

Effect of Interval Training on the Expression of Mesenchymal Biomarker Vimentin and Tumor Volume in Mice with Breast Cancer

Gholamian S¹, Attarzadeh Hosseini R^{2*}, Rashidlamir A², Aghaalinejad H³

¹ Ph.D. Student in Exercise physiology (Biochemistry and Metabolism), Faculty of Sports Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

² Faculty of Sports Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

³ Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Receive: 2019/2/13
Accepted: 2019/4/23

***Corresponding Author:**

Seyyed Reza Attarzadeh hosseini
Attarzadeh@um.ac.ir

Ethics Approval:

IR.MUM.FUM.REC.1397.038

Abstract

Introduction Many deaths from cancer are due to metastases, a process which involves the epithelial-mesenchymal transition (EMT). On the other hand, regular exercise plays an important role in inhibiting the progression of breast cancer. Therefore, the purpose of this study was to investigate the influence of interval training on the expression of *VIM*, the gene encoding for EMT biomarker vimentin, and tumor volume in mice with breast cancer.

Methods: Thirty-two female BALB/c mice were randomly divided into four groups: Exercise-Tumor-Exercise (ETE), Rest-Tumor-Rest (RTR), Rest-Tumor-Exercise (RTE), and Exercise-Tumor-Rest (ETR). Interval training was performed six weeks before and four weeks after the induction of 4T1 mammary carcinoma. The real-time PCR method was used to evaluate the expression of vimentin. Data were analyzed with one-way ANOVA followed by post hoc methods, considering a P value of <0.05 significant.

Results: Tumor tissue *VIM* expression in the ETE group decreased significantly ($P < 0.001$, $F = 270.85$). Also, a significant decrease in tumor volume was observed in both RTE and ETE groups compared to the control group (RTR) ($F = 23.81$, $P < 0.001$).

Conclusion: Based on the results of this study, a period of interval training (before and after tumor) may decrease tumor growth and the expression of *VIM*. This kind of exercise can, in addition to the preventive role, may play a role in the treatment of breast cancer.

Keywords: Breast Cancer, Mesenchymal Biomarker, Vimentin, Interval Training, Tumor Volume

تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان بیومارکر مزانشیمی Vimentin و حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان

سمیرا غلامیان^۱، سیدرضا عطارزاده حسینی^{۲*}، امیر رشیدلمیر^۲، حمیدآقاعلی‌نژاد^۳

^۱ دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی (بیوشیمی و متابولیسم)، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد،

ایران

^۲ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

^۳ گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

تاریخ ارسال: ۹۷/۱۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۳

نشانی نویسنده مسئول:

سیدرضا عطارزاده حسینی

Attarzadeh@um.ac.ir

مقدمه: بسیاری از مرگ‌ومیرهای مبتلایان به سرطان ناشی از متاستاز است و فرایند درگیر در متاستاز انتقال از حالت ایپی‌تلیالی به مزانشیمی است. از طرفی، فعالیت ورزشی منظم نقش مهمی در مهار پیشرفت سرطان پستان دارد. بنابراین، هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان بیومارکر مزانشیمی و تغییرات حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود.

روش بررسی: تعداد ۳۲ موش ماده نژاد بال‌بسی به‌طور تصادفی به ۴ گروه مساوی ورزش تومور ورزش، استراحت تومور استراحت، استراحت تومور ورزش و گروه ورزش تومور استراحت تقسیم شدند. ۶ هفته قبل و ۴ هفته بعد از پیدایش تومور، تمرین تناوبی اجرا شد. تمام موش‌ها از طریق تزریق زیرجلدی از رده سلولی 4T-1 سرطانی شدند. برای بررسی بیان ژن Vimentin از روش Real-Time PCR استفاده شد. داده‌ها با روش آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معناداری ($P < 0/05$) تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بیان ژن Vimentin بافت تومور در گروه تمرین تومور تمرین نسبت به گروه استراحت تومور استراحت کاهش معناداری داشت ($270/85$ ، $F=0/0001$ ، $p \leq 0/0001$) همچنین، کاهش معنادار حجم تومور در هر دو گروه تمرینی (ETE & RTE) نسبت به گروه کنترل (RTR) مشاهده شد ($F=23/81$ ، $p=0/0001$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج پژوهش حاضر، یک دوره تمرین تناوبی (قبل و بعد از پیدایش تومور) با کاهش رشد حجم تومور و کاهش بیان ژن Vimentin، این نوع تمرین، می‌تواند علاوه بر نقش پیشگیرانه نقش کمک درمانی در سرطان پستان داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، بیومارکر مزانشیمی، Vimentin، تمرین تناوبی، حجم تومور

