

The effect of endurance activity on miR-499 and sox6 genes expression in fast and slow twitch skeletal muscles

Fathi M., PhD¹

1. Assistant Professor in Physical Education Department, Humanity Faculty, Lorestan University, Khorramabad, Iran, (Corresponding Author), Tel: +98-66-33120097, Fathi.m@lu.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Endurance activity can affect function and also factors involved in skeletal muscle transcription. The aim of this study was to investigate the effects of an endurance activity program on the Sox6 gene and miR-499 expression in fast and slow twitch skeletal muscles in male Wistar rats.

Materials and Methods: we kept 14 rats under controlled conditions and divided them randomly into control and experimental groups. The experimental group performed an endurance activity program for 14 weeks, (6 days/wk, 1 hour/day) by using a treadmill. 48 hours after the end of the last session they were anesthetized and sacrificed. The soleus and extensor digitorum longus muscles were removed. Real time RT-PCR method was used to determine the expression levels of miR-499 and Sox6 genes. Data analysis was performed by t-test.

Results: The results showed, that sox6 gene expression in EDL muscles increased significantly in the experimental group compared to that in the control group ($p < 0.004$). But, in the experimental group sox6 gene expression in soleus muscle decreased significantly compared to the control group ($p < 0.002$). Expression of miR-499 in the soleus muscle increased significantly due to endurance activity ($p < 0.015$).

Conclusion: Considering different changes of sox6 and miR-499 expression in the skeletal muscles after the same endurance activity, it seems that these two factors create the conditions in the skeletal muscle tissue, which despite the long-term endurance activities these muscles can maintain appropriate ratios of fast and slow-twitch fibers

Key words: sox6 gene, Endurance activity, miR-499

Received: Jan 30, 2016 **Accepted:** Jan 9, 2017

تأثیر فعالیت استقامتی بر بیان miR-499 و ژن Sox6 عضلات اسکلتی تند و کندانقباض

محمد فتحی^۱

۱. استادیار فیزیولوژی ورزش، گروه تربیت بدنی دانشکده علوم انسانی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۶۶-۳۳۱۲۰۰۹۷ Fathi.m@lu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: فعالیت استقامتی بر عملکرد و همچنین عوامل درگیر در رونویسی عضلات اسکلتی درگیر تأثیر می‌گذارد. هدف این پژوهش بررسی تأثیر یک دوره فعالیت استقامتی بر بیان miR-499 و ژن Sox6 در عضلات اسکلتی تند و کندانقباض رت‌های نر نژاد ویستار است.

روش بررسی: بدین منظور ۱۴ رت تحت شرایط کنترل شده نگهداری و سپس به صورت تصادفی به دو گروه کنترل و تجربی تقسیم شدند. گروه تجربی یک برنامه (۱۴ هفته‌ای، ۶ روز در هفته، هر روز یک ساعت) استقامتی را روی تردمیل اجرا کرد. ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی بی‌هوش و تشریح شدند، عضله نعلی و عضله Extensor Digitorum Longus خارج و با استفاده از روش Real time-PCR میزان بیان miR-499 و ژن Sox6 آنها اندازه‌گیری و در پایان با استفاده از آزمون آماری t اطلاعات به دست آمده ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان ژن Sox6 در عضله EDL گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p=0/004$) افزایش می‌یابد، برخلاف آن نتایج میزان بیان ژن Sox6 در عضله نعلی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری ($p=0/002$) کاهش یافت. بیان miR-499 در عضله نعلی به طور معنی‌داری ($p=0/015$) در اثر فعالیت استقامتی افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به تغییر متفاوت Sox6 و miR-499 عضلات اسکلتی به فعالیت استقامتی یکسان، به نظر می‌رسد این دو فاکتور شرایطی را در بافت عضله اسکلتی ایجاد می‌کند که این عضلات علی‌رغم فعالیت‌های استقامتی بلندمدت بتوانند نسبت‌های مناسبی از تارهای کند و تندانقباض را حفظ کنند.

