Sport and Biomotor Sciences
ورزش و علوم زیست حرکتی

تاثیر هفت هفته تمرین استقامتی بر بیان ژن ناقلهای لاکتات عضلات اسکلتی موشهای صحرایی

روح الله نیکویی[۱]، حمید رجبی*[۲]، رضا قراخانلو[۳]، کبری امیدفر[۴]

۱- استادیار دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲- دانشیار دانشگاه خوارزمی

۳- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس تهران

٤- دانشیار علوم پزشکی دانشگاه تهران، پژوهشکده غدد درون ریز و متابولیسم

* نشانی نویسنده مسئول: تهران، اتوبان شهید حقانی، جنب ورزشگاه شهید کشوری، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی

Email: hrajabi@hotmail.com

وصول: ۹۲/۸/۶ اصلاح: ۹۲/۹/۱۱ پذیرش: ۹۲/۱۲/۷

چکیده

هدف و مقدمه: با وجود مشخص بودن تاثیر تمرین بر بیان مونوکربوکسیلات ترانسپورترها (MCTs)، عوامل تنظیمی این تغییرات هنوز به طور کامل شناخته نشده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر ۷ هفته تمرین استقامتی بر میزان بیان MCT1 و MCT4 در عضلات نعلی و باز کننده طویل انگشتان (EDL) و تعیین ارتباط بین بیان بسجین (CD147) و بیان این انتقال دهنده ها بود.

روش شناسی: تعداد ۲۰ موش صحرایی نر نژاد ویستار با دامنه وزنی ۲۰۸/٤ – ۱۷۳/۱ گرم انتخاب و به طور تصادفی به ۲ گروه همسان و مساوی کنترل و تمرینی تقسیم شدند. تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، بر گروه تمرینی اعمال گردید. ٤۸ ساعت پس از اتمام برنامه تمرینی حیوانات تشریح و عضله نعلی وEDL استخراج شدند. سنجش بیان ژن با تکنیک Real time – PCR انجام و بیان نسبی هرژن با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه گردید. تفاوتهای بین گروهی با آزمون t مستقل و معنی دار بودن روابط بین متغیرها با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون **سنجیده شد.**

یافته ها: افزایش معنی دار ٤۷ درصدی در بیان MCT1 عضله EDL ($p < ۰/۰۵$) و ۱۹ درصدی در بیان MCT4 عضله EDL ($p < ۰/۰۵$) در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. در مقایسه با گروه کنترل، بیان CD147 در گروه تمرینی در عضله نعلی بدون تغییر و در EDL، ۲۱ درصد افزایش معنی دار داشت ($p < ۰/۰۵$). بین بیان CD147 و MCT1 فقط در عضله نعلی ارتباط معنی دار یافت شد ($p <۰/۰۱$)

بحث و نتیجه‌گیری: بطور خلاصه نتایج تحقیق نشان داد بخشی از افزایش بیان MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی متعاقب تمرین استقامتی از طریق افزایش در ساز وکار های پیش ترجمه ای و به روش مختص به ایزوفرم اتفاق می افتد. بیان CD147 در عضلات اسکلتی با بیان MCT1 در رابطه است.

واژه های کلیدی: مونوکربوکسیلات ترانسپورترها، تمرین استقامتی، موشهای صحرایی

مقدمه

اسید لاکتیک – محصول نهایی گلیکولیز بی هوازی – عمدتاً بوسیله عضلات اسکلتی تولید و به دلیل ضریب تجزیه پایین (PKa = 3.86) در pH فیزیولوژیایی، تقریبا به طور کامل به لاکتات و یون هیدروژن تجزیه می شود (۱). لاکتات می‌تواند در عضلات اکسایشی و عضله قلبی اکسایش شود، در تارهای تند انقباض به گلیکوژن تبدیل ویا در کبد و کلیه طی فرایند گلوکونئوژنز به گلوکز تبدیل و به جریان خون باز

گردانده شود. به همین دلیل ، این سوبسترا بـه طـور مـداوم در سلولهای مختلف و بین بافتهای متفاوت در حـال تبـادل اسـت (۲). این انتقال بین بافت های مختلف وابسته به pH و به شیوه هـم انتقـالی بـا یـون هیـدروژن از طریـق مونوکربوکسـیلات ترانسپورتر ها (MCTs) صـورت مـی گیـرد (٤، ۳)کـه دارای ایزوفرم های مختلف هسـتند. تـاکنون ١٤ ایزوفـرم مختلـف از MCT ها در موش و ۹ ایزوفرم در انسان شناسایی شده اند کـه توزیعی وابسته به بافت دارند (۵). در این مجموعـه MCT1 و MCT4 دو ایزوفرمی هستند کـه در تنظـیم جریـان لاکتـات از عـرض غشـای سـلولی مهمتـرین نقـش را دارا هسـتند و در عضلات اسکلتی انسان و حیوان بـا ویژگـی جنـبش پـذیری و مکانهای متفاوت بیان می شوند (٦). مطالعات نشان داده اند کـه فعالیت بـدنی (۷) و تحریـک الکتریکـی(۸) و هایپوکسـی (۹) تاثیر قابل توجهی بر افزایش بیان MCT ها در عضـله اسـکلتی دارد که به روش مختص به ایزوفرم عمـل مـی کننـد. MCT1 عمدتا در اثر تمرینات استقامتی بیان می شود و با ظرفیت هـای اکسایشی عضله در ارتباط است (۲) در حالیکه MCT4 بیشتر متعاقب تمرینات شدید بیان می شـود (۲) و بـا شـاخص هـای گلیکولیتیک تعامل بیشتری دارد. در تائید نقش فعالیت عضلانی بر بیان این انتقال دهنده ها در تحقیقاتی که میزان فعالیت عضله اسکلتی بواسطه عصب زدایی (۱۰) یا تعلیق عضو (۱۱) کـاهش یافته، میزان بیان این انتقال دهنده ها در عضله اسـکلتی کـاهش قابل ملاحظه داشته است.

