

اثر یک دوره تمرین استقامتی بر بیان miR-155، STAT₃ 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 (ریز-RNA-155) و مبدل و فعال کننده پیام رونویسی-3 (Signal transducer and activator of transcription-3 یا STAT₃) در تومور پستان بود.

روش: ۱۶ موش ماده نژاد بلب 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 اندازه‌گیری 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 STAT₃، miR-155 و میزان پروتئین IL-6 در گروه‌های ET و RT مشاهده شد ($P < 0/05$). این نتایج با میزان پیشرفت تومور همخوانی داشت.

نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی بیان miR-155 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، STAT₃، اینترلوکین 6، سرطان پستان، تمرین استقامتی

- ۱- استادیار، گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه ولی عصر (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 پیرایشگری، 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 بازداري 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 می‌تواند بیان آنکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند ژن‌های هدف گذار پروتئینی و آنکو میرها) را به منظور ارتقای دگرگونی نوپلاستیک تغییر دهد (۴).

به تازگی مشخص شده است برخی ریز RNAها (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 ریز RNAهایی 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 آنکو میر می‌گویند (۶). یکی از آنکو میرها miR-155 است (۷) که در شرایط التهابی در سرطان پستان افزایش می‌یابد (۸). همچنین ثابت شده است که تحریک آنکو میر-155 از طریق IL-6 می‌تواند نقش مهمی در تومورزایی داشته باشد (۹). مطالعات افزایش بیان آنکو میر-155 در انواع مختلف سرطان مانند سرطان پستان را نشان داده‌اند (۸، ۱۰). داده‌ها نشان می‌دهد آنکو میر-155 به وسیله سایتو کاین‌های التهابی مانند IL-6 و اینترفرون گاما فرایابی می‌شود (۱۱). علاوه بر

این، آنکو میر-155 از طریق برخی عوامل از قبیل مبدل و فعال کننده پیام رونویسی (Signal transducer and activator of transcription-3 یا STAT₃) پل ارتباطی میان التهاب و سرطان است (۱۲).

STAT₃ بر روی کروموزوم ۱۱ موش قرار دارد. موشی که دچار تخریب ژنی STAT₃ گردد، تکثیر سایتو کاین IL-6 آن مختل می‌شود. همچنین ماکروفاژ این موش‌ها از STAT₃ به IL-10 پاسخ نمی‌دهد (۱۳). بنابراین داده‌ها از نقش STAT₃ در انتقال پیام در پاسخ به سایتو کاین‌ها مانند IL-6 حمایت می‌کند. STAT₃ آنکو پروتئینی است که بقای سلولی، تکثیر و متاستاز را در خطوط سلولی سرطان پستان انسان تنظیم می‌کند (۱۴). افزایش بیان آنکو میر-155 سیگنالینگ تومورزایی STAT₃ را از طریق مسیر JAK (Janus kinase) در سلول سرطانی پستان ارتقا می‌بخشد. بنابراین آنکو میر-155 از طریق STAT₃ در سلول‌های اپی‌تلیال پستان به پیشرفت تومور منجر می‌شود (۵). علاوه بر این، سایتو کاین التهاب آور IL-6 سبب افزایش بیان آنکو میر-155 و در نتیجه فراهم کردن ارتباط (Cross talk) میان IL-6 با آنکو میر-155 و STAT₃ 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 سایتو کاین‌های پیش التهابی 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، آنکو میر-155 و تأثیر آنکو میر-155 بر سیگنالینگ JAK/STAT₃/SOCS1 و همچنین تأکید مطالعات بر کشف داروها به منظور تنظیم مناسب ریز RNAها و وجود پژوهش‌های انگشت شمار در خصوص مکانیزم‌های مولکولی اثر تمرینات ورزش بر درمان سرطان، این سؤال

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 ارائه 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 آنکو میر - 155 و بیان ژن STAT₃ 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.