کلمات کلیدی: ژن Sox6، فعالیت استقامتی، miR-499

وصول مقاله: ۹۴/۱۱/۱۰ اصلاحیه نهایی: ۹۵/۱۰/۱۵ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۰

مقدمه

فعالیت بدنی به عنوان یکی از راهکارهای مطلوب حفظ و ارتقاء سلامتی همواره مورد توجه است (۱). تاثیر فعالیت‌های مقاومتی و استقامتی در بهبود وضعیت عملکرد عضلات اسکلتی توسط پژوهش‌های متعدد آشکار شده است (۲ و ۳). به نظر می‌رسد این تغییراتی در ساختار و عملکرد عضله اسکلتی با تغییرات بیان ژن همراه است (۴ و ۵). تغییرات ایجاد شده در عملکرد و بافت عضله ارتباط تنگاتنگی با نوع فعالیت بدنی دارند (۶ و ۷). در حالیکه فعالیت‌های مقاومتی موجب هایپرتروفی بافت عضله می‌شود و طبیعتاً مسیرهای سیگنالینگ مخصوص به خود را فعال می‌کند (۸ و ۹) فعالیت‌های استقامتی موجب تغییرات عملکردی و بافتی منحصر به خود می‌شود (۱۰ و ۱۱) فاکتورهای مرتبط با تغییرات ژنی زیادی در این فرآیندها درگیرند (۱۲ و ۱۳) به طوری که تاثیر این تغییرات در سطح تغییر نوع تار (fiber type transition) نیز مشخص می‌شود (۱۴). از جمله فاکتورهای ژنی اثرگذار بر تغییر نوع بافت‌ها می‌توان به miR-499 و ژن *sox6* اشاره کرد (۱۶ و ۱۵). پژوهش‌ها نشان داده‌اند حذف ژن *sox6* موجب تاخیر در رشد و مرگ موش‌ها در ۲ هفته بعد از تولد می‌شود که شکل عضلات در آنها غیرطبیعی گزارش شده است (۱۷). این ژن در رشد و تعادل دقیق بیان ایزوفرم‌های مختلف و همچنین تمایز عضلات درگیر است (۱۸). همچنین مشخص شده است که SOX6 سرکوب‌کننده رونویسی بیان زنجیره سنگین میوزین نوع بتا β myosin-heavy-chain (βMHC) و در نتیجه تارهای کندانقباض است (۱۹). علاوه بر تاثیر فاکتور رونویسی SOX6 بر عضلات اسکلتی، در سال‌های اخیر مشخص شده است که RNAهای غیرکدی که آنها را microRNAها (miRs) می‌نامند (با ۲۲ نوکلئوتید طول) بر روند بیان ژن و در نتیجه شکل‌گیری (۲۰) و سازگاری بافت عضله تاثیر اساسی دارند (۲۱) و از این طریق در تنظیم بیان ژن در سطح پس‌رونویسی

نقش دارند (۲۳ و ۲۲) این عناصر در بسیاری از دیگر فرآیندهای سلولی درگیرند (۲۳). از جمله این myomiR می‌توان به miR-499 اشاره کرد که موجب مهار و سرکوب بیان ژن در سطح پس‌رونویسی می‌شود (۲۳). یکی از اهداف miR-499 ژن *sox6* است که افزایش میزان miR-499 موجب کاهش SOX6 می‌شود و از این طریق از شکل‌گیری تارهای تند انقباض جلوگیری می‌کند و زمینه برای شکل‌گیری تارهای کندانقباض فراهم می‌شود (۲۴). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که فعالیت بدنی از جمله فعالیت‌های استقامتی موجب شکل‌گیری تارهای کندانقباض در عضلات می‌شود (۲۴)، اما مکانیزم‌های این تغییر در شکل‌گیری هنوز مورد توجه و پژوهش است. آیا فعالیت استقامتی تغییری در بیان این عناصر که بر فرآیندهای عضله اسکلتی تاثیر دارند ایجاد می‌کند؟ آیا تغییر ایجاد شده در SOX6 در عضله اسکلتی تندانقباض همانند عضله کندانقباض است؟ این سؤالاتی است که نیاز به پاسخ دقیق و علمی دارند، بنابراین هدف این پژوهش بررسی تاثیر فعالیت بدنی استقامتی بر بیان ژن *sox6* در عضلات تند و کندانقباض و miR-499 در عضله کندانقباض است.

روش بررسی

مطابق با پژوهش‌های مشابه (۲۵) در این مطالعه تجربی ۲۰ سر رت صحرایی نر نژاد ویستار با ۵ هفته سن (۲۰±۱۱۳ گرم) به عنوان آزمودنی در نظر گرفته شد، رت‌ها از انستیتو پاستور تهیه شدند. برای همه آنها شرایط مناسب آزمایشگاهی (دسترسی آزاد به آب و غذا مخصوص رت، چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت، میانگین دما ۲۲±۳ درجه سانتی‌گراد) به صورت یکسان در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس در سال ۱۳۹۲ تا رسیدن به سن بلوغ فراهم شد. در این مدت رت‌ها در ۴ قفس یکسان نگهداری شدند. در پایان این مرحله، میانگین و انحراف استاندارد وزن آنها عبارت بود از ۲۴±۲۳۱ گرم. سپس یک دوره

