

*The Effect of Long-Term Endurance Activity on *purβ* Gene Expression in Rat Fast and Slow Twitch Skeletal Muscles*

Mohammad Fathi*

Department of Physical
Education & Sport Sciences,
Faculty of Humanities,
Lorestan University,
Khorramabad, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Increased expression of type I fibers due to endurance activity, is inhibited by "purine-rich element binding protein A" transcription factor. The purpose of the present study was to investigate the effect of one period of endurance activity on the gene expression of this factor in fast and slow twitch skeletal muscles.

Methods: In this experimental study, 20 male Wistar rats (age, 5 weeks and weight, 113±20g), were randomly divided into two groups of experimental and control. A 14-week endurance activity program on motorized treadmill, was designed for the experimental group on the treadmill, then 48 hours after the end of the last training session, the rats were anesthetized and dissected. Then, the soleus and extensor digitorum Longus muscles, were removed. The expression level of "purine-rich element binding protein A" in these muscles, were measured using real time PCR method. Data were analyzed using t-test.

Results: In this study, endurance activity significantly decreased ($p \leq 0.01$) the expression level of "purine-rich element binding protein A" gene in fast twitch muscle (extensor digitorum longus) and significantly increased the expression of this gene in slow twitch muscle (soleus muscle).

Conclusion: The result of this research revealed that despite the same endurance activity, *purβ* gene expression in fast and slow twitch muscles, is different. This is probably due to the upstream signaling cascade of this gene, which controls its expression level.

Keywords: Rat Purβ protein; Physical endurance; Musculoskeletal.

***Corresponding Author:**

Mohammad Fathi,
Department of Physical
Education & Sport Sciences,
Faculty of Humanities,
Lorestan University,
Khorramabad, Iran.

Email: fathi.m@lu.ac.ir

Received: 29 May, 2016

Accepted: 2 Jan, 2017

تأثیر فعالیت استقامتی بلندمدت بر بیان ژن *purβ* عضلات اسکلتی تند و کند انقباض رت

محمد فتحی*

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بیان تارهای نوع I در اثر انجام فعالیت استقامتی، توسط فاکتور رونویسی "پروتئین A متصل به عناصر غنی از پورین" مهار می‌شود. در پژوهش حاضر تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان ژن این فاکتور در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۲۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار (با ۵ هفته سن و وزن 20 ± 113 گرم) به طور تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند. برای گروه تجربی یک برنامه استقامتی (۱۴ هفته‌ای) روی تردمیل طراحی شد، سپس ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها بیهوش و تشریح شدند. در ادامه، عضلات نعلی و بازکننده بلند انگشتان خارج گردید. با استفاده از روش Real time-PCR، میزان بیان ژن "پروتئین A متصل به عناصر غنی از پورین" این عضلات اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آزمون تی تحلیل شدند.

یافته‌ها: در این تحقیق، فعالیت استقامتی موجب کاهش معنی‌دار ($p \leq 0/01$) بیان ژن "پروتئین A متصل به عناصر غنی از پورین" در عضله تند انقباض (بازکننده بلند انگشتان) و افزایش معنی‌دار ($p \leq 0/01$) در عضله کند انقباض (نعلی) شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد باوجود یکسانی فعالیت‌های استقامتی، بیان ژن *purβ* در تارهای تند و کند انقباض متفاوت است. احتمالاً این موضوع به دلیل آبخار سیگنالینگ بالادست این ژن بوده که میزان بیان آن را کنترل می‌کند.

کلید واژه‌ها: پروتئین پور بتا موش؛ استقامت بدنی؛ اسکلتی عضلانی.

گروه تربیت‌بدنی و علوم ورزشی،
دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان،
خرم‌آباد، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

محمد فتحی، گروه تربیت‌بدنی و علوم
ورزشی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه
لرستان، خرم‌آباد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

fathi.m@lu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۸

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۲

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Fathi M. The effect of long-term endurance activity on *purβ* gene expression in rat fast and slow twitch skeletal muscles.