در ذهن محقق ایجاد شد که آیا فعالیت ورزشی از طریق کاهش التهاب بر میزان IL-6 و بیان ژن آنکو میر - 155 و STAT₃ 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 هفته‌ای با وزن ۱۴-۱۵ 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

جدول ۱. پروتکل تمرین ورزشی استقامتی بر روی نوارگردان

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

پنی سلین 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

سلول سرطانی از نوع کارسینومای مجاری پستان گیرنده استروژن مثبت (Estrogen receptor positive یا ER+ (L₂-MC₄ بود (۱۶). سلول‌های MC₄-L₂ در فلاسک TV5 در محیط کشت DMEM F-۱۲ با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES (Hydroxyethyl piperazineethane sulfonic acid)، گلوتامین،

miR-155 پس از اضافه نمودن ایزوپروپانول، سوپرناتانت به مدت یک شبانه روز در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید و سپس مراحل بعدی استخراج به ترتیب انجام گرفت. برای سنتز cDNA از کیت های مخصوص استفاده شد. برای سنتز cDNA ژن STAT₃ از کیت شرکت کیاژن ۲۰۵۳۱۱ و برای ساخت miR-155 cDNA 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 STAT₃ 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 U6 به عنوان ژن کنترل به ترتیب برای STAT₃ و miR-155 استفاده شد. در جدول ۲ پرایمر miR-155 و ژن مورد اندازه گیری آمده است.

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 فالكون ریخته و با سرعت ۱۲۰۰ دور به مدت ۳-۵ 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 میلی لیتر بافر PBS تهیه گردید. سپس به هر موش ماده نژاد بلب 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 مورد نظر عدد محاسباتی روز آخر بر عدد روز اول تقسیم شد.

$$[V = \pi/6 (w \times L^2)]$$

مراحل استخراج RNA بر اساس پروتکل TRIzol به صورت دقیق اجرا شد. با این تفاوت که برای استخراج

جدول ۲. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای miR-155 و ژن STAT₃ در Real-time

آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی	NCBI*
miR-155	-	NR_029738
U6	GTCAGGGTCCGAGGT	NR_003027
STAT ₃	CAGACTGGTTGTTCCATTCAGAT	NM_009741
GAPDH	ACCCTGTTGCTGTAGCCGTATTC	NM_008084

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

*: National Center for Biotechnology Information

برای اندازه گیری IL-6 از کیت ELISA ab100713 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 $\alpha = 0/05$). برای تعیین سطح بیان ژن‌ها از نرم‌افزار Excel و فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

نتایج

انجام تمرین استقامتی سبب کاهش بیان ژن آنکو میر-155، STAT₃ و میزان پروتئین IL-6 در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان شد. گروه ET که تمرینات استقامتی را پس از سرطانی شدن انجام می‌دادند نسبت به گروه RT مقادیر IL-6 پایین‌تری 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).

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 سوپرناتانت رویی برای اندازه‌گیری 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 میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل گردید و پس از تنظیم pH (۷/۴-۷/۲) محلول با سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال به حجم یک لیتر رسانده شد. تعیین میزان IL-6 با روش آزمایشگاهی ELISA بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.

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

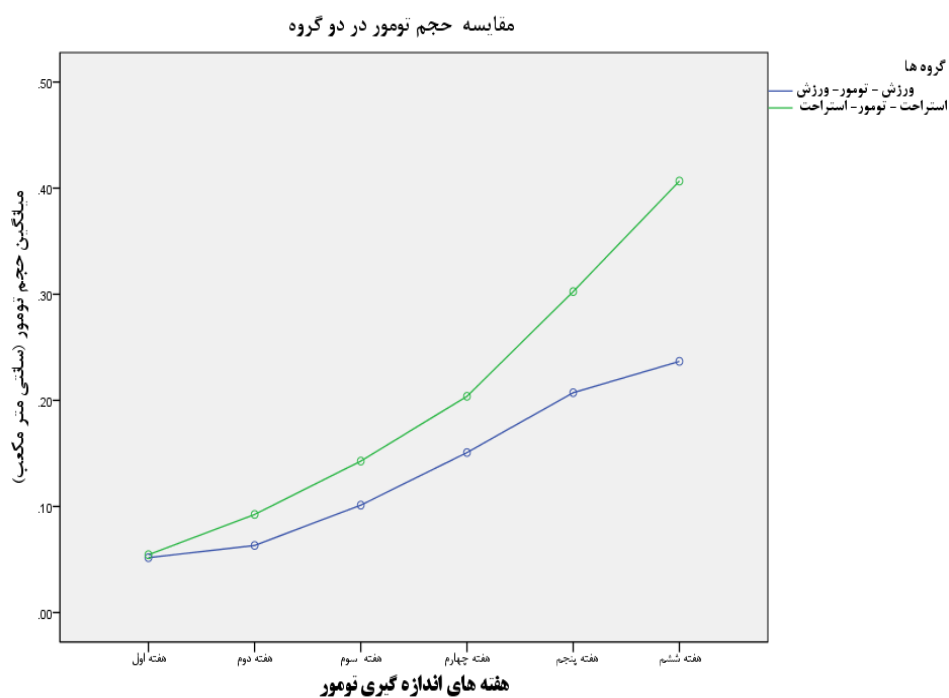
گروه‌های پژوهش		متغیرها
ورزش - تومور	استراحت - تومور	
۷۵/۱ \pm ۳۸/۵	۱۹۵/۸ \pm ۵۹/۷	IL-6 (پیکوگرم در دسی لیتر)
۰/۰۵۲ \pm ۰/۰۰۱	۰/۰۵۴ \pm ۰/۰۱۲	هفته اول
۰/۲۴۰ \pm ۰/۰۱۴	۰/۴۱۶ \pm ۰/۱۱۰	حجم تومور
۴/۵۷ \pm ۰/۲۴	۷/۵۷ \pm ۱/۶۷	سانتی متر مکعب) هفته ششم بر هفته اول