مقدمه

سرطان پستان یک مشکل بهداشتی عمومی روبه‌رشد در سرتاسر جهان است. عامل اصلی مرگ ناشی از سرطان پیچیدگی‌های ناشی از متاستاز است (۱). متاستاز رخداد زیستی پویا و چندگانه‌ای است که موفقیت در این فرایند مستلزم آن است که سلول‌های سرطانی توانایی جداسدن از سلول‌های مجاور را داشته باشند؛ به‌طوری‌که ماتریکس برون‌سلولی و غشای پایه را هدف قرار دهند، وارد جریان خون شوند و سرانجام به بافت‌های دورتر وارد شوند. سپس، از خون خارج شوند، به بافت‌های مزانشیمی وارد شوند و در آن‌جا تکثیر گردند و موجب تشکیل تومور ثانویه در آن محل شوند. در واقع، این فرایند مسئول گسترش میزان شیوع و مرگ‌ومیر ناشی از سرطان است. یکی از مراحل حیاتی در آبشار متاستاز، فرایند انتقال از حالت اپیتلیالی به حالت مزانشیمی یا همان EMT^۱ است. این مرحله شروع متاستاز را نشان می‌دهد که به‌ویژه در دهه اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (۲،۳). مطالعات گسترده نشان داده‌اند که EMT با متاستاز و پیشرفت سرطان مرتبط است (۴). EMT فرایندی است که سلول‌ها طی انتقال از فنوتیپ اپیتلیالی به فنوتیپ مزانشیمی، با تهاجم و تحرک بیشتر تغییر می‌کنند. سلول‌های اپیتلیالی در یک واحد مجتمع سازمان‌دهی می‌شوند و با ازدست‌دادن پروتئین‌های اتصال سلولی، عناصر اسکلت سلولی و به‌دست‌آوردن جنبش، کاده‌رین‌های مزانشیمی به سلول‌های مزانشیمال تبدیل می‌شوند (۵). مراحل EMT با یک سری عوامل رونویسی تنظیم می‌شوند که از جمله آن‌ها Vimentin است (۶). ژن Vimentin روی کروموزوم ۱۲p۱۳ قرار دارد و این پروتئین ۴۶۶ اسید آمینه دارد و ۵۷ kDa - وزن دارد (۷). Vimentin یکی از پروتئین‌های اصلی روی غشا است که باعث اتصال سلول به بستر ماتریکسی بافت می‌شود (۸). این پروتئین نوعی پروتئین لنگرانداز است و بیان زیاد پروتئین Vimentin با مهار E-کاده‌رین و القای EMT، باعث افزایش توانایی تهاجم و متاستاز سلول‌های سرطانی می‌شود (۹)؛ بر این اساس، اخیراً به‌عنوان یک هدف برای درمان سرطان در نظر گرفته شده است (۷). تمرینات بدنی با شدت متوسط، با تقویت

سیستم ایمنی و رهایی مایوکاین‌ها نقش مهمی در پیشگیری از بروز بیماری‌های التهابی از جمله سرطان پستان دارند. ورزش باعث کاهش درصد چربی بدن، کاهش چاقی و افت التهاب سیستمی با درجه پایین می‌شود. هرکدام از این عوامل در پاتوژنز سرطان نقش دارند؛ بنابراین، تمرینات ورزشی پتانسیل پیشگیری از سرطان را دارند. براساس گزارش پژوهش‌ها، فعالیت بدنی می‌تواند از ۵۰٪ از سرطان‌ها پیشگیری کند (۱۰). با وجود بررسی‌های انجام‌شده در زمینه تأثیر تمرین ورزشی بر فرایند EMT، پژوهش‌های بسیار کمی درباره نقش تمرینات ورزشی در بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی در سرطان انجام شده‌اند. در این راستا، ژانگ^۲ و همکاران (۱۱) بعد از ۹ هفته تمرین شنا با شدت متوسط (۸ دقیقه در روز) کاهش بیان ژن Vimentin را در موش‌های مبتلا به سرطان کبد مشاهده کردند. آن‌ها با تأکید بر سیستم عصبی بیان کردند که فعالیت ورزشی شنا با شدت متوسط باعث افزایش دوپامین^۳ می‌شود که در پی آن، گیرنده دوپامین ۴۲ (که دارای فعالیت ضدتوموری است) فعال می‌شود و از این طریق باعث سرکوب فرایند EMT و در نتیجه، سرکوب رشد و پیشرفت تومور می‌شود (۱۱). پروتکل تمرینی این‌تروال شامل تمرینات شدید کوتاه‌مدت با استراحت کوتاه و با شدت کم، از علایمی مانند تهوع و خستگی پا جلوگیری می‌کند (۱۲). انجام تمرینات تناوبی اثرهایی مفید مانند افزایش ظرفیت هوازی، استقامت، کاهش وزن و عملکرد متابولیک قلب برای افراد مبتلا به سرطان پستان دارد (۱۳)؛ اما اثر این نوع تمرین تناوبی به‌عنوان یک روش تمرینی در سازوکارهای سلولی-مولکولی و نحوه اثرها بر مسیرهای سیگنالی مؤثر در رشد تومور و متاستاز بسیار کم بررسی شده یا بررسی نشده است. افزون بر این، اغلب داروهای دردسترس برای درمان سرطان به‌علت تک هدف بودن، سمی بودن زیاد، هزینه بسیار زیاد، اطمینان نداشتن از برگشت دوباره توده سرطانی و برگشت مهار رشد و چسبندگی سلولی ممکن است در درمان کارایی چندانی نداشته باشند؛ بنابراین، تمرینات تناوبی می‌توانند روشی مناسب برای پیشگیری از سرطان و در مراحل بعد، بخشی مهم و حیاتی از فرایند

