

## بررسی پاسخ سریال زمانی microRNA-1 به تمرین مقاومتی در عضلات اسکلتی کند و تند انقباض رت‌های نر نژاد ویستار

محمد فتحی<sup>۱</sup>، رضا قراخانو\*<sup>۲</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۲</sup>، حمید رجبی<sup>۳</sup>، راضیه رضایی<sup>۴</sup>

۱- استادیار دانشگاه لرستان

۲- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس

۳- دانشیار دانشگاه خوارزمی

۴- دانشجوی دکترای فیزیولوژی ورزش دانشگاه شهید چمران

\* نشانی نویسنده مسئول: تهران، تقاطع بزرگراه چمران و جلال ال احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم انسانی، گروه تربیت بدنی

Email: ghara\_re@modares.ac.ir

پذیرش: ۹۲/۱۱/۹

اصلاح: ۹۲/۱۱/۱

وصول: ۹۲/۱۰/۲۲

### چکیده

**مقدمه و هدف:** microRNAs (miRs) در فرآیندهای مختلف سلولی درگیرند و بیان ژن را مهار می‌کنند. یکی از این miRs (miR-1) است که ویژه بافت عضله است و میزان آن با هایپرتروفی عضلانی کاهش می‌یابد؛ با توجه به پاسخ متفاوت عضلات تند و کند به تمرین مقاومتی، هدف این مطالعه ارزیابی اثر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضلات اسکلتی کند و تند انقباض رت‌های نر نژاد ویستار است.

**روش‌شناسی:** نمونه‌هایی این مطالعه بنیادی ۱۵ سر رت بودند که به صورت تصادفی به گروه تمرینی (۱۰ سر) و کنترل (۵ سر) تقسیم شدند. گروه تمرینی یک جلسه تمرین مقاومتی (صعود از نردبان یک متری، ۴ ست با ۵ تکرار) را اجرا کرد، سپس ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی همراه با گروه کنترل بی‌هوش و تشریح شدند، عضله‌ی نعلی و عضله بازکننده دراز انگشتان (EDL) - به ترتیب به عنوان عضله کند و تند انقباض - جدا شدند. از روش Real time RT-PCR برای اندازه‌گیری میزان بیان miR-1 استفاده شد و در پایان از آزمون آماری t تک نمونه‌ای و t مستقل استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که میزان بیان miR-1 در عضله EDL در پاسخ به یک جلسه تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری ۳ ساعت ( $P < 0.0001$ ) و ۶ ساعت ( $P < 0.001$ ) بعد از تمرین مقاومتی به ترتیب ۹۹ و ۷۳ درصد کاهش می‌یابد. در حالیکه بیان miR-1 در عضله نعلی در ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی به ترتیب ۴۰ درصد کاهش ( $P < 0.0003$ ) و سپس ۲۲۴ درصد افزایش داشت که این تغییرات معنی‌دار نبودند ( $P < 0.196$ ).

**بحث و نتیجه‌گیری:** یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود که احتمالاً نشان دهنده فعال سازی فرآیند تکثیر در سلول‌ها عضله EDL در اثر تمرین مقاومتی باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تمرین مقاومتی، عضله بازکننده دراز انگشتان، عضله نعلی، microRNA-1

### مقدمه

حیات تا مرگ (۲) درگیرند برخی از این miRs خاص عضله هستند و در بافت‌های دیگر بیان نمی‌شوند؛ بنابراین آن‌ها را myomiR می‌گویند (۳)، که عبارتند از؛ miR-1، خانواده miR-133a miR-133b miR-206 خانواده

microRNAs یا miRs، RNA غیرکدی کوچکی هستند، که در بسیاری از فرآیندهای سلولی مانند رشد، تکامل، تکثیر، تمایز و همچنین بیماری‌ها (۱) از زمان آغاز

شد که میزان بیان آن در ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین در نمونه‌های انسانی جوان کاهش می‌یابد، اما در نمونه‌های مسن‌تر تغییر معنی‌داری نداشت، هرچند علاوه بر متغیر مستقل فعالیت بدنی در این تحقیق مصرف اسیدهای آمینه شاخه‌دار نیز تجویز شد (۱۳). در پژوهش دیگری گزارش شد که یک جلسه تمرین استقامتی باعث افزایش بیان معنی‌دار miR-1 در عضلات می‌شود که در معرض تمرین قرار داده می‌شوند (۱۷). نیلسن در نمونه‌های انسانی مشاهده کرد که بیان miR-1 در بلافاصله و ۲۴۰ دقیقه پس از یک جلسه تمرین استقامتی تحت تاثیر قرار نمی‌گیرد اما در ۶۰ دقیقه بعد از تمرین به میزان معنی‌داری افزایش می‌یابد این در حالی بود که بعد از ۱۲ هفته تمرین استقامتی این روند مقداری متفاوت بود به این صورت که میزان بیان miR-1 در همان زمان‌های ذکر شده، تحت تاثیر همان جلسه حاد استقامتی قرار نمی‌گیرد (۱۴).