(F و حجم تومور ($F = 26/20$, $P = 0/001$) بین دو گروه تفاوت معنی‌داری وجود داشت. تمرین استقامتی منجر به کاهش بیان آنکو میر-155، STAT₃ و میزان پروتئین IL-6

نتایج آزمون Independent t نشان داد که در بیان ژن آنکو میر-155 ($F = 8/85$, $P = 0/010$)، STAT₃ ($F = 8/16$, $P = 0/001$)، مقادیر پروتئین IL-6 ($F = 8/40$, $P = 0/001$)،

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.

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 ($P = 0/001$). نحوه رشد تومور در گروه RT و ET در طول



شکل ۱. تغییرات حجم تومور در دو گروه

بحث

سرطانی، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که STAT₃ از سلول‌های سرطانی نیز در مقابل آپوپتوز محافظت می‌کند (۲۱). بر طبق نتایج حاصل شده از تحقیقات، بیان زیاد آنکو میر - 155 در سلول‌های سرطانی پستان موجب فعال شدن پیوسته STAT₃ به وسیله مهار SOCS1 می‌شود. این شواهد نشان می‌دهد که اختلال در بیان آنکو میر - 155 می‌تواند مسیر STAT₃ را که نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد، تحت تأثیر قرار دهد (۲۲). بیان شده است که بیان STAT₃ در ۷۰ درصد از انواع سرطان به صورت ناخواسته افزایش می‌یابد و به عنوان یک آنکو پروتئین عمل می‌کند و پیام‌رسانی مداوم آن در بیشتر موارد منجر به تنظیم افزایشی سیگنال‌های پیش‌آنژیوژنیک و التهاب‌آور و در

یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بیان آنکو میر - 155، STAT₃ 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 داده‌اند که ورزش سبب کاهش التهاب سیستمیک می‌شود (۱۸، ۱۵). همچنین التهاب مزمن می‌تواند در شکل‌گیری انواع بیماری‌های التهابی و از جمله سرطان پستان نقش مهمی داشته باشد (۱۹). STAT₃ به وسیله سایتوکاین‌های خانواده اینترلوکین ۶ از قبیل IL-6 و IL-11 فعال می‌شود (۲۰). علاوه بر نقش STAT₃ بر رشد سلول‌های