آشناسازی (۱۰ روزه-۵ جلسه) با فعالیت استقامتی (دویدن روی تردمیل) آغاز شد. در پایان جلسات آشناسازی، به صورت تصادفی به ۲ گروه (۱۰ سر به عنوان گروه شاهد و ۱۰ سر دیگر به عنوان گروه تجربی) تقسیم شدند. از گروه تجربی ۳ سر نتوانست پروتکل را به پایان برسانند، از آنجایی که در روش Real time (نسبی) باید تعداد گروه شاهد و تجربی مساوی باشند، با حذف سه سر از گروه کنترل (به طور تصادفی) تعداد نهایی آن‌ها به ۱۴ سر (۷ سر شاهد و ۷ سر تجربی) کاهش یافت.

پروتکل فعالیت استقامتی:

با استفاده از منابع پیشین یک پروتکل فعالیت استقامتی برای رت‌ها طراحی شد (۲۷ و ۲۶). پروتکل (۱۴ هفته، هفته‌ای ۶ روز) گروه تجربی عبارت بود از؛ دویدن روی تردمیل که سرعت و شیب و زمان آن قابل برنامه‌ریزی بود. هر جلسه با یک بخش ۵ دقیقه‌ای با سرعت ۱۲ متر در دقیقه برای گرم کردن شروع می‌شد. در جلسه اول، بخش اصلی پروتکل ۱۲ دقیقه بود. به طور هفتگی مدت زمان بخش اصلی پروتکل افزایش یافت؛ بدین صورت (در هفته ۱-۳ هر روز ۲ دقیقه به مدت زمان اجرای بخش اصلی پروتکل اضافه می‌شد) به طوری که در پایان روز ۲۳ مدت بخش اصلی پروتکل به ۵۰ دقیقه رسید که با احتساب ۵ دقیقه گرم کردن و ۵ دقیقه سرد کردن، مدت زمان کلی ۶۰ دقیقه بود. شدت تمرین با سرعت ۲۰ متر در دقیقه شروع شد. سپس هر هفته ۲ متر بر دقیقه به سرعت اضافه شد به طوری که در پایان هفته ششم سرعت به ۳۰ متر در دقیقه رسید. در نهایت در طی هفته‌های ۷ تا ۱۰ به تدریج ۵ درجه شیب (ابتدای هر هفته تقریباً ۱/۲ درجه شیب) نیز اضافه شد. این پروتکل [۶۰ دقیقه دویدن (شامل ۵ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۲ متر در دقیقه، ۵۰ دقیقه دویدن با سرعت ۳۰ متر در دقیقه، با شیب ۵ درجه به عنوان بخش اصلی پروتکل و در نهایت ۵ دقیقه دویدن با سرعت ۹ متر در دقیقه به عنوان بخش سرد کردن)] تا پایان هفته ۱۴ حفظ شد. پروتکل بین

ساعات ۵ تا ۷ بعد از ظهر هر روز اعمال می‌شد. در نهایت ۴۸ ساعت پس از پایان آخرین جلسه تمرینی رت‌ها با ترکیبی از کتامین (۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) و زایلازین (۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی کامل (به طوری که به تحریک اعمال شده پاسخ ندهد)، عضلات نعلی و EDL تحت شرایط استریل خارج شد. بافت‌های مورد نظر بلافاصله در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برجسب متناسب با بافت، رت و ساعت تشریح جاسازی و وارد تانک نیتروژن شدند. بعد از اتمام تشریح و تا شروع هموژن بافت‌ها، همه آن‌ها در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. با استفاده از هاون و نیتروژن مایع بافت‌ها هموژن و در میکروتیوب‌هایی با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر با برجسب مناسب نگهداری شدند.