همانطور که ذکر شد miR-1 در عضلات نقش تعیین‌کننده‌ای در تمایز عضلات دارد که با سرکوب فاکتور HDAC4 (۶) زمینه را برای افزایش تمایز (۱۹) فراهم می‌آورد رخدادی که بر اثر تمرینات مقاومتی به وقوع می‌پیوندد (۲۰)، مجموعه این رویدادها موجب تغییرات متناسب با تمرین در عضلات تند و کند می‌شود. ضمن اینکه می‌دانیم پاسخ عضلات تند و کند به فعالیت‌های مقاومتی متفاوت است احتمالاً miR-1 در این فرآیند نقش محوری را ایفا کند اما هنوز پژوهشی تغییرات آن را تحت تاثیر فعالیت مقاومتی حاد بررسی نکرده است بنابراین هدف این پژوهش بررسی اثر یک جلسه حاد تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضلات تند و کند انقباض است.

### روش‌شناسی

۱۵ سر رت نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن ( $113 \pm 12$  گرم) از انستیتو پاستور تهیه شد. برای همه آن‌ها شرایط مناسب (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص

miR-208a - miR-208b و miR-499 (۱، ۴). miRs در پایین دست ژن‌های هدف خود را سرکوب می‌کنند (۵، ۱).

miR-1 همراه با miR-133 بر روی یک ژن بیسیسترونی (قطعه از DNA که اطلاعات دو ژن روی آن قرار دارد و با هم رونویسی می‌شوند) قرار دارند که با هم رونویسی می‌شوند (۶). miR-1 دارای دو همولوگ miR-1-1 و miR-1-2 است که در نوع نوکلئوتید با هم تفاوتی ندارند تنها تفاوت آن‌ها به محل قرارگیری آن‌ها در روی کروموزوم‌ها برمی‌گردد که به ترتیب در موش‌ها بر روی کروموزوم شماره ۲ و ۱۸ قرار دارند (۱). miR-1 ۲۱ نوکلئوتید طول دارد که توالی آن به صورت UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA است (۱). ژن‌های هدف miR-1 عبارتند از Hand2 (درگیر در تکثیر سلول‌ها)، Irf5، KCND2 (کنترل هدایت پذیری سیگنال‌های قلب)، HDAC4 (درگیر در عضله‌زایی) و Delta (عضله‌زایی در قلب) (۱). میزان بیان miR-1 در اثر برخی ناهنجاری‌های عضلانی تغییر می‌کند (۸، ۷).

پژوهش‌ها نشان داده است که فعالیت‌های بدنی بر بسیاری از فرآیندهای سلولی مولکولی (۹، ۱۰) تاثیر می‌گذارد، اما تعداد پژوهش‌ها در این حوزه بر روی myomiRs (۱۱-۱۵)، و miRs که ویژه عضلات نیستند انگشت شمار است (۱۶، ۱۷). با این وجود همین تعداد پژوهش نشان می‌دهد که هم فعالیت بدنی بر بیان miRs اثر می‌گذارد (۱۵) و هم تغییر در miRs موجب ایجاد سازگاری‌های ناشی از فعالیت بدنی می‌شود (۱۴، ۱۱)، در پژوهش‌های کلر (۱۸) و قراخانلو (منتشر نشده) تاثیرپذیری miRs از فعالیت بدنی تایید شده است.

اما در مورد miR-1 مکارنتی و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که در اثر یک دوره اضافه‌بار عملکردی در عضلات نعلی و پلانتریس میزان بیان آن به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (۱۱). اما در تحقیق درآموند (Drummond) و همکارانش (۲۰۰۸) مشخص

موش، چرخه تاریکی و روشنایی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما  $22 \pm 3$  درجه سانتی گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس تا رسیدن به سن بلوغ فراهم شد. در پایان این دوره سن رت‌ها به ۹ هفته رسید. در این مدت رت‌ها در ۳ قفس (۵ رت در هر قفسه) یکسان نگهداری شدند.

### استخراج RNA از بافت

سپس دوره آشناسازی رت‌ها با تمرینات مقاومتی آغاز شد که این دوره یک هفته (سه جلسه) به طول انجامید. در جلسه اول رت‌ها با وزنه‌ای به میزان ۱۰ درصد وزن خودشان که به دمشان وصل بود از نردبانی به ارتفاع ۱ متر (۲۶ پله) با شیب کمتر از شیب اصلی، سه بار بالا می رفتند و سپس در جلسات دوم و سوم همین بار و تکرار در نظر گرفته شد، اما زاویه نردبان به ۸۵ درجه افزایش یافت. در پایان این دوره، رت‌ها به صورت تصادفی به ۲ گروه (۵ سر به عنوان گروه کنترل و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تمرینی) تقسیم شدند که گروه تمرینی یک جلسه تمرین مقاومتی (صعود از یک نردبان یک متری با ۲۶ پله و زاویه ۸۵ درجه) با ۴ ست، ۵ تکرار، ۳۰ ثانیه استراحت بین تکرارها و ۲ دقیقه استراحت بین ست‌ها را اجرا کرد (۲۱). برای تعیین بار اولیه، ابتدا وزن آن‌ها اندازه‌گیری شد و بار اولیه، ۵۰ درصد وزن هر رت در نظر گرفته شد. در ادامه، در ابتدای اجرای هر ست ۱۰ درصد وزن رت به بار اولیه اضافه می شد به طوری که هر رت در پایان ست چهارم ۸۰ درصد وزن خود را از نردبان بالا می برد (۲۲).

برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی گرم از بافت داخل میکروتیوب، ۱ میلی لیتر تریزول (Invitrogen) اضافه شد و پس از مخلوط کردن کامل (پیپتاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد سپس ۲ میلی لیتر به آن کلوفرم سرد اضافه شد و پس از پیپتاژ (۱۵ ثانیه) حدود ۲ تا ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد، در ادامه میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به دقت برداشته شد و به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد (از این مرحله به بعد با سرسمپلر فیلتر دار کار شد) سپس ۵ میلی لیتر ایزوپروپانول سرد اضافه شد و بعد از هم زدن ملایم در دمای ۲۰- باقی ماندند (overnight). روز بعد میکروتیوب‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ مجدداً سانتریفیوژ شدند که در این مرحله یک رسوب سفید رنگ در ته اکثر میکروتیوب‌ها قابل مشاهده بود. با سمپلر (شرکت eppendorff) مایع رویی با دقت خارج شد و ۱ میلی لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با دور ۷۵۰۰ سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه شد و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی مانده اتانول تبخیر شود و داخل میکروتیوب خشک شود، بعد از این مرحله ۵۰ لاندا آب تزریقی به هر نمونه اضافه شد و چند بار به آرامی پیپتاژ صورت گرفت. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر

از آنجایی که برخی پژوهش‌ها اندازه‌گیری بیان miR-1 را در دو زمان ۳ و ۶ ساعت بعد از اعمال تمرین گزارش کرده‌اند (۱۳)، رت‌های گروه تمرینی به طور تصادفی به دو دسته تقسیم شدند که یک گروه ۳ ساعت و گروه دیگر ۶ ساعت پس از جلسه تمرین مقاومتی حاد به صورت زیر تشریح شدند. با رعایت مسائل اخلاقی ابتدا حیوانات با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم)

دستورالعمل کیت برای یک نمونه ۱۰ لاندای ترکیبی از master mix (۵ لاندای) پرایمر (۱ لاندای) و cDNA (۴ لاندای) در نظر گرفته شد و میزان بیان miR-1 با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد. در هر Run یک نمونه به عنوان کنترل منفی برای تعیین آلودگی master mix (طبق دستورالعمل شرکت Applied Biosystem نباید CT آن کمتر از ۳۵ باشد) در نظر گرفته شد. و کنترل داخلی (U6)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و miR-1 همزمان (در یک Run واحد) ارزیابی شد. نمونه‌ها به صورت دوتایی (duplicate) ارزیابی شدند. بعد از به دست آوردن CT دوتایی برای هر نمونه میانگین آنها محاسبه شد. لازم به ذکر است در برخی موارد نیاز بود که test مجدداً تکرار شود که در صورت نیاز تست تکرار می‌شد. در صورتی که CT پرتی مشاهده می‌شد همراه با نمونه کنترل آن از تحقیق حذف می‌شدند. بعد از انتقال اطلاعات به نرم افزار Excel طبق فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  میزان بیان miR-1 محاسبه شد (۲۳).

مشخصات پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده است. پرایمرهای miR-1 و رفرنس آن (Housekeeping) U6 از شرکت Exiqon تهیه شد.

جدول ۱. مشخصات پرایمر miR-1 و کنترل داخلی آن

miR-1	205104 rno-miR-1, LNA™ PCR primer set, UniRT. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set.
U6	203907, U6 snRNA (hsa, mmu, rno) PCR primer set, UniRT. miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set. NCBI Symbol U6snRNA, NCBI Accesion: x59362

آزمودنی باقی ماند) سپس نرمال بودن آنها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk ارزیابی شد نتایج این آزمون نشان داد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند. سپس با استفاده از آزمون Levene مساوی بودن واریانس‌ها ارزیابی شد. نتایج این آزمون نشان داد که

(شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱.۶ تا ۱.۸ بود. تمام مراحل کار زیر هودی که از قبل آماده شده بود (استریل شده با الکل ۷۵ درصد و نور UV) انجام می‌شد، غیر از مرحله‌ای که نیاز بود میکروتیوب‌های حاوی مواد سانتریفیوژ و یا ورتکس شوند. در طی مراحل از دستکش لاتکس بدون پودر استفاده می‌شد و به محض نیاز به تعویض دستکش‌ها تعویض می‌شدند. کیت‌ها دقیقاً قبل از استفاده از یخچال ۲۰- خارج می‌شدند و بعد از استفاده به داخل یخچال منتقل می‌شدند. تمام سمپلرها طبق زمانبندی‌های گروه کالیبره شده بودند.