² Zhang

³ Dopamine

⁴ Dopamine Receptor 2

¹ Epithelial to Mesenchymal Transition

پستان است که توانایی متاستاز مؤثر به نواحی ای را دارد که در سرطان پستان انسانی آلوده می‌شوند. 4T-1 که از تومور خودبه‌خود ایجاد شده در موش BALB/c مشتق شده است، توانایی متاستاز به چندین ارگان را مانند ریه، کبد، مغز و استخوان دارد که در سرطان پستان درگیر می‌شوند (۱۵). در این پژوهش، سلول 4T-1 در فلاسک T75 در محیط DMEDM/F-12 با ۱۵ میلی‌مول بافر HEPES، گلوتامین، پنی‌سیلین ۱۰۰ µg/ml، استرپتومایسین ۱۰۰ µg/ml و ۱۰ FBS درصد کشت داده شد. پس از آنکه سلول‌ها به اندازه مورد نیاز در محیط آزمایشگاه کشت داده شدند، سوسپانسیون سلولی با تراکم ۱۰ میلیون در هر میلی‌لیتر بافر PBS تهیه گردید. به هر موش یک میلیون سلول به‌صورت زیرجلدی و متمرکز به ناحیه بالای ران تزریق شد. در حدود ۱۰ روز پس از تزریق، تومور در ناحیه تزریق قابل تشخیص بود. حجم تومور در ۲ محور طولی و عرضی اندازه‌گیری شد. بزرگ‌ترین بعد تومور به‌عنوان طول (L) تومور و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به‌عنوان عرض (W) تومور در نظر گرفته شد و با استفاده از فرمول حجم تومور جونز^۹ و همکاران (۱۶) به‌صورت $V = \frac{1}{2} (L^2 \times W)$ - میزان آن تعیین شد. برای تعیین نسبت رشد حجم تومور، در گروه‌های مختلف حجم تومور هفته چهارم به هفته اول تقسیم شد.

استخراج بافت تومور: ۲۴ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌های توموری از تمامی گروه‌ها از طریق تزریق درون‌صفافی ترکیب کتامین (۵۰-۳۰ mg/kg) و زایلازین (۵-۳ mg/kg) بیهوش شدند. بلافاصله پس از بیهوشی، بافت‌های مورد نظر (قلب و تومور) در شرایط استریل جدا و وزن شدند. سپس، بافت مورد نظر در نیتروژن مایع منجمد شد. نمونه‌های بافتی تا زمان اندازه‌گیری در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA از بافت توموری: استخراج RNA با استفاده از محلول Qiazol و طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. نسبت جذبی ۲۸۰/۲۶۰ نانومتر برای تمام استخراج‌ها بین ۱/۸-۲ بود و اینتگریتی RNA توسط الکتروفورز با استفاده از آگارز ایتدیوم برماید (۱ درصد) سنجیده شد.

درمان این بیماری باشند. مطالعه EMT به‌دلیل پیچیدگی گستردگی دشوار است و با چالش‌هایی همراه است؛ اما دستاوردهای نسبی پژوهش‌ها و سرعت خیره‌کننده آن‌ها این نوید را می‌دهد که مطالعه جزئیات مولکولی این فرایند در الگوهای موشی سرطانی از محورهای اصلی پژوهش‌های آینده خواهد بود؛ بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر یک دوره تمرین تناوبی بر بیان mRNA مارکر مزانشیمی Vimentin در بافت تومور موش‌های مبتلا به سرطان پستان بود. همچنین، میزان تأثیر این دوره تمرینی بر حجم تومور و شاخص کارایی تمرین (نسبت وزن قلب به وزن بدن) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی و بنیادی بود که به شیوه آزمایشگاهی انجام شد. همه اصول اخلاقی پژوهش حاضر، طبق اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی مصوب انبستو پاستور ایران رعایت شد و طرح پژوهش و همه مراحل آن توسط کمیته اخلاق دانشگاه فردوسی (IR.MUM.FUM.REC.1397.038) مطالعه و تأیید شد. در این مطالعه، ۳۲ موش ماده نژاد Balb/c (۳ تا ۵ هفته با میانگین وزن 1 ± 17 گرم) خریداری شدند و به‌طور تصادفی در ۴ گروه مساوی ورزش تومور ورزش (ETE)^۵، استراحت تومور استراحت (RTR)^۶، استراحت تومور ورزش (RTE)^۷ و گروه ورزش تومور استراحت (ETR)^۸ قرار داده شدند. گروه RTR به زندگی معمولی خود در قفس ادامه دادند. گروه ETR به مدت ۶ هفته پیش از پیدایش تومور، گروه RTE به مدت ۴ هفته پس از پیدایش تومور، گروه ETE به مدت ۶ هفته پیش از پیدایش و ۴ هفته پس از پیدایش تومور، پروتکل تمرینی جدول ۱ را اجرا کردند. شایان ذکر است که پروتکل تمرینی براساس پروتکل رنجبر و همکاران (۱۴) است (جدول ۱).