استخراج RNA از بافت:

برای استخراج RNA از بافت‌های هموژن شده، به ۱۰۰ میلی‌گرم بافت ۱ میلی‌لیتر تریازول (Invitrogen) اضافه و پس از مخلوط کردن کامل (پیچاژ کردن) به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری (انکوبه) شد، سپس ۰/۲ میلی‌لیتر به آن کلروفرم سرد اضافه و پس از پیچاژ (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 در دقیقه سانتریفیوژ (شرکت eppendorff) شدند سپس مایع رویی به یک میکروتیوب RNAase free انتقال داده شد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر 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 ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه مجدداً سانتریفیوژ شدند. مایع رویی با دقت خارج و ۱ میلی‌لیتر اتانول خالص سرد به آن اضافه شد و بعد از تکان دادن مختصر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه با ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و در ادامه مایع رویی به دقت تخلیه و ۱۰ دقیقه فرصت داده شد تا باقی‌مانده اتانول تبخیر شود، بعد از این مرحله ۵۰

حجم نهایی با استفاده از کیت تاکارا معادل ۲۰ میکرولیتری تنظیم گردید. مقادیر مورد استفاده شامل مسترمیکس PCR ۱۰ میکرولیتر، برای هر پرایمر ۲ میکرولیتر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۲ میکرولیتر cDNA (با غلظت ۳۰ نانو گرم) بوده و با آب مقطر PCR grade به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید. جهت انجام qPCR برای miR-499 مقادیر فوق به صورت ذیل تنظیم گردید. حجم نهایی با استفاده از کیت شرکت Exiqon معادل ۲۰ میکرولیتری تنظیم گردید. مقادیر مورد استفاده شامل مسترمیکس PCR ۱۰ میکرولیتر، هر پرایمر به میزان ۲ میکرولیتر (با غلظت ۲۰ پیکومول)، cDNA ۲ میکرولیتر (با غلظت ۳۰ نانو گرم) بوده و با آب مقطر PCR grade به حجم ۲۰ میکرولیتر رسید.

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) و (*gapdh*)، کنترل مثبت (گروه کنترل) و miR-499 و ژن *sox6* 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. بعد از انتقال اطلاعات به نرم‌افزار Excel طبق فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ میزان بیان miR-499 با توالی نوکلئوتیدی UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU و ژن *sox6* محاسبه شد (۲۸). مشخصات پرایمرهای استفاده شده برای miR-499 و U6 که از شرکت Exiqon تهیه شد به ترتیب عبارت بودند از- hsa-miR-499-204102, 5p, LNATM PCR primer set, UniRTmiRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR, microRNA primer set, U6 snRNA (hsa, mmu, 203907 و 200 rxns rno) PCR primer set, UniRT. miRCURY

میکرولیتر آب تزریقی به هر نمونه اضافه و چند بار به آرامی پیپتاژ شد. در پایان غلظت و نسبت جذبی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت eppendorff) ارزیابی شد که نسبت جذبی ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۶ تا ۱/۸ بود. سنتز cDNA:

برای رونویسی RNA به cDNA ژن *sox6* از کیت شرکت Thermo Scientific با Cat # K1621 و برای رونویسی RNA به cDNA miR-499 از کیت شرکت Exiqon با cat # 203300 استفاده شد و تمام مراحل مطابق دستورالعمل شرکت‌های سازنده انجام شد. ترموسایکلر مورد استفاده در این مرحله متعلق به شرکت اپندورف بود.

ارزیابی بیان miR-499 و ژن *sox6*:

قبل از ارزیابی نهایی بیان ژن طبق دستورالعمل تکنیک Real Time PCR نیاز بود که میزان کارایی (Efficiency) ژن رفرنس و ژن هدف (*sox6*) بررسی شود، میزان کارایی برای این دو ژن در بالاترین میزان خود (۱) بود. قابل ذکر است پرایمرهای (ژن *sox6* و رفرنس آن) پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزار الیگو نسخه ۷ طراحی و همچنین با استفاده از سایت <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> بلاست شدند. اما پرایمر miR-499 و ژن رفرنس آن به صورت آماده تهیه شد. برای ارزیابی بیان miR-499 و ژن *sox6* از تکنیک Real Time PCR و دستگاه شرکت Applied Biosystem SYBR Green master استفاده شد. mix استفاده شده در این مرحله برای miR-499 متعلق به شرکت Exiqon با Cat # 203450 و برای ژن *sox6* متعلق به شرکت تاکارا با Cat # RR820L بود. میزان بیان miR-499 و ژن *sox6* با استفاده از روش نسبی ارزیابی شد.

مشخصات ژن Sox6 و رفرنس آن یعنی *gapdh* در جدول ۱ آمده است.