### سنتز cDNA

برای رونویسی RNA به cDNA از کیت شرکت Exiqon با Cat # 203300 استفاده شد. و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت eppendorff بود.

### ارزیابی بیان ژن

برای ارزیابی بیان ژن از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت Applied Biosystem استفاده شد. SYBR Green master mix استفاده شده در این مرحله متعلق به شرکت Exiqon با Cat # 203450 بود. طبق

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

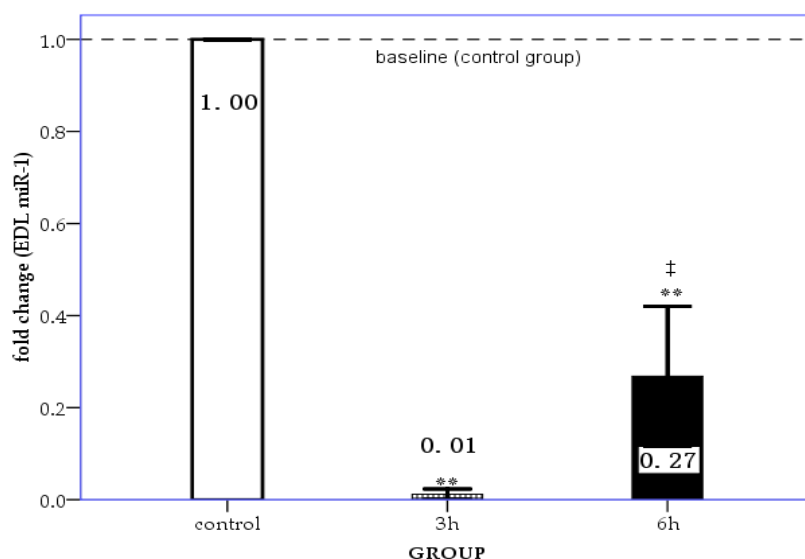
با انتقال داده‌ها به نرم افزار SPSS ابتدا داده‌های پرت مشخص و همراه با نمونه کنترل آن حذف شدند (عضلات EDL و نعلی هرکدام در ساعت ۳ یک داده پرت داشتند، بنابراین در ساعت ۳ برای هر عضله ۴

واریانس داده‌ها در عضلات نعلی اختلاف معنی‌داری با هم ندارند اما واریانس داده‌ها در عضله EDL با هم اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.04$ ) داشتند. از آزمون آماری  $t$  یک نمونه برای تعیین اختلاف گروه‌های تجربی (۳ و ۶ ساعت پس از تمرین) با گروه کنترل استفاده شد. در ادامه از آزمون  $t$  مستقل برای ارزیابی اختلاف بین گروه‌های تجربی (میانگین‌ها ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین) با همدیگر استفاده شد. برای عضله EDL، مقدار  $t$  برای داده‌ها با "واریانس نابرابر" در نظر گرفته شد. کلیه اعمال تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS16 و Excel 2007 انجام شد.

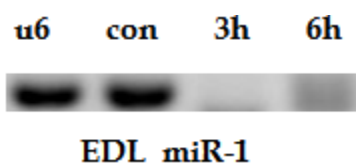
**نتایج**

در پایان مرحله نگهداری رت‌ها و آغاز اعمال تمرین مقاومتی، میانگین و انحراف استاندارد وزن آن‌ها به

۲۳۴/۶±۲۲/۶ گرم رسید. نتایج آزمون  $t$  ( $t = -1.86/7.40$ ) یک نمونه‌ای نشان داد که بیان miR-1 عضله EDL نسبت به گروه کنترل در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $P < 0.001$ )، و مقدار  $t$  ( $t = -9/5$ ) ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی همچنان کاهش معنی‌داری را در سطح  $P < 0.001$  نشان داد، به این معنی که مقادیر بیان miR-1 به ترتیب به میزان ۹۹ و ۷۳ درصد نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (شکل ۱). همچنین مقادیر  $t$  مستقل نشان داد ( $t = -3/32$ ) که بین گروه ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی در عضله EDL تفاوت معنی‌داری در سطح  $P < 0.029$  وجود دارد، به این معنی که میزان بیان miR-1 ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به طور معنی‌داری پایین‌تر از میزان بیان آن در ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی بود