Qom Univ Med Sci J 2018;12(4):23-30. [Full Text in Persian]

مقدمه

عضلات اسکلتی از بافت‌های مهم بدن محسوب شده که علاوه بر حرکت، در ساز و کارهای دیگر نیز درگیرند (۱)، و براساس تفاوت در میزان و نوع پروتئین‌هایی که در تعیین خصوصیات عملکردی آنها نقش دارند، طبقه‌بندی می‌شوند. از جمله پروتئین‌هایی که در تعیین عضلات نقش دارند می‌توان به پروتئین زنجیره سنگین (MHC) اشاره کرد که براساس ویژگی این پروتئین، تارهای عضلانی به تارهای اکسیداتیو یا نوع I (دارای سرعت انقباض کند)، تارهای گلیکولیتیک یا نوع IIa (دارای سرعت انقباض سریع) و گلیکولیتیک بی‌هوازی یا نوع IIb (دارای بیشترین سرعت انقباض) تقسیم‌بندی می‌شوند (۲). با توجه به ویژگی عضلات، محرک‌های بیرونی و درونی متعددی می‌توانند موجب ایجاد سازگاری در عضلات و در نتیجه تغییر نوع تارها شوند (۳). از عوامل تأثیرگذار بر عضلات و نوع تارهای آن می‌توان به فعالیت بدنی، به‌خصوص فعالیت‌های نوع استقامتی اشاره کرد که با ایجاد چالش‌های متابولیکی و جریان‌های کلسیمی موجب سازگاری‌های منحصر به فرد در عضلات می‌شوند (۴،۵). مطالعات نشان داده‌اند عضلاتی که در درازمدت در معرض فعالیت‌های استقامتی قرار می‌گیرند به سمت تارهای کند انقباض تمایل داشته و این تغییر در کارکرد، مقاومت در مقابل خستگی، افزایش میوگلوبین، افزایش آنزیم‌های هوازی و حتی پتانسیل عمل آنها نیز دیده می‌شود، همچنین در سطح ساختاری بافت عضله، این تغییرات در افزایش میزان تارهای نوع I نمود پیدا می‌کند (۸-۶). تأثیر فعالیت‌های بدنی بر تغییرات ساختاری و عملکردی عضلات، از جمله تغییر میوزین زنجیره سنگین تارها از طریق مسیرهای سیگنالینگ متعددی صورت می‌گیرد که در این مسیرها فاکتورهای رونویسی متعددی درگیرند (۹)، یکی از این فاکتورها، فاکتور رونویسی پروتئین A متصل به عناصر غنی از پورین بتا (*Purβ*) می‌باشد (۱۰). مشخص شده است این فاکتور موجب سرکوب بیان MHC نوع I می‌شود و از این طریق شرایطی را مانند بی‌تحرکی عضله ایجاد می‌کند (۱۰،۱۱).

معدود مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد فاکتور *Purβ* (Purine-rich element-binding protein B)، واسطه سرکوب بیان ژن MHC نوع I بوده که موجب کاهش بیان آن

می‌شود و این عمل را با تعامل بین سایر فاکتورهای رونویسی (*Purα*، *Sp3*)، عوامل مهم برای تغییر در بیان نوع تارها در پاسخ به بی‌وزنی) انجام می‌دهد (۱۰). مشخص شده است در تجدید ساختار سلولی، فعالیت اتصال به DNA پروتئین‌های *Purβ* و میزان پروتئین آنها در پاسخ به شرایط بی‌وزنی افزایش می‌یابد، اما در پاسخ به اضافه بار مکانیکی کاهش پیدا می‌کند (۱۰). سطوح *Purβ* در زمان نارسایی قلبی افزایش یافته و در تنظیم رونویسی αMHC مشارکت می‌کنند (۱۰). با بررسی مطالعات انجام شده مشخص گردید هنوز هیچ پژوهشی در مورد تغییرات ژنی و یا پروتئینی این فاکتور رونویسی به فعالیت‌های استقامتی صورت نگرفته است. با توجه به نقش فعالیت‌های استقامتی بر MHC نوع I، همچنین تأثیر *Purβ* بر این ایزوفرم، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر فعالیت استقامتی بلندمدت بر بیان ژن *Purβ* عضلات اسکلتی تند و کند انقباض انجام شد.