در بررسی سازوکارهایی که در بیـان ترانسـپورتر هـای لاکتات موثر هستند نقش CD147 که یک گلیکـو پـروتئین از خانواده Ig می باشد، برجسته تر است .در تاییـد ایـن موضـوع مطالعات کشت سلولی نشان داده اند که CD147 در بیان نرمال MCT1 و MCT4 بر سطح غشای سلولی نقش مهمـی را ایفـا می کند (۱۲). هم چنین در مطالعات پیشـین نقـشCD147 در تحویل MCT1 و MCT4 به سـطح غشـای پلاسـمایی تاییـد (۲۱) شده است و از طرف دیگر در موشهای صـحرایی کـه ژن CD147 در آنهـا خـاموش گردیـده اسـت، بـا وجـود حضـور MCT1 mRNA و MCT4 ، بیان این انتقـال دهنـدها دچـار نقصان گردیده است (۱۲).

همانگونه که اشاره گردید یکی از محرک هایی کـه بـر ناقل های لاکتات تاثیر می گذارند،تمرین استقامتی است (۲). به هر حال بررسـی تـاثیرات بلنـد مـدت تمرینـات اسـتقامتی بـر MCT1 و MCT4 در عضله اسکلتی بیشتر مربوط به محتـوی پروتئینی این انتقال دهنده هاست که جمیـع ایـن تحقیقـات بـر افزایش محتوی پروتئنی این انتقال دهنـده هـا پیامـد تمرینـات استقامتی اتفاق نظر دارند (١٤، ١٣، ٨، ٧).

از طرف دیگر میزان بیان یک پروتئین خاص ماحصـل سازوکارهای نسخه برداری و ترجمه ای اسـت لـیکن علیـرغم محتوی غنی ادبیات در زمینه تاثیر تمرین بر محتـوی پروتئینـی این انتقال دهنده ها، در زمینه تاثیر بلند مدت تمرین بر محتـوی MCT1 و mRNA MCT4 نقصـان وجـود دارد. مطالعـات محدود در این زمینه به مطالعه بونن و همکاران (۱۳) که در آن تاثیر تمرین بر محتوی mRNA این انتقال دهنده ها بـه انجـام رسیده است که آن هم پاسخ به تمرین حاد را مورد بررسی قرار داده است و مطالعه توماس و همکاران (۱۵) که در این تحقیـق نیز پاسخ CD147 یـه تمـرین بررسـی نشـده اسـت، محـدود می‌شود. با وجود این که تغییرات در سطح نسـخه بـرداری نیـز می‌تواند بر میزان بیان پروتئین اثر گذار باشد، تاکنون مطالعه ای تاثیر بلند تمرین بر محتوی mRNA این انتقـال دهنـده هـا را مورد بررسی قرار نـداده اسـت. . بـه عـلاوه بیشـتر مطالعـات مربوط به CD147 به عنوان یکی از عوامـل مـوثر بربیـان ایـن انتقال دهنده ها در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفته و تاکنون مطالعه ای نقش CD147 بر بیان MCT1 و MCT4 در محـیط طبیعی بدن و در پاسخ به تمرین را مـورد بررسـی قـرار نـداده است و اثر تمرین بر بیان CD147 هنوز ناشناخته است. لذا بـا توجه به موارد فوق، و تایید نقش CD147 به عنوان عاملی مهم در بیان MCT1 و MCT4 در شرایط نرمال، این احتمال وجود دارد که افزایش بیان این انتقـال دهنـده هـا در اثـر تمـرین نیـز وابسته به عملکـرد CD147 باشـد تحقیـق حاضـر بـه منظـور مشخص نمودن تاثیر ۷ هفته تمرین اسـتقامتی بـر بیـان عوامـل فوق و پاسخگویی به سوالات زیر به اجرا در آمد:

اثر تمـرین اسـتقامتی بـر محتـوی MCT1 و MCT4 mRNA در عضلات نعلـی و EDL بـه چـه صـورت اسـت؟ تغییرات ناشی از تمرین در بیـان CD147 چگونـه اسـت و در صورت تاثیر پذیری از تمرین آیا بین بیـان MCT1 و MCT4 با CD147 ارتباط معنی داری وجود دارد یا نه؟