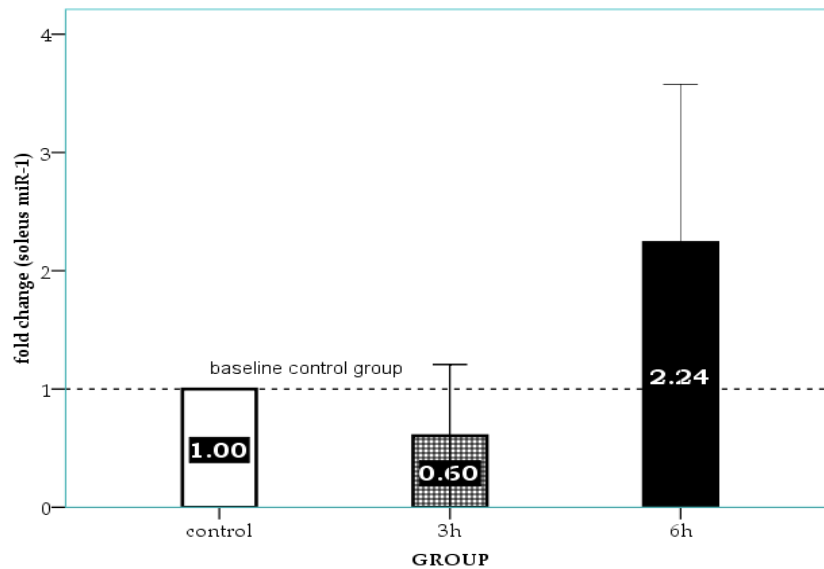
شکل ۱. تاثیر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 عضله EDL در گروه ۳ و ۶ ساعت پس از جلسه تمرین در مقایسه با گروه کنترل  
 \*\* معنی‌داری بودن تفاوت میانگین گروه‌ها در مقایسه با گروه کنترل در سطح ( $P < 0.01$ )  
 † معنی‌داری بودن تفاوت میانگین دو گروه تجربی (۳ و ۶ ساعت)



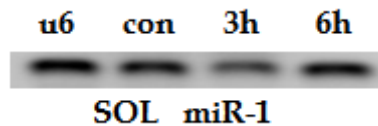
شکل ۲. نمایش محصول PCR miR-1 عضله EDL که با استفاده از u6 (سمت چپ) به عنوان کنترل داخلی نرمال شده‌اند گروه کنترل (con)، ۳ ساعت پس از تمرین (3h) و ۶ ساعت پس از تمرین (6h)

ساعت پس از تمرین مقاومتی همچنان غیر معنی داری ( $P = 0/196$ ) بود. همچنین مقادیر  $t$  مستقل در عضله نعلی نشان داد ( $t = -1/716$ ) که بین گروه ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی تفاوت معنی داری وجود ندارد. شکل ۵ نشان می دهد که روند تغییرات در این دو عضله متفاوت است.

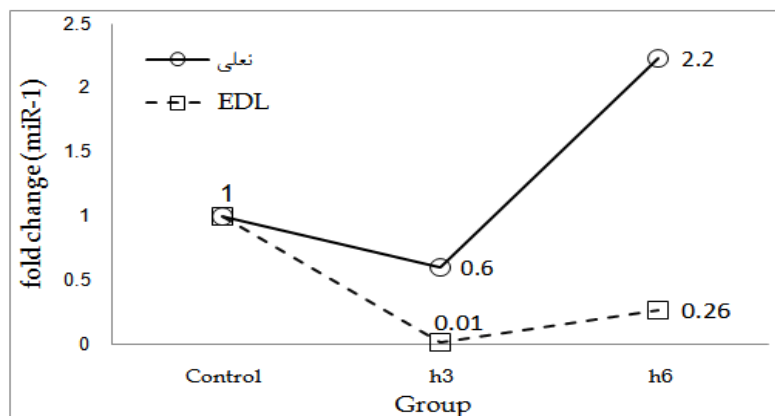
اما یافته‌ها در مورد عضله کند انقباض یعنی نعلی متفاوت بود به این صورت که آزمون  $t$  ( $t = -1/182$ ) یک نمونه‌ای نشان داد بیان miR-1 عضله نعلی نسبت به گروه کنترل در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی دچار تغییر معنی داری ( $P = 0/323$ ) نمی شود. مقدار  $t$  ( $t = 1/551$ ) ۶



شکل ۳. تاثیر یک جلسه تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 عضله نعلی در گروه ۳ و ۶ ساعت پس جلسه تمرین در مقایسه با گروه کنترل



شکل ۴. نمایش محصول PCR miR-1 عضله نعلی که با استفاده از u6 (سمت چپ) به عنوان کنترل داخلی نرمال شده‌اند گروه کنترل (con)، ۳ ساعت پس از تمرین (3h) و ۶ ساعت پس از تمرین (6h)



شکل ۵. روند تغییرات بیان miR-1 در گروه کنترل ۳ و ۶ ساعت پس از یک جلسه تمرین مقاومتی در عضله نعلی و EDL

**بحث و نتیجه گیری**

مهمترین یافته‌های این پژوهش نشان داد که در پاسخ به یک جلسه تمرین مقاومتی میزان بیان miR-1 در عضله EDL به طور معنی‌داری در ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی شدیداً کاهش یافت به طوری که این کاهش نسبت به گروه کنترل معنی‌دار شد، همچنین مشخص شد که بیان miR-1 در ۳ و ۶ ساعت پس از تمرین مقاومتی با هم اختلاف معنی‌داری دارند به این معنی که کاهش ۹۹ درصدی در ۳ ساعت پس از تمرین مقاومتی به ۷۳ درصد در ۶ ساعت رسید. در حالی که تمرین مقاومتی بر بیان miR-1 در عضله نعلی تأثیر معنی‌داری نداشت.