روش بررسی

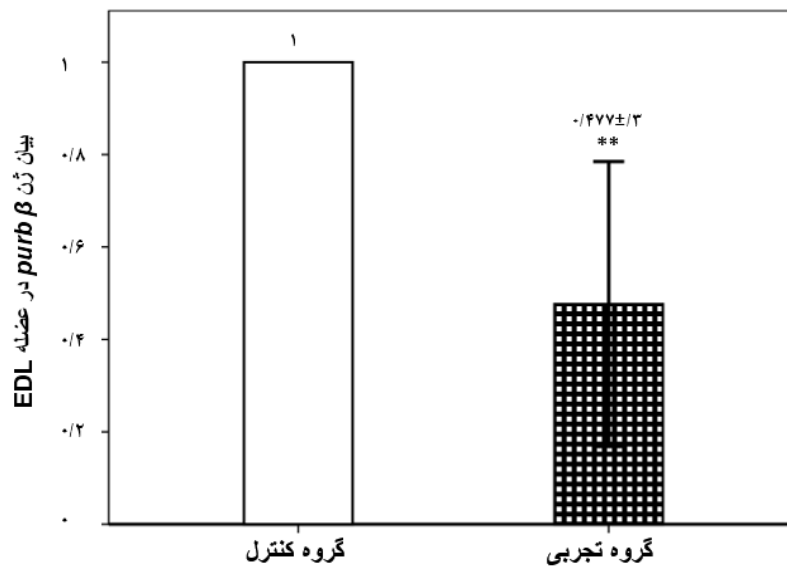
در این مطالعه تجربی، از ۲۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار (با ۵ هفته سن و وزن 113 ± 20 گرم) تهیه شده از انستیتو پاستور استفاده شد. رت‌ها تا رسیدن به سن بلوغ در شرایط استاندارد (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص رت، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دمای 22 ± 3 درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. در ادامه، بعد از رسیدن میانگین وزن رت‌ها به 231 ± 24 گرم، یک دوره آشناسازی (۱۰ روزه در ۵ جلسه) با تمرینات استقامتی (دویدن روی تردمیل) برای آنها در نظر گرفته شد. در پایان جلسات آشناسازی، حیوانات به‌طور تصادفی به ۲ گروه شاهد و تمرینی (هر کدام ۱۰ سر) تقسیم شدند. از رت‌های گروه تمرینی، ۳ سر نتوانست پروتکل را به پایان برساند؛ بنابراین همراه با سه سر از رت‌های گروه کنترل (به‌طور تصادفی) از روند پژوهش حذف شدند.

یک برنامه فعالیت استقامتی ویژه رت با استفاده از مطالعات قبلی برای گروه تجربی طراحی شد (۱۲، ۱۳) که این پروتکل (شامل ۱۴ هفته، هفته‌ای ۶ روز) به‌صورت دویدن روی تردمیل با سرعت، شیب و زمان قابل برنامه‌ریزی شده بود.

یافته‌ها

در این مطالعه، در اثر ۱۴ هفته تمرین استقامتی، میزان بیان ژن *purβ* در عضله تند انقباض (EDL)، به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p=0/006$) (نمودار شماره ۱)، اما میزان بیان این ژن در عضله کند انقباض (نعلی)، به طور معنی‌داری ($p=0/0001$) افزایش نشان داد (نمودار شماره ۲).

داده‌های به دست آمده از دستگاه Real Time PCR که به صورت CT (Cycle threshold) (میانگین CT برای هر نمونه) بودند (۱۹-۱۷)، با استفاده از نرم‌افزار Excel به $\Delta\Delta ct$ تبدیل شدند، سپس با استفاده از فرمول: $2^{-\Delta\Delta ct}$ اعداد نهایی به دست آمد (۲۰). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰، آزمون شاپیرو - ویلک (جهت نرمال بودن توزیع داده‌ها) و آزمون تی (برای تعیین اختلاف میانگین‌ها) تحلیل شدند.



نمودار شماره ۱: میانگین تغییرات بیان ژن *purβ* عضله EDL گروه کنترل و تجربی در اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی. **=معنی‌داری در سطح $p \leq 0/01$.



نمودار شماره ۲: میانگین تغییرات بیان ژن *purβ* عضله نعلی گروه کنترل و تجربی در اثر ۱۴ هفته فعالیت استقامتی. **=معنی‌داری در سطح $p \leq 0/01$.