روش شناسی

حیوان: تعداد ۲۰ موش صحرایی نژاد ویستار نر در سن ٤ هفتگی با میانگین وزنی ۸.۸ ± ۹۵.۸ گرم از انستیتوی پاستور ایران تهیه و در شرایط دمایی ٤ ± ۲۲ درجه سانتیگراد تحت چرخه ۱۲:۱۲ساعت تاریکی – روشنایی نگهداری و با غذای مخصوص موش و آب تغذیه شدند. بعد از گذشت ٤ هفته و رسیدن به وزن مطلوب، موشها با میانگین وزن ۱۸/۷ ± ۱۹۱/۵ گرم به طور تصادفی به ۲ گروه مساوی و همسان کنترل و تمرینی تقسیم شدند. بعد از آن موشهای گروه تمرین تحت پروتکل تمرینی قرار گرفتند در حالیکه گروه کنترل فقط در قفس نگه داری و درگیر تمرین نمی شد.

برنامه تمرینی: تمرین استقامتی به مدت ۷ هفته، هر روز بر گروه تمرینی اعمال شد (جدول ۱). مدت ۲۰ دقیقه برای شروع تمرین در هفته اول و ۳۵ دقیقه به عنوان مدت نهایی در اواخر برنامه تمرینی درنظر گرفته شد. ضمن اینکه شدت نهایی نیز به گونه ای انتخاب گردید که سطوح لاکتات را در حین تمرین دستخوش تغییر قابل ملاحظه نماید (بین ۵ – ٤ میلی مول در لیتر، اندازه گیری لاکتات با استفاده از نمونه خونی اخذ شده از دم حیوان و با دستگاه لاکتومتر اندازه گیری شد). تمامی این اطلاعات با انجام مطالعه مقدماتی روی ٤ موشها بدست آمد. دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاریهای انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند. سرعت نهایی حدودا معادل با ۸۰ – ۷۵ درصد VO_{2max} بود (۱۳).

جدول ۱. مشخصات برنامه تمرینی

زمان	آشنا سازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته۳	هفته٤	هفته۵	هفته ۶	هفته۷
سرعت (m/min)	۱۵	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۰
مدت (min)	۲۰	۲۰	۲۵	۲۵	۳۰	۳۰	۳۵	۳۵

استخراج نمونه: ٢٤ ساعت بعد از آخرین جلسه تمرینی موشها بوسیله تزریق درون صفاقی کتامین [90mg/kg] و زایلازین [10 mg/kg] بی هوش و عضلات نعلی و EDL بلافاصله استخراج و در نیتروژن ۸۰- منجمد و برای تجزیه و تحلیل بعدی نگهداری شد. خصوصیات اکسایشی و گلیکولیتیک منحصر به فرد و هم چنین درگیری زیاد این دو عضله در حین دویدن، دلیل انتخاب عضلات مذکور در تحقیق حاضر بود.

Real time – PCR: حدود ۵۰ میلی گرم عضله با روش هاون کوبی پودر گردید و جهت استخراج total RNA به نسبت ۱ به ۱۰ در Isol RNA-Lysis reagent هموژن گردید. به منظور برداشتن اجزای پروتئینی محصول حاصل در $4^{\circ}C$,12000g, 10min سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با Isol اولیه با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در $4^{\circ}C$,12000g, 15 min سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱به ۰/۵ با ایزوپروپانل مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در $4^{\circ}C$,12000 g, 10 min سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰µL آب RNAS-Free حل گردید. غلظت RNA با استفاده از دستگاه nono drop سنجیده و نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰ بین ۱.۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید (١٦).

سنتز cDNA با استفاده از 1 µg از RNA و با استفاده از Random hexamer primer و آنزیم Mulv Reverse transcriptase انجام گرفت. Real time – PCR با استفاده از Premix syber green II و با استفاده ازغلظت 100 ng از cDNA انجام گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۲ گزارش شده است ضمن اینکه از 18S به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. کارایی پرایمر های تحقیق در قیاس با پرایمر ژن کنترل با انجام Real time RT-PCR با غلظت های سریالی از cDNA هر ژن به صورت جداگانه سنجیده شد (١٦). برنامه مورد استفاده در Real time شامل :95° به مدت ۱۰ دقیقه –95° به مدت ۱۵ ثانیه،60° به مدت ۱ دقیقه (تکرار ٤۰ چرخه) بود. میزان بیان ژن های مورد نظر با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری شد (۱۷). با وجود اینکه ریزش نمونه در تحقیق حاضر وجود نداشت لیکن تجزیه و تحلیل نهایی بر روی ٦ راس در هر گروه انجام گردید.