قبل از هرگونه بحث، ابتدا باید فرآیند سازگاری و پاسخ miR-1 به تمرینات ورزشی را جداگانه بررسی کنیم. سازگاری که در miR-1 نسبت به تمرینات قدرتی رخ می‌دهد عمدتاً به صورت عدم تغییر (۱۵) یا کاهش (۱۱) و کاهش در اثر تمرینات استقامتی (۱۴) است. پاسخ miR-1 به تمرینات مقاومتی و استقامتی به این صورت است که miR-1 در پاسخ به یک جلسه حاد تمرین مقاومتی کاهش می‌یابد البته این برنامه تمرینی همراه با مصرف اسیدهای آمینه شاخه‌دار بود (۱۳) لذا نمی‌تواند تأثیر صرف تمرینات مقاومتی باشد. اما در پاسخ به یک جلسه تمرین استقامتی میزان آن افزایش می‌یابد (۱۴، ۱۷). فعالیت‌های بدنی بلندمدت موجب القای برنامه تبدیل‌تار می‌شود (۲۴). احتمال دارد که برنامه تبدیل‌تارها با بیان miR-1 در ارتباط باشد. همچنین دیده شده که در پاسخ به فعالیت مقاومتی حاد یکسان، miR-1 در افراد جوان کمتر از افراد مسن بیان می‌شود (۱۳). احتمال دارد این تفاوت ریشه در تغییر نوع تار داشته باشد که با افزایش سن رخ می‌دهد زیرا میزان تارهای تند انقباض با افزایش سن کاهش می‌یابد (۲۵). در این پژوهش دیده شد که میزان بیان miR-1 در تارهای کند تغییر معنی‌داری را تجربه نمی‌کنند در صورتی که در

تارهای تند انقباض میزان آن شدیداً کاهش می‌یابد. در آزمودنی‌های حیوانی (موش) مشخص شده که miR-1 در پاسخ به یک دوره اضافه بار عملکردی (قطع عضله همکار) ۷ روزه در عضلات نعلی و پلانتریس کاهش می‌یابد (۱۱). که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد. مطالعه درآمونند (۲۰۰۸) نشان داد که یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش بیان miR-1 در عضله پهن جانبی افراد جوان ۳ و ۶ ساعت پس از پروتکل می‌شود اما در افراد پیر تأثیری بر بیان آن ندارد. این در حالی بود که میزان miR-1 استراحت افراد مسن بالاتر از افراد پیر بود (۱۳). سوسی (۲۰۱۱) در پژوهشی که بر روی رت‌ها انجام داد نشان داد که تمرینات استقامتی بلندمدت (۱۰ هفته‌شنا، ۵ روز در هفته) با شدت متوسط و بالا موجب کاهش بیان miR-1 در عضله قلب هر دو گروه می‌شود (۱۲). مطالعه مک‌کارتی (۲۰۰۷) نشان داد که تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله پلانتریس و نعلی می‌شود که با نتایج مطالعه حاضر در مورد عضله تند انقباض همخوانی اما در مورد عضله کند تناقض دارد (۱۱). با توجه به نتایج این مطالعه و همچنین مطالعات قبل به نظر می‌رسد که تأثیر فعالیت بدنی بر بیان miR-1 با فعال‌سازی برنامه تبدیل Myosin heavy chain (MHC) -زنجیره سنگین میوزین-، اعمال نوع تمرین ورزشی و نوع تارها ارتباط دارد.

miR-1 در زمان تمایز میوبلاست‌های اولیه و سلول‌های ماهواره‌ای به مقدار زیادی بیان می‌شود و موجب تمایز سلول‌های ماهواره‌ای می‌شوند و تکثیر آن‌ها را محدود می‌کند (۲۷). از طرف دیگر کاهش miR-1 موجب افزایش Histone Deacetylase 4 (HDAC4) - عامل سرکوب‌کننده تمایز- می‌شود، بنابراین افزایش miR-1 با تمایز سلول‌های عضله اسکلتی همراه است (۲) احتمالاً کاهش آن به خصوص در عضله EDL نشانه‌ای از فعال‌سازی اولیه سلول‌های ماهواره‌ای، یعنی تکثیر این سلول‌ها باشد (۲۸) که این فرآیند ممکن است در تارهایی

گیرنده‌ها با کاهش miR-1 (۳۳) که در اثر تمرینات مختلف ورزشی افزایش می‌یابند). همچنین دیده شده که کاهش میزان miR-1 با افزایش MEF2 همزمان است که از این طریق حلقه ارتباطی بین عصب و عضله با miR-1/MEF2 حفظ می‌شود (۳۴, ۳۳). علاوه بر فعالیت‌های بدنی miR-1 در بسیاری از ناهنجاری‌های عضلانی (عضلات اسکلتی و قلبی) درگیر است (۳۶, ۳۵)

### نتیجه گیری

یک جلسه تمرین مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود که احتمالاً نشان دهنده فعال سازی فرآیند تکثیر در سلول‌ها عضله EDL باشد که آغازی است بر تجدید ساختار این نوع عضله در پاسخ به تمرین مقاومتی. اما روند تغییر بیان آن در عضله نعلی متفاوت است.