LNA™ Universal RT microRNA PCR, reference gene primer set. NCBI Symbol و U6snRNA, NCBI Accesion: x59362

جدول ۱. مشخصات پرایمر Sox6 و رفرنس آن (*gapdh*)

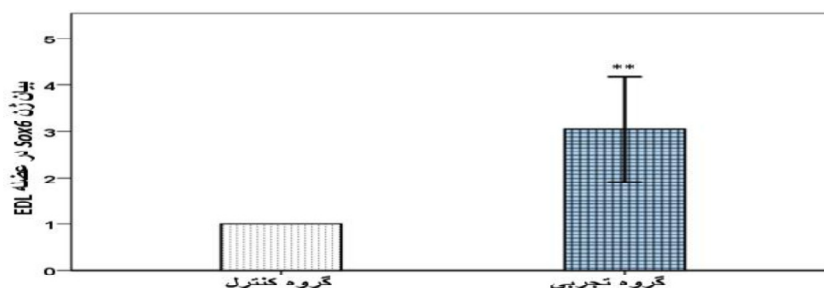
name	Sequence 5-3	NCBI Reference Sequence	Product size
<i>gapdh</i>	F AACCCATCACCATCTTCCAG	NM_017008.4	74
	R CACGACATACTCAGCACCAG		
<i>Sox6</i>	F GCTCACGAAGGCAGGAGATG	NM_001024751.1	106
	R GCCATAGTAATAGCACCAGGATACA		

نتایج

نتایج نشان داد که بیان ژن *sox6* در عضله EDL گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($p=0/004$) افزایش می‌یابد (نمودار ۱). برخلاف آن دیگر نتایج نشان داد که میزان بیان ژن *sox6* در عضله نعلی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($p=0/002$) کاهش یافت (نمودار ۲). همچنین نتایج آزمون t ($t=3/38$) نشان داد که بیان *miR-499* در عضله نعلی به طور معنی داری ($p=0/015$) افزایش می‌یابد (نمودار ۳).

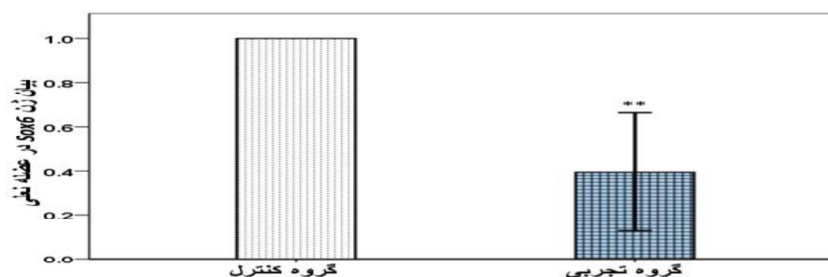
تجزیه و تحلیل داده‌ها:

داده‌های به دست آمده از دستگاه Real Time PCR به صورت CT- میانگین CT برای هر نمونه- بودند (۳۱-۲۹)، با استفاده از نرم‌افزار Excel به $\Delta\Delta ct$ تبدیل شدند و سپس با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ اعداد نهایی به دست آمد (۳۲). با انتقال این اعداد به نرم‌افزار SPSS، ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilks ارزیابی شد و مشخص شد که داده‌ها دارای توزیع طبیعی هستند. بعد از تعیین نرمال بودن، برای تعیین اختلاف میانگین‌ها از آزمون t استفاده شد.



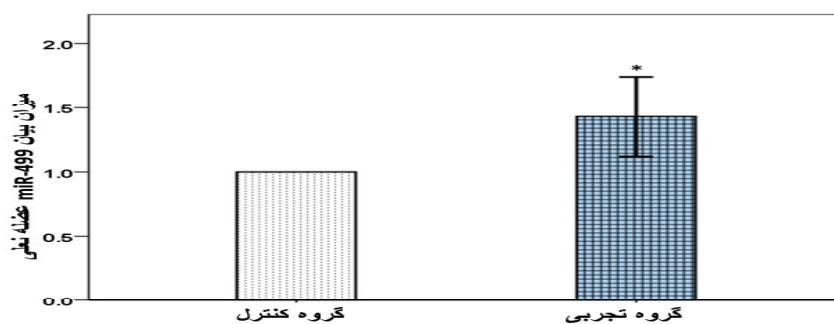
نمودار ۱. میزان بیان ژن *sox6* در عضله EDL گروه تجربی نسبت به گروه کنترل.

** تفاوت معنی دار در سطح $p < 0/01$



نمودار ۲. میزان بیان ژن *sox6* در عضله EDL گروه تجربی نسبت به گروه کنترل.

*** تفاوت معنی دار در سطح $p < 0.01$



نمودار ۳. میزان بیان miR-499 در عضله نعلی گروه تجربی نسبت به گروه کنترل.