کشت سلول: تومور مورد مطالعه از رده سلولی 4T-1 و از طریق تزریق زیرجلدی سلول ایجاد شد. رده سلولی توموری موش (4T-1) یکی از چند رده سلولی سرطان

^۵ Exercise-Tumor-Exercise

^۶ Rest-Tumor-Rest

^۷ Rest-Tumor-Exercise

^۸ Exercise-Tumor-Rest

^۹ Jones

جدول ۱: پروتکل تمرینی

| دوره تمرین | شرایط ورزش | سرعت (متر در دقیقه) | تکرار | زمان (دقیقه) | کل زمان (دقیقه) | تکرار (روز در هفته) |
|--------------------------|--------------------|---------------------|-------|--------------|-----------------|---------------------|
| مرحله آشناسازی | قبل از القای تومور | ۱۰ و ۱۲ | - | - | ۱۰ | ۳ |
| هفته‌های اول و دوم | قبل از القای تومور | ۱۵ و ۲۰ | ۲۰ | ۲ | ۴۰ | ۵ |
| هفته‌های سوم و چهارم | قبل از القای تومور | ۲۰ و ۲۵ | ۲۰ | ۲ | ۴۰ | ۵ |
| هفته‌های پنجم و ششم | قبل از القای تومور | ۲۵ و ۳۰ | ۲۰ | ۲ | ۴۰ | ۵ |
| تمرین بعد از القای تومور | | | | | | |
| هفته هفتم | بعد از القای تومور | ۲۵ و ۳۰ | ۱۵ | ۲ | ۳۰ | ۵ |
| هفته هشتم | بعد از القای تومور | ۲۵ و ۲۰ | ۱۵ | ۲ | ۳۰ | ۵ |
| هفته نهم | بعد از القای تومور | ۱۵ و ۲۰ | ۱۵ | ۲ | ۳۰ | ۵ |
| هفته دهم | بعد از القای تومور | ۱۰ و ۱۵ | ۱۵ | ۲ | ۳۰ | ۵ |

جدول ۲: توالی پرایمرها

| ژن‌ها | آغازگر جلویی | آغازگر برگشتی |
|----------|----------------------|------------------------|
| Vimentin | ACATCATACGGCTGCGAGAG | GACTTGCTGTTCTGAATCTGG |
| ACTB | GGCTGTATTCCCCTCCATCG | CCAGTTGGTAACAATGCCATGT |

ACTB به عنوان ژن مرجع برای فرمالایزرکردن نتایج بیان ژن استفاده شد. برای کمی‌سازی مقادیر بیان ژن موردنظر از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

روش‌های آماری: برای بررسی طبیعی بودن توزیع متغیرها از آزمون کلموگرووف-اسمیرنوف^{۱۰} استفاده شد. از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون پیگیری توکی نیز برای تحلیل داده‌ها استفاده شد. تمام عملیات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و سطح معناداری ($P < 0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر تمرین تناوبی بر بیان ژن Vimentin بافت توموری: نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه تفاوت معناداری را در بیان ژن Vimentin در دو گروه RTR و ETE نشان داد ($p < 0.05$)؛ به‌طوری‌که در گروه ETE نسبت به گروه RTR بیان Vimentin بافت تومور کاهش معناداری داشت ($F=27.0/85$, $p \leq 0.001$)؛ اما بین گروه‌های RTE ($p=0.156$) و ETR ($p=0.810$) تفاوت معناداری وجود نداشت (نمودار ۱).

اثر تمرین تناوبی بر حجم تومور: نشان داد که نسبت افزایش حجم تومور در هفته چهارم نسبت به هفته اول به‌طور معناداری در دو گروه تمرینی (RTE و ETE) در

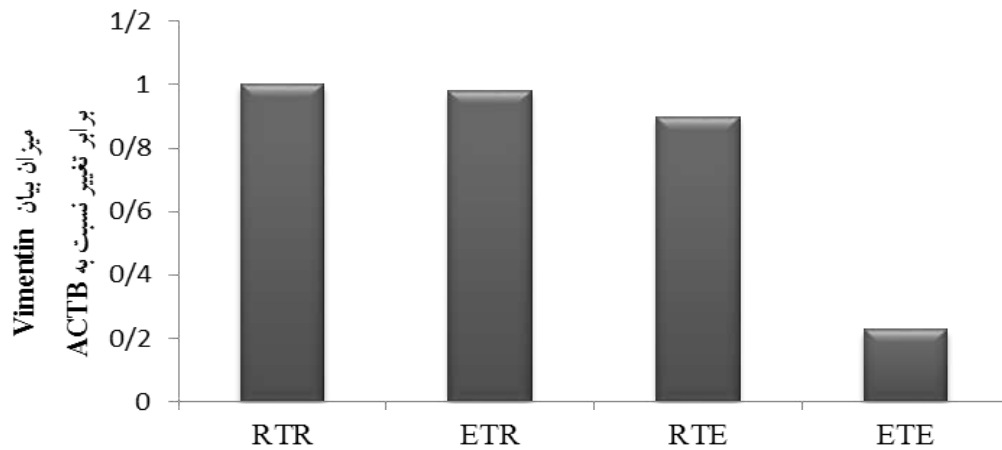
برای رونویسی RNA به cDNA از کیت PrimerScript RT Regent تهیه شده از شرکت Takara Japan استفاده شد. پروتکل استفاده‌شده، بر اساس پروتکل کیت به‌صورت ۱۵ دقیقه نسخه‌برداری معکوس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و سپس، در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ثانیه و در نهایت، ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. cDNA به‌دست‌آمده در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