جدول ۲ . توالی پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق

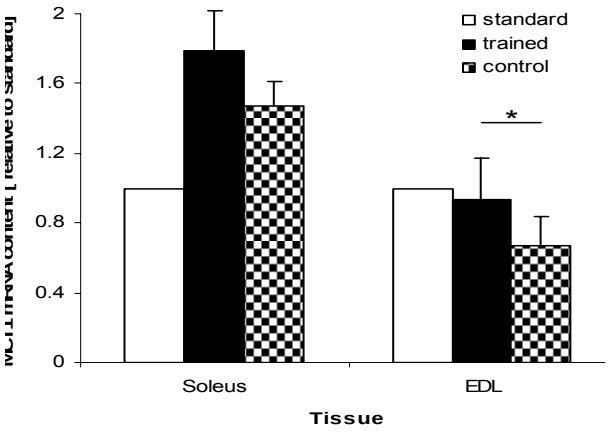
Genebank	Reverse primer (3' to 5')	Forward primer (3' to 5')	ژن
NM-012716	CAATCATAGTCAGAGCTGGG	GCTGTCATGTATGCCGGA	**MCT1**
NM-030834	TTGAGAGCCAGACCCAAGC	GCTGGCTATGCTGTATGGC	**MCT4**
	GTTGGTTTTCGGAACTGAGGC	GTCGGCATCGTTTATGGTCG	**18 S**
	TCATCCTGTCACTGGTATTCGG	GTGGGTATAAACTGCTGTATGG	**CD147**

روش آماری

در بخش آمار توصیفی از شاخصهای پراکندگی انحراف معیار، میانگین استفاده شد.بعد از اینکه طبیعی بودن توزیع داده ها با استفاده از آزمون کلموگروف – اسمیرنوف تایید شد، جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت متغیرها بین گروههای تحقیق از آزمون آماری t استیودنت و معنی دار بودن روابط بین متغیر ها از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. به منظور امکان انجام کار آماری بر داده های تحقیق، تغییرات بیان هر کدام از ژنهای MCT1 , MCT4 و CD147 در هر عضله نسبت به بیان همان ژن در عضله مخالف سنجیده و سپس مقایسه بین گروههای تحقیق انجام گرفت. مقدار α درتمامی مراحل برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

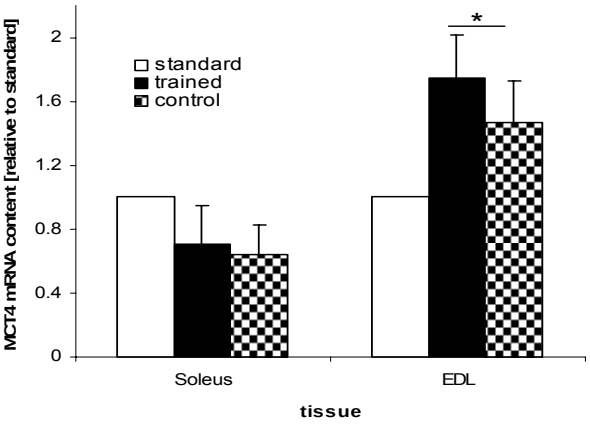
بیان ژن MCT و MCT4 : محتوی MCT1 mRNA در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل بعد از اعمال برنامه تمرینی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۲۳ و ٤٧ درصد بیشتر بود. این اختلاف بین گروهها فقط در عضله EDL معنی دار بود ($t = ۳/۱٦$, $p <۰/۰۵$) (شکل 1a).



شکل (a) ۱. محتوی MCT1 mRNA در عضلات اسکلتی

گروه های تحقیق

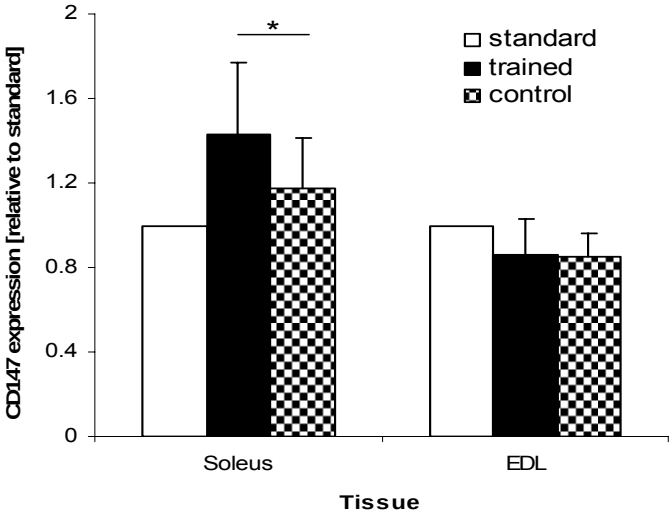
[کنترل (n = 6)، تمرینی (n = 6)]، * اختلاف معنی دار $p <۰/۰۵$



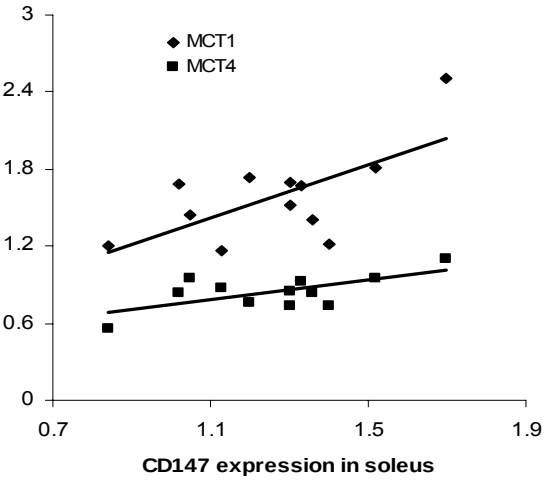
شکل (b)۱. محتوی MCT4 mRNA در عضلات اسکلتی

گروه های تحقیق

محتوی MCT4 mRNA در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل بعد از اعمال برنامه تمرینی در عضله نعلی و EDL به ترتیب ۹ و ۱۹ درصد افزایش داشت (شکل 1b) این افزایش فقط در عضله EDL بین دو گروه اختلاف معنی دار داشت ($t =۲/۷۵$, $p <۰/۰۵$).