** تفاوت معنی دار در سطح $p < 0.05$

سلول‌های عضلانی، قلبی و عملکرد طبیعی فیزیولوژی بافت عضلات (۳۶) نقش دارد. بیشتر مواردی که ذکر شد با فعالیت‌های استقامتی در ارتباطند. به نظر می‌رسد فعالیت‌های استقامتی با تاثیر بر بیان ژن *sox6* بخشی از سازگاری‌های ایجاد شده را ایجاد می‌کند. برخی پژوهش‌های دیگر به نقش دوگانه *SOX6* اشاره دارند به این صورت که هم فعال‌کننده است و هم سرکوب‌گر (۳۸ و ۳۷) و رونویسی آن در تارهای کندانقباض سرکوب می‌شود این در صورتی است که پروتئین *SOX6* محدود به عضلات تندانقباض باقی می‌ماند (۱۵). به نظر می‌رسد افزایش بیان این ژن در عضله EDL تلاشی باشد برای حفظ تارهای کندانقباض در برابر تغییری که در اثر فعالیت استقامتی در عضلات اسکلتی رخ می‌دهد یعنی تغییر در ایزوفرم آنها که به سمت تارهای کندانقباض تمایل پیدا می‌کند (۱۴) این موضوع توسط پژوهش‌های دیگر تایید شده است و نشان داده‌اند که در عضلات اسکلتی که ژن *sox6* در آنها سرکوب شده بود، بیان β MHC ۲۵ برابر افزایش یافت (۱۷) همچنین در عضلات بالغ این فاکتور رونویسی برای حفظ میوفیبریل‌ها ضروری است و کاهش آن موجب تغییر بیان در عضلات تندانقباض و گرایش به سمت تارهای کندانقباض می‌شود (۳۹). اما در مورد اختلاف در تاثیر فعالیت بدنی بر سطح بیان این فاکتور رونویسی باید اشاره داشت که میزان *SOX6*

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که فعالیت استقامتی تاثیر متفاوتی بر بیان ژن *sox6* عضلات دارد، در حالیکه موجب افزایش معنی‌دار بیان آن در عضله EDL می‌شود بیان آن را در عضله نعلی به طور معنی‌داری کاهش می‌دهد، اما میزان بیان miR-499 را در عضله نعلی به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد.

لازم به ذکر است با توجه به جستجوهای ما هنوز پژوهشی تاثیر فعالیت‌های استقامتی را بر بیان این ژن ارزیابی نکرده است. بنابراین نمی‌توان نتیجه این مطالعه را با پژوهش‌های دیگر (با رویکرد فعالیت بدنی) مقایسه کرد. در نتیجه بحث و بررسی این پژوهش با توجه به نتایج مطالعاتی صورت می‌گیرد که بر شناسایی و عملکرد این ژن متمرکز شده‌اند. خانواده *Sox* گروه مهمی از فاکتورهای تنظیمی را کد می‌کنند که در رشد و تمایز سلول‌ها نقش دارند (۳۳). بنابراین این ژن می‌تواند بر پاسخ سلول‌ها به محرک‌ها از جمله فعالیت بدنی تاثیر داشته باشد، ضمن اینکه *SOX6* یک سرکوب‌کننده رونویسی است که بیان β MHC در عضله کندانقباض را سرکوب می‌کند (۱۹) و موجب القای بیان α MHC می‌شود (۳۴). *SOX6* در تعادل دقیق بیان ایزوفرم‌های مختلف (۱۸)، رشد سیستم عصبی (۳۵)، حفظ

mRNA) دارای ۱ جایگاه اتصال برای miR-499 است (۱۹). از دیگر ژن‌های هدف miR-499 می‌توان به ژن T3 receptor associated protein-1 (*thrap1*) اشاره کرد که تعدیل‌کننده سیگنال هورمون تیروئید می‌باشد و در تنظیم پاسخ β MHC و پاسخ برنامه ژن میوفیبریل به هایپرتیروئیدیسم نقش کلیدی بازی می‌کند (۲۴). این فاکتور سرکوب‌کننده رونویسی β MHC است (۴۱ و ۴۰). افزایش هورمون تیروئید باعث افزایش بیان α MHC و کاهش β MHC در عضله قلب می‌شود (۴۲). افزایش بیان miR-499 با کاهش بیان ژن *sox6* منطبق بود. هرچند نباید این موضوع را به پروتئین این ژن تعمیم داد. تأثیر miR-499 بر بیان ژن *sox6* با اندازه‌گیری میزان mRNA و پروتئین آنها بهتر مشخص می‌شود زیرا miR-499 حدفاصل بیان ژن و ترجمه (در سطح پروتئین) آن است. این تحقیق میزان بیان ژن و پروتئین اهداف miR-499 را اندازه‌گیری نکرد. لذا انجام پژوهشی که میزان mRNA و پروتئین ژن‌های موردنظر در اثر فعالیت‌های استقامتی را در بطن چپ اندازه‌گیری کند توصیه می‌شود، زیرا دورنمای بهتری را از این موضوع ارائه می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به تأثیر SOX6 و miR-499 بر نوع تارعضله اسکلتی و پاسخ متفاوت عضلات تند و کندانقباض به فعالیت استقامتی یکسان، به نظر می‌رسد این دو فاکتور شرایطی را در بافت عضله اسکلتی ایجاد می‌کند که این عضلات علی‌رغم فعالیت‌های استقامتی بلندمدت بتوانند نسبت‌های مناسبی از تارهای کند و تند انقباض را حفظ کنند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه لرستان که منابع مالی این پژوهش را تأمین کرد تشکر و قدردانی می‌شود.