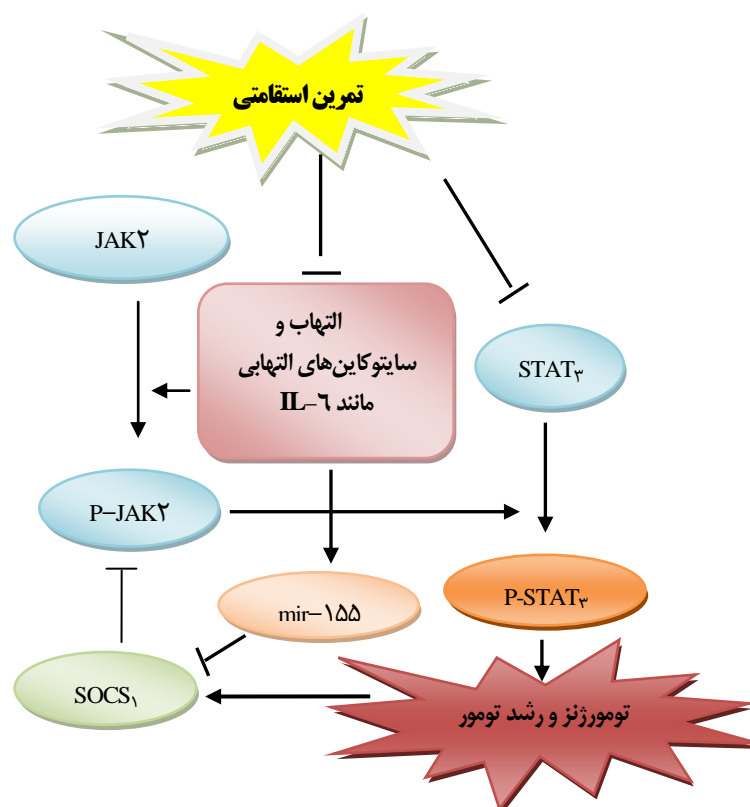
درمانی ضد التهابی و پیشگیری کننده در درمان سرطان در نظر گرفت (۱۵). به نظر می‌رسد که ورزش در واقع از طریق عوامل زیادی از قبیل اثرگذاری بر مسیر JAK/STAT₃ (که در بردارنده التهاب، IL-6، آنکو میر-155 و STAT₃ است) می‌تواند سبب بهبود در ریز محیط تومور شود. به گونه‌ای که تمرین استقامتی منجر به کاهش التهاب IL-6 توموری، کاهش بیان ژن STAT₃ و کاهش آنکو میر-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 ریز محیط 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 اثر مفید ورزش در پیشگیری و کاهش سرعت پیشرفت تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان است؛ به طوری که بیان آنکو میر-155 و STAT₃ 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 آنکو میر-155 و STAT₃ مشخص می‌شود زمینه مستعد برای رشد اولیه تومور را فراهم آورد و ورزش از طریق کاهش سطوح سایتوکاین‌های التهاب آور زمینه رشد تومور را از بین ببرد. شکل ۲ ساز و کار احتمالی اثر مفید فعالیت ورزشی بر ریز محیط تومور و کاهش حجم تومور در گروه ET را نشان می‌دهد. تمرین استقامتی سبب کاهش عامل التهابی از قبیل IL-6، بیان آنکو میر-155 و همچنین کاهش بیان ژن STAT₃ می‌شود. کاهش این عوامل سبب کاهش تومورژنز و رشد تومور نیز می‌گردد.

نهایت منجر به رشد تومور می‌گردد (۲۳). امروزه STAT₃ به عنوان یک هدف امیدوار کننده برای متوقف کردن در درمان سرطان مورد توجه است (۱۱، ۵).

آنکو میر-155 در بیشتر سیگنال‌های التهابی تومورژنز STAT₃ را از طریق فعال‌سازی غیر مستقیم تحت تأثیر قرار می‌دهد و فعال‌سازی پیوسته این مسیرهای سیگنالینگ موجب رشد، متاستاز و التهاب گسترش دهنده سرطان می‌شود (۲۴). همان گونه که ذکر شد، بیان آنکو میر-155 نیز در نتیجه افزایش التهاب در سرطان افزایش می‌یابد (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 مدل‌های حیوانی و انسانی به طور کامل شناخته نشده‌اند (۲۷-۲۵). Ligibel و همکاران اظهار داشتند که فعالیت ورزشی خطر سرطان پستان را کاهش می‌دهد، اما ساز و کارهایی که این تأثیر را تنظیم می‌کنند 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 می‌کند (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 ریز محیط ضد التهابی را از طریق تولید حاد اینترلوکین ۶ از عضله اسکلتی ایجاد می‌کند. بر این اساس، فعالیت ورزشی منظم را می‌توان به عنوان یک عامل



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

نتیجه‌گیری

و کاهش بیان ژن STAT₃ و به تبع آن کاهش مهار SOCS₁ (افزایش بیان ژن SOCS₁) 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.

با توجه به نتایج پژوهش حاضر که بیانگر کاهش IL-6، آنکومیر-155 و STAT₃ 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 بلب 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

References

- 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.
- 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.
- Hussain SP, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121(11): 2373-80.
- Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 37-49.
- 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.
- 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.
- 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.
- Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11): 857-66.
- Elton TS, Selemo H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* 2013; 532(1): 1-12.
- Garofalo M, Condorelli GL, Croce CM, Condorelli G. MicroRNAs as regulators of death receptors signaling. *Cell Death Differ* 2010; 17(2): 200-8.
- 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.
- 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.
- 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.
- Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 2004; 165(5): 1449-60.
- 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.
- 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.
- 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-Shalamzari⁵

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 (STAT₃) 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 STAT₃ 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, STAT₃ gene expression, and IL-6 protein in tumor tissue. Due to the reduction in miR-155 expression, STAT₃ 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, STAT₃ gene, Interleukin 6 (IL-6), Breast cancer, Endurance training