شکل (a) ۲. محتوی mRNA CD147 در عضلات اسکلتی
گروه های تحقیق
[کنترل (n = 6)، تمرینی (n = 6)]، * اختلاف معنی دار $p < ۰/۰۵$



شکل (b)۲. ارتباط بین محتوی mRNA CD147،
MCT1 و MCT4 در عضله نعلی

بیان ژن CD147

بعد از اعمال برنامه تمرینی محتوی mRNA CD147 در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل در عضله نعلی بدون تغییر و در عضله EDL ۲۱ درصد بیشتر بود و به لحاظ آماری معنی دار بود ($t = 2.48$, $p < ۰/۰۵$) (شکل 2a).

بین محتوی mRNA CD147 و MCT1 فقط در عضله نعلی همبستگی معنی دار یافت شد ($p < ۰/۵٤$, $r = ۱/۰۱$) این همبستگی در مورد MCT4 معنی دار نبود (شکل 2b).

بحث و نتیجه گیری

مطالعه حاضر به منظور تعیین تغییرات در بیان ژن MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی موشهای صحرایی نژاد ویستار نر متعاقب تمرین استقامتی به اجرا درآمد. مطالعه حاضر نشان داد که MCT1 و MCT4 به آن دسته از ژن هایی تعلق دارند که در پاسخ به تمرین افزایش می یابند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که الگوی تغییرات بیان MCT1 و MCT4 تا حدودی بین خود عضله و در مقایسه با عضلات دیگر متفاوت است که امکان پاسخ مختص هر ژن و مختص به ترکیب تار را گوشزد می کند. این نتایج تحقیق پیلگراد و همکاران (۱۸) و هیلدبرنت و همکاران (۱۹) هم راستاست که نشان دادند در مقایسه با عضلات تند انقباض میزان نسخه برداری یک ژن خاص (به عنوان مثال HO-1) در عضلات کند انقباض بیشتر است. زمانی که میزان بیان MCT1 در دو عضله نعلی و EDL با هم مقایسه شد نتایج حاکی از افزایش بیشتر بیان MCT1 در عضله EDL بود. این نتیجه در ظاهر متناقض به نظر می رسد چرا که با توجه به ماهیت استقامتی برنامه تمرینی مورد استفاده در تحقیق حاضر و با توجه به خصوصیات اکسایشی عضله نعلی افزایش بیشتر بیان MCT1 در این عضله مورد انتظار است. این نتیجه مطابق با اصل بیان کمتر – فراهمی سریعتر (۱۸) قابل تفسیر است که طبق آن هر چه محتوی یک پروتئین در بافت مشخص کمتر باشد، به نیازهای سوخت و سازی، تنظیمی و سیگنالینگ با افزایش در بیان ژن و فراهمی بیشتر mRNA پاسخ می دهد. یه دلیل اینکه تحقیق ما در جهت پاسخگویی به این امر طراحی نشده بود و ملزومات اظهار نظر در مورد این امر با داده های ما فراهم نیست، نمی توان دراین مورد اظهار نظر نهایی نمود. مطالعه با روش سریال زمانی در پاسخ به یک جلسه تمرینی حاد، جهت مشخص شدن این موضوع به محققان آینده پیشنهاد می شود.

الگوی متفاوت در پاسخ محتوی MCT1 و MCT4 mRNA در تارهای عضلانی مختلف پیشنهادکننده این است که پاسخ ملکولی به تمرین احتمالاً بواسطه سازوکارهای سینگالینگ مختلف واسطه‌گری می‌شود. این فرضیه را می‌توان توسعه داد که راهبرد بکارگرفته شده توسط میوفیبریلها جهت تنظیم نسخه‌برداری یک ژن خاص بازگوکننده نیاز محصول آن

ژن نسبت به نیازی است که در اثر تمرین بر آن اعمال می‌شود. این مسئله در تحقیق حاضر دیده شد جایی که به دلیل پایین بودن میزان بیان MCT1 در عضله EDL و یا میزان بیان MCT4 در عضله نعلی، نهایتاً پاسخ این دو ژن به تمرین استقامتی با افزایش بیان ژن آنها جبران گردید. موارد مشابه در تحقیقات دیگر نیز به چشم می‌خورد، به عنوان مثال هگزوکیناز II ، آنزیم متابولیکی است که میزان غلظت پایه آن جهت تجزیه گلوکز در تارهای عضلانی کافی نیست و در حین تمرین متوسط سازوکارهای پیش ترجمه‌ای آن فعال می‌شوند و سبب افزایش نسخه‌برداری این آنزیم می‌شوند (۳۰). مورد برعکس درباره آنزیم کارنیتین اسیل تراسنفراز I دیده می‌شود که به دلیل زیاد بودن غلظت‌های استراحتی آن، افزایش فرآیند نسخه‌برداری دیده نمی‌شود چرا که می‌تواند نیازهای متابولیکی میوفیبریلها را پاسخگو باشد (۲۰).

