



اثر بدون بار کردن مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ عضلات نعلی و کف‌پایی موش‌های صحرائی ویستار

عبدالرضا کاظمی* ۲۰۱

۱- دانشیار- گروه علوم ورزشی- دانشکده ادبیات و علوم انسانی- دانشگاه ولی عصر (عج)- رفسنجان- ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم اعصاب- پژوهشکده نوروفارماکولوژی- دانشگاه علوم پزشکی کرمان- کرمان- ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۱۱

چکیده

مقدمه: کیناز شبه Ste20 پستانداران (*The mammalian Ste20-like kinase*) با فعال کردن لیگاز مسیر یوبی کوئیتینی آتروژین ۱ در آتروفی عصبی درگیر می‌باشد. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی بیان mRNA ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ و مقایسه آن‌ها در عضلات نعلی و کف پایی در موش‌های صحرائی قرار گرفته شده در حالت تعلیق اندام تحتانی بود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ۱۰ سر موش صحرائی نژاد ویستار با میانگین سنی ۶-۴ ماه به طور تصادفی در دو گروه تعلیق اندام تحتانی و کنترل قرار گرفتند (۵ سر موش صحرائی در هر گروه). نمونه‌های گروه تعلیق به مدت ۱۴ روز به روش آویزان کردن از دم نگهداری شدند و نمونه‌های گروه کنترل در این مدت زندگی عادی را سپری می‌کردند. پس از ۱۴ روز موش‌ها تشریح شده و عضلات نعلی و کف پایی آن‌ها جمع‌آوری شد و پس از وزن کردن عضله در نیتروژن مایع نگهداری شدند. سپس میزان بیان mRNA ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ در دو عضله اندازه‌گیری شد.

نتایج: نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی وزن نسبی هر دو عضله نعلی و کف پایی کاهش یافته بود ولی این کاهش در کف پایی معنی‌دار نبود. علاوه بر این بیان mRNA ژن MST1 ($P=0/021$) افزایش معنی‌دار و آتروژین ۱ ($P=0/056$) در عضله نعلی افزایش یافت. همچنین، هر دو MST1 ($P=0/071$) و آتروژین ۱ ($P=0/33$) افزایش غیر معنی‌داری را در عضله کف پایی نشان دادند. مقایسه بیان mRNA ژن‌ها در دو عضله نشان داد که بیان MST1 mRNA در نعلی بیشتر از عضله کف پایی بود ولی افزایش بیشتری در mRNA آتروژین ۱ در عضله کف پایی نسبت به نعلی نشان داده شد.

نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان اظهار داشت که MST1 می‌تواند یکی از اهداف اصلی کنترل آتروفی در شرایط بدون بار شدن مکانیکی همانند بستری شدن و سفرهای فضایی در نظر گرفته شود. هر چند که اهداف پایین دست MST1 در دو عضله می‌تواند متفاوت باشد.

واژه‌های کلیدی: بدون بار کردن مکانیکی، توده عضلانی، MST1، آتروژین ۱.

*نویسنده مسئول: رفسنجان، بلوار ولایت، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۲۷۰۶، شماره: ۰۳۴۳۱۳۱۲۱۰۲، Email: a.kazemi@vru.ac.ir

ارجاع: کاظمی عبدالرضا. اثر بدون بار کردن مکانیکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ عضلات نعلی و کف‌پایی موش‌های صحرائی ویستار. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۳(۳):۳۴-۴۰.

مقدمه

آتروفی عضلات اسکلتی در شرایط بدون عصب شدن، بی‌حرکی (۱)، در دوران پیری (۲) و به علاوه در بسیاری از شرایط کاتابولیکی شامل نارسایی قلبی و کلیوی، عفونت، سرطان و دیابت (۳) رخ می‌دهد. عضله اسکلتی یک بافت تغییرپذیر می‌باشد و باتوجه به سطح فعالیت خود (بار مکانیکی در مقابل غیر فعال بودن) تغییراتی را در توده و بیان پروتئین‌های عضلانی و تغییرات انقباضی و متابولیکی، نشان می‌دهد. شواهد در دسترس نشان می‌دهند که دسته‌ای از رویدادها به‌منظور حفظ تعادل خالص پروتئینی، از طریق کنترل سنتز و تجزیه پروتئین در عضله اسکلتی اتفاق می‌افتد (۴-۵).