مراحل انجام Real Time PCR: با استفاده از دستگاه Stepone plus (Applied Biosystems) براساس SYBER-Green از کیت، Perfect Takara، code RR041A Japan و Realtime مطابق دستورالعمل کیت انجام شد. پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش برای ژن Vimentin از شرکت کیاژن خریداری شدند (مشخصات پرایمر در جدول ۲). پروفایل دمایی PCR در مخلوطی نهایی به حجم ۲۰ میکرولیتر به‌صورت یک چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و به‌دنبال آن، ۴۰ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد. رونوشت‌های اختصاصی از دیاد یافته توسط پروفایل منحنی ذوب که در انتهای هر PCR انجام می‌گرفت، تصدیق شدند. طراحی توالی پرایمرها توسط نرم‌افزار Runner Gene صورت گرفت (جدول ۲). از ژن

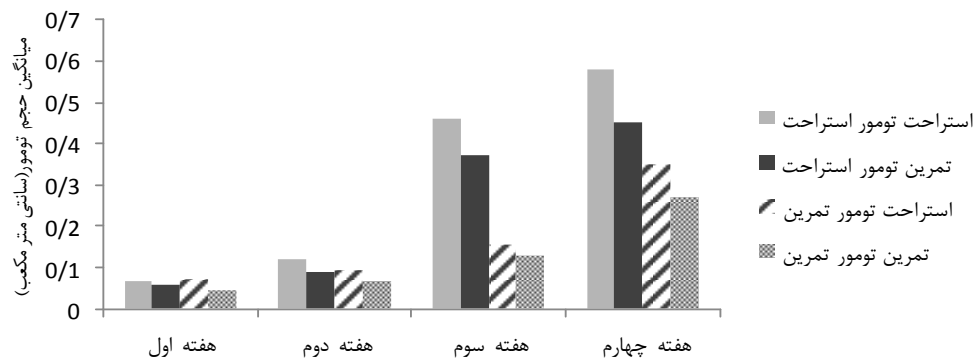
¹⁰ Kolmogorov-Smirnov Test

حجم تومور نسبت به هفته اول ۸/۹۲ برابر بود (نمودار ۲).
 اثر تمرین تناوبی بر نسبت وزن قلب به وزن بدن:
 نتایج تحلیل واریانس یک طرفه حاکی از افزایش معنادار
 این نسبت در دو گروه ETE ($p=0/037$) و RTE
 نسبت به گروه RTR ($p=0/045$) بود (نمودار ۳).

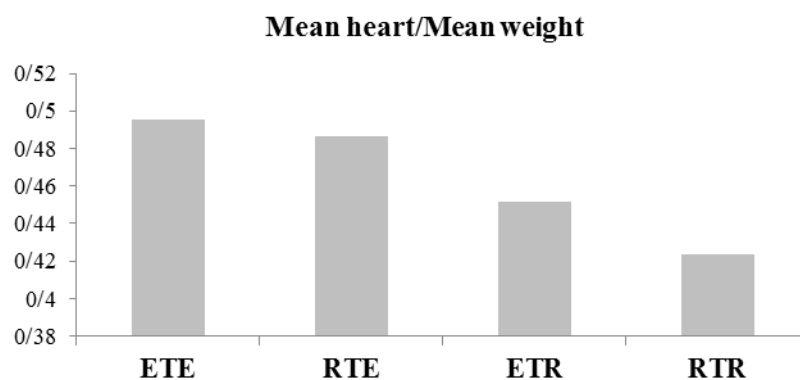
نتایج مقایسه با گروه کنترل (RTR) کمتر بود
 ($F=23/81$, $p=0/0001$)؛ به گونه ای که در گروه ETE،
 حجم تومور در هفته چهارم رشد ۴/۷۹ برابری نسبت به
 هفته اول داشت. این نسبت، در گروه RTE ۵/۹۴ برابر،
 در گروه ETR ۷/۷۵ برابر و در گروه کنترل RTR، رشد



نمودار ۱: تغییرات بیان ژن Vimentin در گروه های پژوهش (برابر تغییر نسبت به گروه کنترل)