متعاقب اعمال تمرین استقامتی، بیان MCT1 در هر دو نوع عضله افزایش داشت هر چند که این افزایش معنی دار نبود. PGC1-α عاملی است که می تواند بیان MCTs و بالاخص بیان MCT1 را تحت تأثیر قرار دهد. نشان داده شده است که بیان PGC1-α در پاسخ به تحریک الکتریکی (۲۱) یا به تمرین در موش (۲۲) و انسان (۲۳) افزایش می یابد که می تواند افزایش بیان MCT1 در تحقیق حاضر را تفسیر نماید. عمل PGC1-α وابسته به غلظت کلسیم درون سلولی است و از طریق مسیر CAMK II عمل می کند (۲٤). در این مسیر پیام رسانی P38 MAPK نقش اصلی در تنظیم بیان PGC1α بازی می کند. P38 MAPK محصول نهایی یا برونداد نهایی مسیر CAMK II در یک مسیر سیگنالی است که بوسیله آن ازدیاد Ca+2 منجر به افزایش بیان PGC1-α می‌شود. P38 MAPK از دو طریق فسفریلاسیون PGC1α و یا افزایش بیان و نسخه‌برداری آن می‌تواند فعالیت PGC1-α را افزایش دهد (۲٤).

عامل حاصله از هایپوکسی (HIF-1α) عامل دیگری است که می‌تواند تنظیم بیان ژن MCTs را تحت تأثیر قرار دهد. این عامل بر بیان MCT1 بدون تأثیر و عمده اثرات خود را بر MCT4 اعمال می کند. در مطالعه محمد و همکاران (۲۵) نشان داده شد که بیان ژن MCT4 درپاسخ به هایپوکسی از طریق افزایش نسخه‌برداری انجام می‌شود که این فرآیند توسط عامل HIF-1α واسطه‌گری می‌شود. در این مطالعه بر اثر وقوع هایپوکسی، میزان پروتئین و mRNA MCT4 افزایش داشت و پروموتور شناسایی شده در MCT4 به هایپوکسی جواب می داد. در توالی MCT4 DNA دو پروموتور HRE وجود دارد وجود دو منطقه HREs که بواسطه ۸ نوکلئوتید از هم جدا شده‌اند، ویژگی عمومی ژن‌هایی است که تحت تأثیر هایپوکسی، فرآیند نسخه‌برداری در آنها تغییر می‌کند. هر چند وقوع هایپوکسی بیشتر در ورزشهای پر شدت انجام می شود، لیکن از آنجایی که در تحقیق حاضر شدت برنامه تمرینی در هفته های آخر به گونه‌ای طراحی شد که باعث تأثیرات قابل ملاحظه در میزان غلظت لاکتات خون شود، و شدت تمرینی به گونه‌ای بود که وقوع هایپوکسی را محتمل می‌کرد، احتمالا بخشی از پاسخ بیان ژن MCT4 ، از طریق عملکرد فاکتور HIF-1α و تأثیر آن بر MCT4 قابل تفسیر است (۲۵).

با وجود افزایش در محتوی mRNA در هر دو ایزوفرم نقش فرایندهای پیش ترجمه ای در تنظیم بیان MCT4 نسبت به MCT1 بیشتر بود. وجود یک منطقه غیر ترجمه ای بزرگ (1.6 kb) در توالی نوکلئوتیدی MCT1 می تواند فرایند نسخه برداری این ژن را کاهش و اهمیت روند های پیش ترجمه ای را در تنظیم آن را کاهش دهد (۲٦). محتوی MCT4 تنها به مقادیر آن در سطح سارکولما محدود است (۲۷، ۲۸) در حالیکه MCT1 هم مقادیر سارکولمایی را شامل می شود و هم دارای ذخایر درون سلولی است که امکان انتقال به سطح سارکولما را داراست. بونن و همکاران (۲۸) در تحقیق خود نشان دادند که بلافاصله بعد از یک جلسه تمرین حاد میزان بیان MCT1 و MCT4 افزایش می یابد ضمن اینکه افزایش در محتوی MCT1 و MCT4 دراین دوره نیز اتفاق می افتد. این احتمال وجود دارد که به دلیل عدم وجود ذخایر درون سلولی MCT4، اهمیت مکانیسم های پیش ترجمه ای در تنظیم محتوایی MCT4 نسبت به MCT1 از اهمیت بیشتری برخوردار باشد.

به دلیل اینکه وجود CD147 برای بیان طبیعی MCTs مورد نیاز است، مطالعاتی که از خاموش کردن CD147 استفاده نموده‌اند، کاهش بارز در بیان MCT1 و MCT4 را گزارش نموده‌اند و تأیید کرده‌اند که CD147 یک پروتئین کمکی است که وجود آن برای بیان طبیعی MCTs مورد نیاز است (۲۹).

