است؛ به طوری که بیان آنکومیر- 155 و $STAT_3$پس از بروز سرطان در گروه ET نسبت به RT کمتر بود. احتمال دارد محیط التهابی که با بالاتر بودن عوامل التهابی (IL-6)، افزایش بیان آنکومیر- 155 و $STAT_3$مشخص می شود زمینه مستعد برای رشد اولیه تومور را فراهم آورد و ورزش از طریق کاهش سطوح سایتوکاین های التهاب آور زمینه رشد تومور را از بین ببرد. شکل ۲ ساز و کار احتمالی اثر مفید فعالیت ورزشی بر ریزمحیط تومور و کاهش حجم تومور در گروه ET را نشان می دهد. تمرین استقامتی سبب کاهش عامل التهابی از قبیل IL-6، بیان آنکومیر- 155 و همچنین کاهش بیان ژن $STAT_3$می‌شود. کاهش این عوامل سبب کاهش تومورژنز و رشد تومور نیز می گردد.



شکل ۲. *چگونگی اثر تمرین استقامتی در کاهش پیشرفت تومور و جلوگیری از رشد آن*

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش حاضر که بیانگر کاهش IL-6، آنکومیر- 155 و $STAT_3$در نتیجه تمرینات استقامتی هم راستا با کاهش حجم تومور و میزان رشد تومور است، می‌توان ادعا کرد که تمرین استقامتی نقش مثبتی در کمک به درمان سرطان پستان در موش‌های نژاد بالب سی دارد. مسیر پیشنهادی مطالعه حاضر این است که تمرینات استقامتی سبب کاهش التهاب و در نتیجه کاهش سایتوکاین‌های التهابی (مانند IL-6) می‌شود و کاهش سایتوکاین‌های التهابی نیز سبب کاهش بیان آنکومیر- 155 و کاهش بیان ژن $STAT_3$ و به تبع آن کاهش مهار SOCS۱ (افزایش بیان ژن SOCS۱) شده و در نهایت این مسیر سبب کاهش تومورژنز و کاهش سرعت رشد تومور به وسیله فعالیت ورزشی استقامتی منظم و مداوم می‌باشد. ورزش شاید نقش کمک درمانی را از طریق این مسیر ایفا کند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر بخشی از رساله دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد که با حمایت مالی این دانشگاه اجرا شد.

References

1. Boswell KA, Wang X, Shah MV, Aapro MS. Disease burden and treatment outcomes in second-line therapy of patients with estrogen receptor-positive (ER+) advanced breast cancer: a review of the literature. *Breast* 2012; 21(6): 701-6.
2. Maria de SC, Fonseca de CL, da S, V, Candida Araujo E Silva, Teresa Paz LM, Alves Neves Diniz FM, et al. Thalidomide attenuates mammary cancer associated-inflammation, angiogenesis and tumor growth in mice. *Biomed Pharmacother* 2012; 66(7): 491-8.
3. Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2373-80.
4. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 37-49.
5. Jiang S, Zhang HW, Lu MH, He XH, Li Y, Gu H, et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res* 2010; 70(8): 3119-27.
6. Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* 2009; 84(1): 55-71.
7. Pu J, Bai D, Yang X, Lu X, Xu L, Lu J. Adrenaline promotes cell proliferation and increases chemoresistance in colon cancer HT29 cells through induction of miR-155. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 428(2): 210-5.
8. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
9. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 2013; 532(1): 1-12.
10. Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 200-8.
11. Zhang LJ, Liu W, Gao YM, Qin YJ, Wu RD. The expression of IL-6 and STAT3 might predict progression and unfavorable prognosis in Wilms' tumor. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 435(3): 408-13.
12. Corcoran C, Friel AM, Duffy MJ, Crown J, O'Driscoll L. Intracellular and extracellular microRNAs in breast cancer. *Clin Chem* 2011; 57(1): 18-32.
13. Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41(16): 2502-12.
14. Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 165(5): 1449-60.
15. Moylan S, Eyre HA, Maes M, Baune BT, Jacka FN, Berk M. Exercising the worry away: how inflammation, oxidative and nitrogen stress mediates the beneficial effect of physical activity on anxiety disorder symptoms and behaviours. *Neurosci Biobehav Rev* 2013; 37(4): 573-84.
16. Lanari C, Luthy I, Lamb CA, Fabris V, Pagano E, Helguero LA, et al. Five novel hormone-responsive cell lines derived from murine mammary ductal carcinomas: in vivo and in vitro effects of estrogens and progestins. *Cancer Res* 2001; 61(1): 293-302.
17. 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. *J Appl Physiol* (1985) 2010; 108(2): 343-8.