نمودار ۲: مقایسه حجم تومور در ۴ هفته بعد از سرطانی شدن در گروه های مختلف پژوهش



نمودار ۳: مقایسه نسبت وزن قلب به وزن بدن موش ها در ۴ گروه

بحث

در پژوهش حاضر، تأثیر تمرینات تناوبی بر تغییرات حجم تومور و میزان بیان ژن Vimentin به عنوان بیومارکر مزانشیمی مؤثر در فرایند EMT و متاستاز، در موش‌های مبتلا به سرطان پستان بررسی شد. EMT فرایندی که با انوعی از مسیرهای علامت‌دهی مانند TGF- β ^{۱۱}، PDGF^{۱۲}، EGF^{۱۳}، Wnt/ β -catenin سایتوکاین‌های پیش‌التهابی IL-6، IL-8 و TNF- α تنظیم می‌شود که فعال‌سازی این عوامل پیش‌التهابی به مهار بیان ژن‌های ویژه اپی‌تلایل و فعال‌سازی و تنظیم بالای ژن‌های مزانشیمال مانند Vimentin منجر می‌شود (۱۷-۱۹). در پژوهش حاضر، بیان ژن Vimentin پس از ۱۰ هفته تمرین تناوبی در گروه ETE موش‌هایی که ۶ هفته پیش از توموری شدن و ۴ هفته پس از توموری شدن تمرین تناوبی را اجرا کردند، نسبت به گروه RTR که قبل و بعد از توموری شدن هیچ‌گونه تمرینی نداشتند، کاهش معناداری داشت ($p \leq 0.001$). هیچ پژوهشی در زمینه تأثیر تمرین تناوبی بر بیان ژن Vimentin یافت نشد؛ اما نتایج پژوهش حاضر با نتایج مطالعه ژانگ و همکاران هم‌خوانی داشت. آن‌ها اظهار کردند که تمرین شنا به مدت ۹ هفته با شدت متوسط (۸ دقیقه در روز) باعث کاهش بیان ژن Vimentin و حجم تومور در موش‌های مبتلا به سرطان کبد می‌شود (۱۱). سازوکار تأثیرگذاری تمرینات ورزشی بر تغییرات Vimentin هنوز مبهم و نامشخص است؛ ولی با مرور مطالعات می‌توان مکانیزم‌های احتمالی را برشمرد. سهم سایتوکاین‌های خاص به عنوان واسطه‌های التهابی EMT به‌طور گسترده‌ای در مطالعات بیان شده است که مهم‌ترین آن‌ها TGF- β است که با چندین سایتوکاین پیش‌التهابی در جریان پیشرفت فرایند EMT در تعامل است (۲۰). شواهد آشکاری وجود دارند که نشان می‌دهند بیان ژن TGF- β باعث افزایش بیان Vimentin می‌شود. پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند که تمرین می‌تواند باعث کاهش بیان TGF- β شود (۱۱)؛ بنابراین، فعالیت بدنی منظم می‌تواند از طریق مهار مسیر سیگنالینگ TGF- β سبب کاهش بیان ژن بیومارکر مزانشیمی Vimentin شود.

همچنین، IL-6 از طریق سیگنالینگ JAK^{۱۴} قادر به القای EMT است (۲۱). در گروهی از افراد مبتلا به سرطان پستان با گیرنده هورمون استروژن مثبت، IL-6 بیان E-cadherin را مختل کرد و باعث افزایش Vimentin شد (۲۲). مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که برخی فعالیت‌های ورزشی سبب کاهش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند TNF- α و IL-6 می‌شوند (۲۳). به نظر می‌رسد که ورزش از طریق عوامل زیادی از قبیل اثرگذاری بر مسیر JAK/STAT3 می‌تواند به کاهش IL-6 توموری و بیان STAT3 منجر شود و در نتیجه، از این مسیر سبب کاهش تکثیر سلولی، تغییر شکل سلولی، متاستاز و حجم تومور شود (۱۱، ۲۴). از طرفی، عامل تومور به عنوان یک استرس برون‌سلولی سبب افزایش بیان این پروتئین می‌شود؛ اما فعالیت ورزشی تناوبی به دلیل ماهیت متفاوت خود؛ یعنی وجود وهله‌های استراحتی بین مراحل تمرینی، برخلاف تمرین پیوسته از افزایش مداوم و مضاعف گرما و جریان خون به ناحیه توموری جلوگیری می‌کند و در این نوع فعالیت برخلاف فعالیت پیوسته استرس کمتری در ناحیه تومور ایجاد می‌شود که شاید یکی از این دلایل کاهش این پروتئین و حجم تومور باشد. افزون‌براین، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رشد حجم تومور در دو گروه تمرینی (RTE و ETE) نسبت به گروه ETR و گروه کنترل RTR، به‌طور قابل‌توجهی کمتر بود؛ به‌گونه‌ای که در گروه ETE، حجم تومور در هفته چهارم رشد ۴/۷۹ برابری نسبت به هفته اول داشت. این نسبت، در گروه RTE ۵/۹۴ برابر، در گروه ETR ۷/۷۵ برابر و در گروه کنترل RTR رشد حجم تومور نسبت به هفته اول ۸/۹۲ برابر بود؛ بنابراین، میزان رشد حجم تومور در گروهی که هرگز ورزش نکرده بودند نسبت به گروه‌های دیگر بیشتر بود. همچنین در نتایج پژوهش حاضر مشخص شد که در دو گروه ETR و ETE که قبل از سرطانی شدن ۶ هفته تمرین تناوبی اجرا کردند نسبت به گروه کنترل RTR که هیچ‌گونه تمرین تناوبی نداشتند، نسبت حجم تومور کمتر است. که این نتایج نشان می‌دهد که ورزش علاوه بر اینکه می‌تواند نقش کمک درمانی در سرطان داشته باشد، نقش پیشگیرانه نیز در سرطان دارد. هم‌راستا با پژوهش حاضر، مطالعات دیگر کاهش حجم تومور را در نتیجه ورزش کردن نشان داده‌اند (۲۶، ۲۵)؛