بعضی از مطالعات هم بر این اعتقاد هستند که MCT1 و MCT4 انتقال دهنده‌های هترومریک هستند که از یک واحد مونوکربوکسیلات انتقال دهنده و یک زیر واحد CD147 تشکیل شده‌اند. در مطالعه حاضر بیان CD147 در عضلات نعلی افزایش داشت که می‌تواند این عامل را به عنوان یک عامل تنظیمی در بیان MCTs در این عضله در پاسخ به تمرین معرفی نماید. این اولین مطالعه‌ای است که پاسخ توأمان بیان ژن CD147 و MCTs را بصورت یکجا در پاسخ به تمرین استقامتی مورد مطالعه قرار می‌دهد. در این مطالعه افزایش در بیان MCT1 در عضلات اسکلتی با میزان افزایش در بیان ژن CD147 رابطه داشت که بیانگر این مطلب است که بیان CD147 با خصوصیات اکسایشی بافت در رابطه است. هر چند بر اساس نتایج ما این ژن تاثیری بر بیان MCT4 نداشت لیکن مطالعات دیگر وجودCD147 برای بیان طبیعی MCT4 را گزارش نمودند (۲۹). احتمالاً این تناقض مربوط به شرایط تحقیق است چرا که بیشتر این مطالعات بر سلولهای سرطانی صورت گرفته اند. اینکه آیا CD147 در روند تکاملی این انتقال دهند ها در دستگاه گلژی را تسریع می‌کند یا اینکه در مرحله انتقال این انتقال دهند ها به سمت غشای پلاسمائی و بیان شدن آن‌ها بر روی غشا تأثیرگذار است از نتایج تحقیق حاضر قابل استناد نیست و انجام تحقیقی دیگر و مطالعه هم بیانی این پروتئینها با یکدیگر در غشای پلاسمایی و تعیین تاثیر تمرین بر این فرایند به محققان بعدی پیشنهاد می شود.

به طور خلاصه مطالعه حاضر نشان داد که بخشی از افزایش بیان MCT1 و MCT4 در عضلات اسکلتی متعاقب تمرین استقامتی از طریق افزایش در ساز وکارهای پیش ترجمه ای اتفاق می افتد. این تنظیم ساز وکارهای پیش ترجمه ای در بیان MCT1 و MCT4 به روش مختص به ایزوفرم اتفاق می افتد به گونه ای که نقش ساز وکارهای پیش ترجمه ای در بیان MCT4 بسیار بارز و در بیان MCT1 نقش ناچیزی دارد. هم چنین بیان CD147 در عضلات اسکلتی با بیان MCT1 عضله در رابطه است. در نهایت با این که میزان mRNA فاکتورهای مورد نظر در اثر تمرین در تحقیق حاضر افزایش داشت، به دلیل اینکه عوامل مختلف در ترجمه باعث ناپایداری mRNA و عدم بیان پروتئین می گردند، بیان نهایی می بایست در مقدار پروتئین این فاکتورها نیز مطالعه گردد.

سپاس و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه تهران به جهت حمایت مالی از تحقیق حاضر ابراز می دارند.

منابع

1. Brooks GA. Lactate shuttle - between but not within cells? J Physiol 2002; 541: 333 - 539
2. Brooks GA. Cell–cell and intracellular lactate shuttles. J Physiol 2009; 587(23): 5591–5600
3. Juel C. Current aspects of lactate exchange: Lactate/H+ transport in human skeletal muscle. Eur J Appl Physiol 2001; 86: 12 – 16
4. Bishop D, Edge J, ThomasC, Mercier J. Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and post exercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008; 295(6): 1991–1998
5. Andrew PH. The Monocarboxylate Transporter Family—Structure and Functional Characterization. IUBMB Life 2012; 64(1): 1–9
6. Bonen A. The expression of lactate transporters (MCT1 and MCT4) in heart and muscle. Eur J Appl Physiol 2001; 86: 6-11
7. Dubouchaud H, Gail E, Eugene E, Bryan W, Bergman C, Brooks GA. Endurance training, expression and physiology of LDH, MCT1 and MCT4 in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 278: 571-579
8. Bonen A, Mio T, Dragana M, Catherine H, John JH, Andrew P. Isoform-specific regulation of the lactate transporters MCT1 and MCT4 by contractile activity. Am J Physiol Endocrinol Metab 2000; 279: 1131–1138
9. Heredia FP, Wood IS, Trayhurn P. Hypoxia stimulates lactate release and modulates monocarboxylate transporter (MCT1, MCT2, and MCT4) expression in human adipocytes. Eur J Physiol 2010; 459: 509–518