### تقدیر و تشکر

از تمام دوستانی که در انجام این پژوهش کمک کردند صمیمانه تشکر می‌شود و همچنین از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تامین اعتبارات این پژوهش سپاسگزاریم. مجوز این پژوهش با شماره ۱۳۹۰/۹/۱۳-۶۰/۷۹۶۵۰ در کمیته پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تصویب و ثبت شد

که توانایی بالایی برای گرایش به سمت تارهای کند انقباض دارند، اتفاق بیفتد. زیرا برخی پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تمرین مقاومتی موجب افزایش بیان تارهای نوع آهسته‌تر (MHC IIA) و در همان زمان کاهش بیان MHC IIB می‌شود، هرچند میزان MHC I تغییر نشان نداد (۲۹, ۳۰). از طرف دیگر تارهای عضله نعلی درصد بسیار بالایی از فیبرهای کند را دارا می‌باشد، بنابراین توانایی آن‌ها در تغییر و تبدیل تار محدود است احتمالاً عدم تغییر miR-1 در این تارها ناشی از این خصوصیت باشد و بنابراین فرآیند تکثیر در این تارها در اثر تمرین مقاومتی به اندازه تارهای EDL فعال نشده است.

گیرنده‌های نیکوتینی استیل‌کولین در عضلات کند و تند انقباض تحت تاثیر فعالیت‌های مقاومتی قرار می‌گیرند (۳۲, ۳۱). گیرنده‌های استیل‌کولین در پیوندگاه عصبی عضلانی (۳۳) از جمله اهداف miR-1 محسوب می‌شود. miR-1 به وسیله جفت کردن تغییر فعالیت عضلانی با تغییر در عملکرد سیناپسی موجب تنظیم کارکرد سیناپسی می‌شود (۳۳). با توجه به نتایج این پژوهش و پژوهش‌های که اشاره شد به نظر می‌رسد در سطح بیان ژن فعالیت مقاومتی موجب کاهش miR-1 در عضله EDL می‌شود در نتیجه کاهش miR-1 فرصتی است برای افزایش گیرنده‌های استیل‌کولینی (میزان این

### منابع

1. Van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics* 2008;24(4):159-66.
2. Chen JF, Callis TE, Wang DZ. microRNAs and muscle disorders. *Journal of Cell Science* 2008;122(1):13-20.
3. McCarthy JJ. The MyomiR network in skeletal muscle plasticity. *Exerc Sport Sci Rev* 2011;39(3):150-4.
4. Van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell* 2009;17(5):662-73.
5. John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004;2(11):363.
6. Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu QL, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nature Genetics* 2006;38(2):228-33.
7. Greco S, De Simone M, Colussi C, Zaccagnini G, Fasanaro P, Pescatori M, et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. *The FASEB Journal* 2009;23(10):3335-46.
8. Da Costa MP, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2012;93(4):563-72.



9. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart* 2012;98(1):5-10.
10. Baldwin KM, Haddad F. Skeletal muscle plasticity: cellular and molecular responses to altered physical activity paradigms. *American journal of physical medicine & rehabilitation / Association of Academic Physiatrists* 2002;81(11): 40-51.
11. McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *Journal of Applied Physiology* 2007;102(1):306-13.
12. Soci UP, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, et al. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics* 2011;43(11):665-73.
13. Drummond MJ, McCarthy JJ, Fry CS, Esser KA, Rasmussen BB. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295(6): 1333-40.
14. Nielsen S, Scheele C, Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen AR, Pedersen BK, et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. *J Physiol* 2010; 588(20): 4029-37.
15. Davidsen PK, Gallagher IJ, Hartman JW, Tarnopolsky MA, Dela F, Helge JW, et al. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. *Journal of Applied Physiology* 2011;110(2):309-17.
16. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011; 58(2):182-9.
17. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. miRNA in the Regulation of Skeletal Muscle Adaptation to Acute Endurance Exercise in C57Bl/6J Male Mice. *PLoS One* 2009; 4(5): 5610.
18. Keller P, Vollaard NB, Gustafsson T, Gallagher IJ, Sundberg CJ, Rankinen T, et al. A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. *J Appl Physiol*. 2011;110(1):46-59.
19. Potthoff MJ, Olson EN. MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* 2007; 134(23): 4131-40.
20. Adams G. The Molecular Response of Skeletal Muscle to Resistance Training. *Deut Z Sportmed* 2010;61(3):61-7.
21. Lee S, Farrar RP. Resistance training induces muscle-specific changes in muscle mass and function in rat. *J Exercise Physiol on line* 2003;6:80-7.
22. Godfrey J, Kayser B, Gomez G, Bennett J, Jaque S, Sumida K. Interrupted Resistance Training and BMD in Growing Rats. *International Journal of Sports Medicine* 2009; 30(8): 579-84.
23. 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(4):402-8.
24. O'Neill DS, Zheng D, Anderson WK, Dohm GL, Houmard JA. Effect of endurance exercise on myosin heavy chain gene regulation in human skeletal muscle. *Am J Physiol* 1999; 276(2): 414-9.
25. Hameed M, Orrell RW, Cobbold M, Goldspink G, Harridge SDR. Expression of IGF-I splice variants in young and old human skeletal muscle after high resistance exercise. *The Journal of Physiology* 2002;547(1):247-54.
26. Charge SBP. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiological Reviews*. 2004; 84(1): 209-38.
27. Chen JF, Tao YZ, Li JA, Deng ZL, Yan Z, Xiao XA, et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. *Journal of Cell Biology* 2010;190(5):867-79.
28. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001;91(2):534-51.
29. Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 1993; 74(2):911-5.
30. Campos G, Luecke T, Wendeln H, Toma K, Hagerman F, Murray T, et al. Muscular adaptations in response to three different resistance-training regimens: specificity of repetition maximum training zones. *European*