فرایندهای رشد و حفظ عضله به وسیله آبه‌شارهای پیام‌رسانی درون سلولی که رونویسی و ترجمه پروتئین را کنترل می‌کنند، تنظیم می‌شوند. نشان داده شده است که بدون بار کردن مکانیکی در جوندگان موجب کاهش توده عضلانی، سطح مقطع عرضی میوفیبریل‌ها (CSA) و تولید نیرو می‌شود و متعاقب آن بارگذاری مجدد آب‌شاری از رویدادها از قبیل آسیب‌های خفیف عضلانی، التهاب، بازسازی و رشد را تحریک می‌کند که در نتیجه موجب بازیافت توده عضلانی و CSA می‌شوند (۶-۷).

در طول آتروفی عضلانی سنتز پروتئین به‌طور قابل توجهی بدلیل مهار مسیر IGF-1/PI3K/AKT سرکوب می‌شود (۸). تجزیه پروتئین به‌دلیل فعال شدن هر دو مسیر یوبی‌کوئیتین پروتئازوم و اتوفاجی به‌منظور پاک‌سازی پروتئین‌های میوفیبریلی و میوسیت‌ها اتفاق می‌افتد و بنابراین موجب کاهش در توده عضلانی و عملکرد انقباضی عضله می‌شود (۹). نشان داده شده است که بیان دو لیگاز E3 شامل آتروژین ۱ و MuRF-1 (Muscle RING-finger protein-1) به‌علاوه چند ژن اتوفاجی شامل LC3 در مراحل اولیه آتروفی‌های عضلانی تنظیم افزایش می‌یابند (۱۰-۱۱). فاکتور رونویسی FOXO3a با اتصال به توالی DNA در ناحیه پروموتور برخی از این آتروژین‌ها، از قبیل آتروژین ۱ و Bnip3 آن‌ها را فعال نماید (۱۲-۱۴). فعال شدن این ژن‌ها به وسیله FOXO3a (Forkhead box O3) همراه با دیگر مکانیسم‌های تنظیم‌کننده رونویسی شامل NFκB (NF-kappaB) و فاکتورهای مایوژنیک موجب شروع آتروفی عضلانی می‌شوند (۱۲، ۱۵-۱۶).

هر چند که آتروفی پیامد فرایندهای فیزیولوژیکی معینی از قبیل پیری می‌باشد، ولی به‌عنوان یکی از ویژگی‌های اصلی در بسیاری از بیماری‌ها مورد توجه قرار می‌گیرد. در هر دو مورد وضعیت‌های پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی، ضعف و آتروفی عضلانی می‌تواند موجب افت کیفیت زندگی، ناتوانی در انجام کارهای روزانه، خستگی و ایجاد بیماری‌های ثانویه مثل پوکی استخوان و دیابت شود. کاهش سطح مقطع تارهای

عضلانی و متعاقب آن اختلال در قدرت، مشخصه اصلی آتروفی عضلانی می‌باشد. همچنین، آتروفی عضلانی به‌وسیله تغییر در ترکیب نوع تار عضلانی دارای ویژگی می‌باشد (۱۷).

بنابراین، شناخت مکانیسم‌های درگیر در آتروفی و بازسازی عضله به توسعه روش‌های درمانی جدید برای مقابله با وضعیت‌ها و بیماری‌های از قبیل دیستروفی عضلانی، آتروفی ناشی از بی‌حرکی و پیری کمک خواهد کرد (۱۸).