بحث

در تغییر بیان نوع تارها در پاسخ به بی‌وزنی، نقش تعیین‌کننده‌ای دارند. فعالیت اتصال به DNA پروتئین *Purβ* و میزان پروتئین آنها در پاسخ به شرایط بی‌وزنی در تجدید ساختار سلولی افزایش می‌یابد، اما در پاسخ به بارکاری کاهش دارد (۱۰). Ji و همکاران در مطالعه خود عنوان کردند احتمالاً کاهش بیان ژن *Purβ* در عضله EDL ناشی از پاسخ این فاکتور به افزایش بارکاری عضله بوده است (۱۰). McCarthy نیز گزارش کرد در طی آتروفی عضلات نعلی، بیان miR-499 و miR-208b به ترتیب ۴۰ و ۶۰٪ کاهش می‌یابد که این کاهش با افزایش ۲۳٪ ژن *Purβ* همراه است (۲۸). در مطالعه حاضر، آتروفی موجب افزایش بیان *Purβ* در عضله نعلی شد و انتظار می‌رفت فعالیت استقامتی تأثیر معکوسی بر بیان این ژن در عضله نعلی داشته باشد که برخلاف انتظار، این یافته با نتایج McCarthy (با ایجاد آتروفی) همخوانی داشت. در این پژوهش میزان بیان پروتئین *Purb* که در حقیقت واحد عملکردی بیان ژن و میزان آن تعیین‌کننده تأثیر نهایی فعالیت استقامتی بر بافت بود، ارزیابی نشد؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد پژوهشی در زمینه ارزیابی میزان بیان پروتئین این ژن در طی یک دوره فعالیت استقامتی انجام گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد باوجود همسانی، میزان و شدت فعالیت استقامتی بیان ژن *purβ* در تارهای تند و کند انقباض متفاوت بوده که احتمالاً در مسیر سیگنالینگ بالادست این ژن که بیان آن را کنترل می‌کند، پاسخ به فعالیت استقامتی متفاوت بوده است.

نتایج این تحقیق نشان داد میزان بیان ژن *purβ* در اثر فعالیت استقامتی در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض تحت تأثیر قرار می‌گیرد؛ بدین صورت که برخلاف عضله EDL که در آن میزان بیان این ژن در اثر یک دوره فعالیت استقامتی به کمتر از نصف کاهش می‌یابد، میزان بیان این ژن در عضله نعلی در اثر فعالیت استقامتی تا حدود ۱۵ برابر افزایش پیدا می‌کند. باید اشاره کرد هنوز پژوهشی در زمینه بررسی تأثیر فعالیت بدنی بر بیان ژن *purβ* انجام نشده است؛ بنابراین نتیجه این پژوهش با توجه به مطالعاتی بررسی گردید که عمدتاً به شناسایی و ارزیابی سایر جنبه‌های این ژن پرداخته بودند.

فعالیت بدنی موجب تغییر در بیان ایزوفرم‌های MHC در عضلات اسکلتی تند و کند انقباض می‌شود که این تغییر با تغییرات فعالیت ATPase ایزوفرم پروتئین MHC همراه است (۲۱). از طرف دیگر، مشخص شده است miRs بر فرآیندهای سلولی تأثیر زیادی دارد (۲۲). اخیراً نیز مطالعات نشان داده‌اند بسیاری از تغییرات ایجادشده در تارهای عضلات اسکلتی به این عناصر ارتباط دارد (۲۳)، این عناصر از طریق سرکوب بیان ژن به صورت آبخاری موجب تغییر در افزایش یا کاهش ژن‌های هدف خود می‌شوند (۲۴-۲۶). یکی از اهداف miRsها ژن *purβ* است؛ بدین معنی که این ژن توسط miR-499 سرکوب می‌شود (۲۷)، و در ناحیه غیرترجمه‌ای 3' mRNA ژن *purβ* دارای یک جایگاه اتصال برای miR-499 بوده که بیان این ژن، به وسیله miR-499 مهار می‌گردد (۲۷). احتمالاً دلیل افزایش بیان این ژن در عضله نعلی ناشی از کاهش بیان miR-499 در این عضله است. علاوه بر نقش miRsها، پژوهش‌ها نشان داده‌اند تعامل بین *Purβ*، *Pura* و *Sp3*

References:

1. Stannard SR, Buckley AJ, Edge JA, Thompson MW. Adaptations to skeletal muscle with endurance exercise training in the acutely fed versus overnight-fasted state. *Sports Nutr Rev J* 2010;13(4):465-9. PubMed
2. Scott W, Stevens J, Binder-Macleod SA. Human skeletal muscle fiber type classifications. *Phys Therap* 2001;81(11):1810-6. Link
3. Harridge SD. Plasticity of human skeletal muscle: Gene expression to in vivo function. *Exp Physiol* 2007;92(5):783-97. PubMed

4. Adhietty PJ, Irrcher I, Joseph AM, Ljubicic V, Hood DA. Plasticity of skeletal muscle mitochondria in response to contractile activity. *Exp Physiol* 2003;88(1):99-107. PubMed
5. Holzer N, Ziltener JL, Menetrey J. Plasticity of striated skeletal muscle: Training effect and perspectives. *Rev Med Suisse* 2006;2(74):1798-804. Link
6. Schantz PG. Plasticity of human skeletal muscle with special reference to effects of physical training on enzyme levels of the NADH shuttles and phenotypic expression of slow and fast myofibrillar proteins. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;558:1-62. PubMed
7. Hoppeler H, Fluck M. Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 2003;35(1):95-104. PubMed
8. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: Cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *Am J Phys Med Rehabil* 2002;81(11 Suppl):S40-51. PubMed
9. Fathi M, Rahmani Nia F, Moradpoorian MR, Asgari M, Rezaee R. The relationship between maximum aerobic power and coronary heart disease risk factors. *World J Sport Sci* 2009;2(1):1-6. Link
10. Ji J, Tsika GL, Rindt H, Schreiber KL, McCarthy JJ, Kelm RJ, et al. Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. *Mol Cell Biol* 2007;27(4):1531-43. PubMed
11. Kelm Jr RJ, Wang SX, Polikandriotis JA, Strauch AR. Structure/function analysis of mouse *purβ*, a single-stranded DNA-binding repressor of vascular smooth muscle α -actin gene transcription. *J Biol Chem* 2003;278(40):38749-57. PubMed
12. Jin H, Yang R, Li W, Lu H, Ryan AM, Ogasawara AK, et al. Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279(6):2994-3002. PubMed
13. Sun L, Shen W, Liu Z, Guan S, Liu J, Ding S. Endurance exercise causes mitochondrial and oxidative stress in rat liver: effects of a combination of mitochondrial targeting nutrients *Life Sci* 2010;86(1-2):39-44. PubMed
14. Fathi M, Abroun S. The effect of endurance activity on left ventricle *Purβ* Gene expression in wistar male rat. *J Ilam Univ Med Sci* 2016;23(6):74-84. Link
15. Tang H, Macpherson P, Marvin M, Meadows E, Klein WH, Yang XJ, et al. A histone deacetylase 4/myogenin positive feedback loop coordinates denervation-dependent gene induction and suppression. *Mol Biol Cell* 2009;20(4):1120-31. PubMed
16. Silver N, Cotroneo E, Proctor G, Osailan S, Paterson KL, Carpenter GH. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in the adult rat submandibular gland under normal, inflamed, atrophic and regenerative states. *BMC Mol Biol* 2008;9:64. Link
17. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:85. Link
18. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39(1):75-85. PubMed
19. Gunning P, O'neill G, Hardeman E. Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space. *Physiol Rev* 2008;88(1):1-35. PubMed
20. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29(9):45. PubMed
21. Baldwin KM, Haddad F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. *J Appl Physiol* 2001;90(1):345-57. PubMed

22. Fathi M, Gharakhanloo R, Solimani M, Rajabi H, Rezai R. The study of timing series response of microRNA-1 expression to resistance exercise in slow and fast muscles of Wistar male rats. *J Sport Biomotor Sci* 2013;9(1):5-15. [Full Text in Persian] Link
23. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends Genet* 2008;24(4):159-66. PubMed
24. Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. *DNA Cell Biol* 2007;26(4):219-25. PubMed
25. Zacharewicz E, Lamon S, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front Physiol* 2013;4:266. PubMed
26. Guller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: Their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol* 2010;588(Pt 21):4075-87. PubMed
27. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;316(5824):575-9. PubMed
28. McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics* 2009;39(3):219-26. PubMed