18. Olesen J, Ringholm S, Nielsen MM, Brandt CT, Pedersen JT, Halling JF, et al. Role of PGC-1alpha in exercise training- and resveratrol-induced prevention of age-associated inflammation. *Exp Gerontol* 2013; 48(11): 1274-84.

19. Kanterman J, Sade-Feldman M, Baniyash M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. *Semin Cancer Biol* 2012; 22(4): 307-18.

20. Sano S, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases. *J Dermatol Sci* 2008; 50(1): 1-14.

21. Huang C, Xie K. Crosstalk of Sp1 and Stat3 signaling in pancreatic cancer pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2012; 23(1-2): 25-35.

22. Zhao XD, Zhang W, Liang HJ, Ji WY. Overexpression of miR -155 promotes proliferation and invasion of human laryngeal squamous cell carcinoma via targeting SOCS1 and STAT3. *PLoS One* 2013; 8(2): e56395.

23. Resemann HK, Watson CJ, Lloyd-Lewis B. The Stat3 paradox: a killer and an oncogene. *Mol Cell Endocrinol* 2014; 382(1): 603-11.

24. Li N, Grivennikov SI, Karin M. The unholy trinity: inflammation, cytokines, and STAT3 shape the cancer microenvironment. *Cancer Cell* 2011; 19(4): 429-31.

25. Westerlind KC, McCarty HL, Schultheiss PC, Story R, Reed AH, Baier ML, et al. Moderate exercise training slows mammary tumour growth in adolescent rats. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12(4): 281-7.

26. Ligibel JA, Giobbie-Hurder A, Olenczuk D, Campbell N, Salinardi T, Winer EP, et al. Impact of a mixed strength and endurance exercise intervention on levels of adiponectin, high molecular weight adiponectin and leptin in breast cancer survivors. *Cancer Causes Control* 2009; 20(8): 1523-8.

27. Suzuki R, Iwasaki M, Yamamoto S, Inoue M, Sasazuki S, Sawada N, et al. Leisure-time physical activity and breast cancer risk defined by estrogen and progesterone receptor status--the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Prev Med* 2011; 52(3-4): 227-33.

28. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: a translational perspective. *Brain Behav Immun* 2013; 30(Suppl): S75-S87.

29. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol* (1985) 2004; 96(6): 2249-56.

30. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux TL, McClellan JL, Steiner JL, Carmichael MD, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3(1)SV40Tag mice. *Cytokine* 2011; 55(2): 274-9.

The Effect of Endurance Training on MiR-155 Expression, STAT3 Gene Expression, and Interleukin 6 Protein in Mice with Breast Cancer

Abdolreza Kazemi, Ph.D.[1], Hamid Agha-Alinejad, Ph.D.[2*], Shaban Alizadeh, Ph.D.[3], Shirin Shahbazi, Ph.D[4], Sadegh Amani-Shalamzari[5]

1. Assistant Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, School of Humanities, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran & Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

2. Associate Professor, Department of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Hematology, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Assistant Professor, Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5. Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author; e-mail: halinejad@modares.ac.ir

(Received: 30 Dec. 2013 Accepted: 9 April 2014)

Abstract

Background & Aims: Endurance training has an important role in the prevention and adjuvant therapy of breast cancer. The aim of the present study was to investigate the role of endurance training on miR-155 expression, signal transducer and activator of transcription-3 ($STAT_3$) gene expression, and interleukin 6 (IL-6) protein in breast cancer tumor in mice.

Methods: In this study, 16 female Balb/C mice were randomly divided into exercise-tumor (ET) and rest-tumor (RT) groups. The mice were oriented in the environment and one million estrogen-dependent breast cancer cells (MC4L2) were injected into each mouse. Subsequently, the ET group performed endurance exercise, 5 days per week for 6 weeks. Tumor volume was measured by a digital caliper weekly. Finally, the mice were sacrificed and tumor tissue was removed and kept in -70°C. Then, RNA was extracted by the Trizol protocol and complementary DNA (cDNA) was synthesized according to guidelines of the Kit Company. Consequently, the real-time PCR method was performed and data was collected.

Results: Significant differences were observed between the ET and RT groups in the $STAT_3$ gene expression, miR-155 expression, and IL-6 protein ($P < 0.05$). These results were consistent with tumor growth rate.

Conclusion: Exercise can reduce miR-155 expression, $STAT_3$ gene expression, and IL-6 protein in tumor tissue. Due to the reduction in miR-155 expression, $STAT_3$ gene expression, and IL-6 protein in the ET group, it can be claimed that endurance training can be used as adjuvant therapy by decreasing of oncogenic and inflammation factors.

Keywords: MiR-155, $STAT_3$ gene, Interleukin 6 (IL-6), Breast cancer, Endurance training

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2015; 22(1): 42-52