Journal of Applied Physiology 2002; 88(1-2):50-60.

31. Desaulniers P, Lavoie PA, Gardiner PF. Endurance training increases acetylcholine receptor quantity at neuromuscular junctions of adult rat skeletal muscle. *Neuroreport*.1998; 9(16):3549-52.
32. Deschenes MR, Judelson DA, Kraemer WJ, Meskaitis VJ, Volek JS, Nindl BC, et al. Effects of resistance training on neuromuscular junction morphology. *Muscle Nerve* 2000; 23(10):1576-81.
33. Simon DJ, Madison JM, Conery AL, Thompson-Peer KL, Soskis M, Ruvkun GB, et al. The microRNA miR-1 regulates a MEF-2-dependent retrograde signal at neuromuscular junctions. *Cell* 2008; 133(5):903-15.
34. Naya FJ, Wu C, Richardson JA, Overbeek P, Olson EN. Transcriptional activity of MEF2 during mouse embryogenesis monitored with a MEF2-dependent transgene. *Development*.1999; 126(10):2045-52.
35. Rau F, Freyermuth F, Fugier C, Villemin JP, Fischer MC, Jost B, et al. Misregulation of miR-1 processing is associated with heart defects in myotonic dystrophy. *Nat Struct Mol Biol* 2011; 18(7):840-5.
36. Perbellini R, Greco S, Sarra-Ferraris G, Cardani R, Capogrossi MC, Meola G, et al. Dysregulation and cellular mislocalization of specific miRNAs in myotonic dystrophy type 1. *Neuromuscular Disord* 2011; 21(2):81-8.

# The study of timing series response of microRNA-1 expression to resistance exercise in slow and fast muscles of Wistar male rats

Fathi M<sup>1</sup>, Gharakanloo R<sup>\*2</sup>, Solimani M<sup>2</sup>, Rajabi H<sup>3</sup>, Rezai R<sup>4</sup>

1- Lorestan University

2- Tarbiat Modares University

3- Kharazmi University

4- Shahid Chamran University

Received: 12/01/2014

Revised: 21/01/2014

Accepted: 29/01/2014

## \* Correspondence:

Reza Gharakanlou, Physical Education Department, Humanity Faculty, Tarbiat Modares University of Tehran, Iran.

## Email:

ghara\_re@modares.ac.ir

## Abstract

**Introduction and purpose:** microRNAs (miRs) are involved in cellular different processes and inhibit gene expression. One of these miRs is microRNA-1 (miR-1) which is special in muscle-tissue and the rate of it decreases with muscular hypertrophy. Regarded to difference of slow and fast muscles to resistance exercise, the purpose of this study was to evaluate the effect resistance exercise (RE) on miR-1 expression in fast and slow skeletal muscles of Wistar male rats.

**Materials and Methods:** The subjects of this Fundamental study were 15 rats that were randomly assigned to RE (n=10) or control groups (n=5); the RE group performed one session RE (climbing a 1-meter-long ladder with 4 set, 5 rep), then 3 and 6 hours after RE with control group were anaesthetized and sacrificed, the soleus and Extensor digitorum longus (EDL) muscles -slow and fast twitch skeletal muscle respectively- were removed. The miR-1 expression rate was determined by Real time RT-PCR method. To analysis of dates the one sample t test and independent t test were used.

**Results:** The results showed that in response to RE, the expression of EDL miR-1 was significantly decreased 99 and 73 percent at 3 (P<.0001) and 6 hours (P<.0001) after exercise respectively. While the expression of soleus muscle miR-1 decreased by 40 percent (P<.323) and then increased 224 percent (P<.196) at 3 and 6 hours after RE respectively but these changes were not significant.

**Discussion and Conclusion:** one session RE induce decrease in miR-1 in EDL muscle, it is probably a sign of proliferation in EDL muscle.

**Key words:** Resistance exercise, EDL muscle, Soleus muscle, microRNA-1