10. McCullagh KJA , Bonen A. Reduced lactate transport in denervated rat skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 1995; 268: R884–R888
11. Dubouchaud H, Granier P, Mercier J, Le Peuch C, Prefaut C. Lactate uptake by skeletal muscle sarcolemmal vesicles decreases after 4 wk of hindlimb unweighting in rats. J Appl Physiol 1996; 80: 416–421
12. Kirk P, Wilson MC, Heddle C, Brown MH and et al. CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. Embo J 2000; 19(15): 896-904
13. Bishop D, Edge J, Thomas C, Mercier J. Effects of high-intensity training on muscle lactate transporters and postexercise recovery of muscle lactate and hydrogen ions in women. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008; 295: 1991–1998
14. Thomas C, Bishop D, Moore MT, Mercier J. Effects of high-intensity training on MCT1, MCT4, and NBC expressions in rat skeletal muscles: influence of chronic metabolic alkalosis. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 293: 916–922
15. Thomas C, Bishop DJ, Lambert K, Mercier J, Brooks GA. Effects of acute and chronic exercise on sarcolemmal MCT1 and MCT4 contents in human skeletal muscles: current status. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2012; 302(1): R1-14
16. Enoki T, Yuko Y, Lally J, Hideo H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter MCT1 and MCT4 in rat skeletal muscle. J Physiol 2006; 577.1:433–443
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−Delta Delta C(T) method. Methods 2001; 25: 402–408
18. Pilegaard H, Ordway G, Saltin B, Neufer P.D. Transcripional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recoverey from exercise. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2000; 279: 806–814
19. Hildebrandt AL, Pilegaard H, Neufer PD . Differential transcriptional activation of select metabolic genes in response to variations in exercise intensity and duration. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 285: 1021–1027
20. Taylor CT, Katz LM, Eivers SS and et al. Alterations in oxidative gene expression in equine skeletal muscle following exercise and training. Physiol Genomics 2010; 40 (2): 83-93
21. Benton CR, Yoshida Y, Lally J, Han XX, Hatta H, Bonen A. PGC-1α increases skeletal muscle lactate uptake by increasing the expression of MCT1 but not MCT2 or MCT4. Physiol Genomics 2008; 35:45–54
22. Terada S, Tabata I. Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1alpha protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 286: 208–216
23. Russell AP, Feilchenfeldt J, Schreiber Set al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. Diabetes 2003; 52: 2874–2881
24. Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE, Holloszy JO. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen activated protein kinase activation. J Biol Chem. 2007; 82: 18793 – 18799
25. Mohammed S, Andrew JD, Andrew PH. The plasma membrane lactate transporter MCT4,but not MCT1,is up-regulated by hypoxia through a HIF-1-dependent mechanism. J of biological chemistry 2006; 14: 9030–37
26. Miyamoto S, Chiorini JA, Urcelay E, Safer B. Regulation of gene expression for translation initiation factor eIF-2 alpha: importance of the 3' untranslated region. Biochem J 1996; 315: 791–798
27. Coles L, Litt J, Hatta H, Bonen A. Exercise rapidly increases expression of the monocarboxylate transporters MCT1 and MCT4 in rat muscle. J Physiol 2004; 561 (1): 253-261
28. Metz L, Mercier J, Tremblay A, Alméras N and Denis R. Effect of weight loss on lactate transporter expression in skeletal muscle of obese subjects. J Appl Physiol 2008; 104: 633-638
29. Schneiderhan W, Scheler M, Holzmann KH. CD147 silencing inhibits lactate transport and reduces malignant potential of pancreatic cancer cells in in vivo and in vitro models. Gut 2009; 58: 1391-1398

The effects of seven weeks endurance training on lactate transportes gene expression in skeletal muscles of Wistar rats

NikooieR[1], Rajabi H[2]*, Gharakhanlu R [3], Omidfar K [4]

1- Shahid Bahonar University
2- Kharazmi University of Tehran
3- Tarbiat Modares University
4- Tehran University

Received: 28/10/2013 **Revised:** 02/12/2013 **Accepted:** 26/02/2014

***Correspondence:**
Rajabi Hamid, Kharazmi University of Tehran

E-mail:
hrajabi@hotmail.com

Abstract

Purpose: Despite the well-established exercise effects on monocarboxylate transportes (MCTs), the triggers of these changes still remains unknown. The objective of the present study was to investigate the long-term effects of seven-week endurance training on MCT1 and MCT4 gene expression of Soleus and extensor digitorum longus (EDL) and their correlation with basigin (CD147) gene expression.

Methods: Twenty male wistar rats (173.1 – 208.4 g) were randomly divided in two equal control and training groups according to their body weight. Endurance training (start with 20 m/min, or 20 min and progressively increase to 30 m/min, for 35 min) was applied to the training group for seven weeks. 48 hours after the final session of training, the rats were sacrificed and soleus and EDL were extracted immediately. MCT1 and MCT4 gene expression were measured by Real time-PCR technique and relative expression of each gene was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Between-group variance was determined by independent t-test and Pearson Coefficient Correlation was used for the determination of significant correlation between variables.

Results: Significant increase (% 47) in EDL MCT1 expression ($p < 0.05$), 19 percent in EDL MCT4 expression ($p < 0.05$) were found in trained animals in comparison to control group. CD147 expression in trained animals remained unchanged in EDL and had significant increase (% 21) in soleus muscle in comparison to control group. Significant correlation was only found for Soleus muscle between MCT1 and CD147.

Conclusion: The findings of the study illustrate that exercise – induced increase in MCT1 and MCT4 expression is partially modulated by transcriptional mechanisms and occur in isoform – specific manner. The CD147 expression is correlated with tissue oxidative capacity and regulates the MCT1 expression.

Key words: Momocarboxylate transporters, Endurance training, Male wistar rats