عضلات تندانقباض نسبت به تارهای کندانقباض تقریباً ۳ برابر بالاتر است (۳۹). و شاید بخشی از این تفاوت به این سطح پایه برمی‌گردد. نکته دیگر اینکه عضله نعلی کندترین عضله بدن است و کاهش این فاکتور در اثر فعالیت استقامتی فرصتی باشد برای کسب تارهای تندانقباض و افزایش سرعت این عضله زیرا در تایید این توجیه مشخص شده است که حذف ژن *sox6* در عضله درشت‌نی و EDL (عضلات تندانقباض) موجب می‌شود که شکل ظاهری این تارها مشابه تارهای کندانقباض شود؛ مانند قرمزتر شدن رنگ تارها و کمتر شدن وزن عضله نسبت به گروه کنترل (۳۹). همچنین بررسی‌های بافتی نشان داد که توزیع سطح مقطع این عضلات کاهش یافته و همانند تارهای کندانقباض شده است. اما تعداد تارها در این عضلات همانند گروه کنترل است که نشان می‌دهد کاهش توده تار ناشی از کاهش اندازه تارچه‌هاست. سرعت کوتاه‌شدن بیشینه در عضله EDL ناک‌اوت‌شده برای ژن *sox6* (نه در نعلی) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافته بود. که با عملکرد عضله در ارتباط است زیرا ارزیابی استقامت عضله با استفاده از آزمون "زمان رسیدن به خستگی" نشان داد که زمان رسیدن به خستگی در عضله EDL و نعلی ناک‌اوت شده برای *sox6* به ترتیب ۵۰ و ۱۰۰ درصد بیشتر از عضلات گروه کنترل است (۳۹).

بین ژن *sox6* و miR-499 ارتباط تنگاتنگی وجود دارد. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ۴ جایگاه اتصال برای miR-499 بر روی ناحیه غیرترجمه‌ای 3' *sox6* mRNA قرار دارد (۱۹) به این معنی که بیان این توسط ژن توسط miR-499 مهار می‌شود، miR-499 دارای اهداف ژنی دیگری می‌باشد که عبارتند از ژن purine-rich element binding protein β (*pur\beta*) و T3 receptor associated protein-1 (*Thrap1*) (۲۴). فاکتور Pur β سرکوب‌کننده بیان α MHC است. ناحیه غیرترجمه‌ای 3'-untranslated region (*3pur\beta*)