^{۱۴} Janus Kinase

^{۱۱} Transforming Growth Factor- β

^{۱۲} Derived Growth Factor

^{۱۳} Epidermal Growth Factor

موش‌ها محاسبه شد که نتایج افزایش معنادار این نسبت را در دو گروه تمرینی (ETE و RTE) نشان داد که هم‌راستا با نتایج مطالعات ترادا^{۱۷} و همکاران (۳۲) و مدیروس^{۱۸} و همکاران (۳۳) بود؛ بنابراین، تمرین تناوبی با شدت متوسط توانست بر ساختارهای تمرین‌پذیر مانند قلب اثر بگذارد؛ به‌طوری‌که این نوع تمرین موجب هایپرتروفی برون‌گرای قلب شده است؛ براین‌اساس، به‌نظر می‌رسد با توجه به ماهیت این نوع فعالیت‌ها در ایجاد خستگی کمتر و توانایی انجام فعالیت‌های ورزشی با شدت بالاتر در موش‌های سرطانی، در پژوهش حاضر می‌توان به مزیت این نوع تمرین در موش‌های حامل تومور پی برد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، یک دوره تمرین تناوبی (قبل و بعد از پیدایش تومور) با کاهش رشد حجم تومور و کاهش بیان ژن Vimentin، این نوع تمرین، می‌تواند علاوه بر نقش پیشگیرانه نقش کمک درمانی در سرطان پستان داشته باشد؛ اگرچه چگونگی و سازوکار این امر نیاز به پژوهش‌های زیادی دارد.

تعارض منافع

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

زیلینسکی^{۱۵} و همکاران (۲۷) کاهش و تأخیر رشد تومور در گروه تجربی نسبت به گروه کنترل را پس از ۴ هفته تمرین استقامتی به کاهش میزان سلول‌های ایمنی در تومور نسبت دادند (۲۷). همچنین، مطالعه امانی و همکاران (۲۸) نشان‌دهنده کاهش حجم تومور و رگ‌زایی در تومور در اثر تمرینات هوازی بود. براساس پژوهش مورفی^{۱۶} و همکاران (۲۹)، فعالیت هوازی با کاهش رشد حجم تومور پیشرفت تومور را در گروه تمرین نسبت به گروه کنترل نشان داد؛ با این حال، برخی از مطالعات تأثیر نداشتن تمرینات ورزشی بر تغییرات حجم تومور را نشان داده‌اند (۳۱، ۳۰). پروتکل تمرینی پژوهش حاضر روی تردمیل تعریف شده است؛ بنابراین، ممکن است تفاوت در شیوه تمرینی، طول دوره تمرینی و نوع تومور القاشده دلیلی برای نتایج غیرهمسو با نتایج پژوهش حاضر باشند. کاهش رشد حجم تومور با تمرین تناوبی در کنار کاهش بیان ژن Vimentin، به‌طور ضمنی می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر مثبت تمرینات تناوبی بر فرایند گذر از اپی‌تلایل به مزانشیمال در موش‌های مبتلا به سرطان پستان باشد. شایان ذکر است که پژوهش‌های بسیار کمی در زمینه بررسی تغییرات بیان ژن بیومارکرهای مزانشیمی و همچنین، حجم تومور در نمونه‌های توموری و مبتلا به سرطان پستان در شرایط پاتولوژیک نسبت به تمرینات ورزشی به‌ویژه تمرینات تناوبی انجام شده‌اند که این امر تفسیر نتایج در این زمینه را دشوار می‌کند. نتایج مثبت نشان می‌دهد که ممکن است فرایندهایی مانند کاهش خون‌رسانی به سلول‌های توموری در کاهش رشد تومور دخیل باشند؛ البته با توجه به اینکه عوامل مؤثر در فرایند EMT زیاد هستند و فاکتورهای دیگری نیز ممکن است در این فرایند تأثیر داشته باشند، با اطمینان کامل نمی‌توان اختلاف حجم تومور در گروه‌ها را صرفاً ناشی از متغیرهای پژوهش حاضر دانست؛ بنابراین، بهتر است فاکتورها و مکانیزم‌های درگیر دیگری در فرایند EMT نیز ارزیابی شوند تا نتایج پژوهش حاضر به‌صورت واضح‌تر تفسیر شود.

پروتکل تمرینی پژوهش حاضر به‌گونه‌ای طراحی شد که دارای شدتی متوسط (۷۰-۵۰ درصد) باشد. همچنین، اثربخشی نوع تمرین از نسبت وزن قلب به وزن بدن

¹⁷ Terada

¹⁸ Medeiros

¹⁵ Zielinski

¹⁶ Murphy

References

- Vaidya KS, Welch DR. Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007;12(2-3):175-90.
- MR ND, Fazilaty H, Tabrizi M. Cancer metastasis, genetic and microenvironmental factors of distant tissue: A review article. *Tehran University Med Sci*. 2013;70(11):1370.
- Chai J, Modak C, Mouazzen W, Narvaez R, Pham J. Epithelial or mesenchymal: Where to draw the line? *Biosci trends*. 2010;4(3):130-42.
- Kalluri R, Neilson E. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003; 112(12):1776-84.
- Kalchauer C. Epithelial- mesenchymal transitions during neural crest and somite development. *J Clin Med*. 2015;5(1):716-25.
- Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2010;120(5): 1786.
- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(18):3033-46.
- Wu Y, Zhang X, Salmon M, Lin X, Zehner ZE. TGFβ1 regulation of vimentin gene expression during differentiation of the C2C12 skeletal myogenic cell line requires Smads, AP-1 and Sp1 family members. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 2007;1773(3):427-39.
- Hwangbo C, Tae N, Lee S, Kim O, Park O, Kim J, et al. Syntenin regulates TGF-β1-induced Smad activation and the epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting caveolin-mediated TGF-β type I receptor internalization. *Oncogene*. 2016;35(3):83-9.
- LEE I-M. Physical activity and cancer prevention-data from epidemiologic studies. *MedSci Sports Exerc*. 2003;35(11):1823-27.
- Zhang L, Liu W, Gao Y, Qin Y, Wu R. 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.
- Gibala MJ, Little JP, MacDonald MJ, Hawley JA. Physiological adaptations to low-volume, high-intensity interval training in health and disease. *J physiol*. 2012;590(5): 1077-84.
- Meyer K, Samek L, Schwaibold M, Westbrook S, Hajric R, Lehmann M, et al. Physical responses to different modes of interval exercise in patients with chronic heart failure: Application to exercise training. *Eur Heart J*. 1996;17(7):1040-7.
- Ranjbar K, Agha Alinejad H, Shahbazi SH, Molanouri Shamsi SH. Interval aerobic exercise and selenium nanoparticle stimulate autophagy in mice with cancer cachexia. *Int J Cancer Oncol*. 2018;5(1):35-40.
- Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells invitro and invivo systems. *Clin Cancer Res*. 2005;11(5):1918-27.
- Jones L, Viglianti B, Tashjian J, Kothadia S, Keir S, Freedland S, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol*. 2009;108(2):343-8.
- Thiery J, Sleeman J. Complex networks orchestrate epithelial mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):131-42.
- Palena C, Hamilton D, Fernando R. Influence of IL-8 on the epithelial mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol*. 2012; 8(6):713-22.
- Yuji T, Hiromi Y, Susumu S, Koji T, Yasuhiro I, Ajay G, Masato K. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2013;34(11):2548-57.
- Massague J. TGFβ in Cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
- Hunter C, Jones S. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*. 2015;16(5): 448-57.
- Sullivan N, Sasser A, Axel A, Vesuna F, Raman V, Ramirez N, et al. Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells. *Oncogene*. 2009; 28(33):2940-7.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Totsuka M, Sato K, Sugawara K. Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. *Cytokine kinetics. Exerc Immunol Rev*. 2002;8(1):46-8.
- 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.
- Friedenreich C, Orenstein M. Physical activity and cancer prevention: Etiologic

- evidence and biological mechanisms. *J Nutr.* 2002;132(11):3456-64.
26. Liu X, Chu K .E-cadherin and gastric cancer: Cause, consequence, and applications. *BioMed Res Int.* 2014;12(1):9.
27. Zielinski MR, Muenchow M, Wallig MA, Horn PL, Woods JA. Exercise delays allogeneic tumor growth and reduces intratumoral inflammation and vascularization. *J Appl Physiol.* 2004;96(6):2249-56.
28. Amani-shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib Z K, Kazemi A, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iran J Basic Med Sci.* 2014;17(4):231-6.
29. Murphy EA, Davis JM, Barrilleaux T, McClellan J, Steiner J, Carmichael M, et al. Benefits of exercise training on breast cancer progression and inflammation in C3 (1) SV40Tag mice. *Cytokine.* 2011;55(2):274-9.
30. Betof AS, Dewhirst MW, Jones LW. Effects and potential mechanisms of exercise training on cancer progression: A translational perspective. *Brain, behavior, and immunity.* 2013;30(15):75-8.
31. Woods JA, Vieira VJ, Keylock KT. Exercise, inflammation, and innate immunity Immunology and allergy. *Phys Med Rehabil Clin.* 2009; 29(2):381-93.
32. Terada S, Tabata I, Higuchi M. Effect of high intensity intermittent swimming training of fatty acid oxidation enzyme activity in rat skeletal muscle. *Japanese J of Physiol.* 2004;54(1): 47-52.
33. Medeiros A, Oliveira Em, Gianolla R, Casarini D, Negrao C, Brum P. Swimming training increase cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Brazilian. J of Med Biol Research.* 2004;37(12):1909-17.