References

1. Fathi M, Rahmani Nia F, Moradpoorian MR, Asgari M, Rezaee R. The relationship between maximum aerobic power and coronary heart disease risk factors. *World Journal of Sport Sciences* 2009;2: 01-6.
2. Hawley JA. Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29:218-22.
3. Parnow A, Gharakhanlou R, Gorginkaraji Z, Rajabi S, Eslami R, Hedayati M, et al. Effects of endurance and resistance training on calcitonin gene-related peptide and acetylcholine receptor at slow and fast twitch skeletal muscles and sciatic nerve in male wistar rats. *International Journal of Peptides* 2012; 96: 26-51.
4. Fathi M, Gharakhanlou R, Solimani M, Rajabi H, Rezaei R. The effect of resistance exercise on myoD expression in slow and fast muscles of wistar rats. *Journal of Sport Biosciences* 2015;6:435-49(Persian).
5. Fathi M, Gharakhanluo 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. *Journal of Sport in Biomotor Sciences* 2013;9:5-15(Persian).
6. Fry AC. The role of resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. *Sports Medicine* 2004;34:663-79.
7. Diaz-Herrera P, Torres A, Morcuende JA, Garcia-Castellano JM, Calbet JA, Sarrat R. Effect of endurance running on cardiac and skeletal muscle in rats. *Histology and Histopathology* 2001;16:29-35.
8. Philp A, Hamilton DL, Baar K. Signals mediating skeletal muscle remodeling by resistance exercise: PI3-kinase independent activation of mTORC1. *J Appl Physiol* 2011;110:561-8.
9. Adams GR, Hather BM, Baldwin KM, Dudley GA. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. *J Appl Physiol* 1993;74:911-5.
10. Stannard SR, Buckley AJ, Edge JA, Thompson MW. Adaptations to skeletal muscle with endurance exercise training in the acutely fed versus overnight-fasted state. *Journal of Science and Medicine in Sport / Sports Medicine Australia* 2010;13:465-9.
11. Rose AJ, Frosig C, Kiens B, Wojtaszewski JFP, Richter EA. Effect of endurance exercise training on Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans. *The Journal of Physiology* 2007;583:785-95.
12. Liu D, Sartor MA, Nader GA, Gutmann L, Treutelaar MK, Pistilli EE, et al. Skeletal muscle gene expression in response to resistance exercise: sex specific regulation. *BMC Genomics* 2010;11:659.
13. Ahtiainen JP, Hulmi JJ, Kraemer WJ, Lehti M, Nyman K, Selanne H, et al. Heavy resistance exercise training and skeletal muscle androgen receptor expression in younger and older men. *Steroids* 2011;76:183-92.
14. Pette D, Staron RS. Myosin isoforms, muscle fiber types, and transitions. *Microscopy Research and Technique* 2000;50:500-9.
15. Wang X, Ono Y, Tan SC, Chai RJ, Parkin C, Ingham PW. Prdm1a and miR-499 act sequentially to restrict Sox6 activity to the fast-twitch muscle lineage in the zebrafish embryo. *Development* 2011;4399-4404
16. Hagiwara N, Yeh M, Liu A. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. *Developmental Dynamics* 2007;236:2062-76.

17. Hagiwara N, Ma B, Ly A. Slow and fast fiber isoform gene expression is systematically altered in skeletal muscle of the Sox6 mutant,p100H. *Developmental Dynamics* 2005;234:301-11.
18. Sluijter JP, van Mil A, van Vliet P, Metz CH, Liu J, Doevendans PA, et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010;30:859-68.
19. 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;316:575-9.
20. Williams AH, Liu N, van Rooij E, Olson EN. MicroRNA control of muscle development and disease. *Current Opinion in Cell Biology* 2009;21:461-9.
21. 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;39:219-26.
22. Callis TE, Wang DZ. Taking microRNAs to heart. *Trends in Molecular Medicine* 2008;14:254-60.
23. van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics* 2008;24:159-66.
24. 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;17:662-73.
25. 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;43:665-73.
26. 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;279:2994-3002.
27. 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 Sciences* 2010;86:39-44.
28. 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;25:402-8.
29. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 2006;7:85.
30. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39:75-85.
31. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008;3:1101-8.
32. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:45.
33. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet* 2000;16:182-7.
34. Rohini A, Agrawal N, Koyani CN, Singh R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research* 2010;61:269-80.
35. Connor F, Wright E, Denny P, Koopman P, Ashworth A. The Sry-related HMG box-containing gene Sox6 is expressed in the adult testis and developing nervous system of the mouse. *Nucleic Acids Res* 1995;23:3365-72.

36. Hagiwara N, Klewer SE, Samson RA, Erickson DT, Lyon MF, Brilliant MH. Sox6 is a candidate gene for p100H myopathy, heart block, and sudden neonatal death. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:4180-5.
37. Lefebvre V. Toward understanding the functions of the two highly related Sox5 and Sox6 genes. *J Bone Miner Metab* 2002;20:121-30.
38. Lefebvre V, Li P, de Crombrughe B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 1998;17:5718-33.
39. Quiat D, Voelker KA, Pei J, Grishin NV, Grange RW, Bassel-Duby R, et al. Concerted regulation of myofiber-specific gene expression and muscle performance by the transcriptional repressor Sox6. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108:10196-201.
40. Morkin E. Control of cardiac myosin heavy chain gene expression. *Microscopy Research and Technique*. 2000;50:522-31.
41. Christensen TH, Prentice H, Gahlmann R, Kedes L. Regulation of the human cardiac/slow-twitch troponin C gene by multiple, cooperative, cell-type-specific, and MyoD-responsive elements. *Mol Cell Biol* 1993;13:6752-65.
42. Gustafson TA, Markham BE, Morkin E. Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. *Circ Res* 1986;59:194-201.