خانواده کیناز شبه Ste20 پستانداران (MST) به‌طور گسترده‌ای در بافت‌های مختلفی بیان می‌شوند و شامل چهار عضو MST1، MST2، MST3 و MST4 می‌باشد. نشان داده شده است که کیناز MST1 در شرایط استرسی مختلف شامل فشار اکسایشی و فعال شدن کاسپازها (۱۹) افزایش می‌یابد. به‌عنوان یکی از عوامل اصلی آبه‌شار پیام‌رسانی هیپو (Hippo Signaling Cascade) (۲۰)، رونویسی MST1 در عضلات اسکلتی مختلف و عضله قلبی مشخص شده است (۲۱). در عضله قلبی نشان داده شده است که کیناز MST1 هم محل و قادر به فسفوریلاسیون ترپوپونین I قلبی در بدن موجود زنده می‌باشد (۲۲). نشان داده شده است که در عضلات مختلط سطح پروتئین MST1 در مراحل اولیه پس از تولد زیاد می‌باشد و در بزرگسالی به‌طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. به‌علاوه مشخص شده است که در شرایط بدون عصب شدن MST1 موجب آتروفی عصبی در عضلات تند انقباض می‌گردد. این افزایش در MST1 همراه با افزایش بیان آتروژین ۱ و LC3 (Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3) از طریق فعال کردن FOXO3a می‌باشد (۲۳).

همان‌طور که در بالا اشاره شد، بدون بار شدن مکانیکی مانند وضعیت فضاوردان و افراد بیمار در بستر، یکی از شرایطی می‌باشد که کاهش توده عضلانی در آن بارز می‌باشد، اما تا به حال نقش MST1 و آتروژین ۱ در آتروفی ناشی از بدون بار کردن مکانیکی و تفاوت بیان این دو ژن در عضلات مختلف (به لحاظ ترکیب تارهای عضلانی) بررسی نشده است. شناخت مکانیسم‌های درگیر در آتروفی و بازسازی عضله به توسعه روش‌های درمانی جدید برای مقابله با آتروفی ناشی از بی‌حرکی و بستری شدن ورزشکاران پس از آسیب دیدگی و جراحی‌ها که موجب طولانی‌تر شدن دوره بازتوانی و برگشت به میادین در آن‌ها می‌شود، کمک خواهد کرد. از این رو، پرداختن به وضعیت‌های بی‌حرکی مخصوصاً آتروفی‌هایی که می‌تواند در نتیجه بدون بار شدن در ورزشکاران اتفاق بیفتد، از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد تا با توسعه روش‌های دارویی و غیره آتروفی اتفاق افتاده در این دوران را در ورزشکاران محدود کنیم تا دوره بازتوانی و برگشت به میادین را در آن‌ها تسریع کنیم. بنابراین، باتوجه به کاهش توده عضلانی در شرایط بدون بار شدن عضله و نقش MST1 و آتروژین ۱ در برخی از مدل‌های

برای بدون بار کردن اندام تحتانی از روش تعلیق اندام تحتانی، همانطور که در مطالعات پیشین توضیح داده شده است (۲۵) استفاده شد. به طور خلاصه، با استفاده از چسبهای ارتوپدی و حلقه فلزی، یک سوم دیستال دم موش‌های صحرایی‌ها به میله‌های فلزی بالای قفس متصل شد و ارتفاع تعلیق به اندازه‌ای بود که اندام تحتانی حیوانات با هیچ سطح حمایتی تماس پیدا نکند (تقریباً ۳۰ درجه). دست‌های حیوانات برای حرکت و دسترسی آزادانه به غذا و آب با کف قفس تماس داشت و برای دو هفته در این حالت تعلیق قرار داشتند.

پس از ۱۴ روز قرار گرفتن در شرایط تعلیق، با استفاده از کلروفورم بیهوش شده و بلافاصله وزن کُشی شدند و سپس در شرایط کاملاً استریل و با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش در قسمت خلفی ساق پا حیوانات، عضلات نعلی و کف پای با قطع تاندون پروگزیمال و دیستال استجراج گردید و با ترازوی آزمایشگاهی (دقت ۰/۰۰۰۱؛ AND مدل GR ساخت کشور ژاپن) وزن گردید و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند و تا انجام آزمایشات سلولی و مولکولی در فریزر -۸۰ نگهداری شدند. با توجه به اینکه عضله کف پای به طور غالب (۹۰ درصد) از تارهای عضلانی نوع II و عضله نعلی از تارهای نوع I تشکیل شده است (۲۴)، در این پژوهش مطالعه روی این عضلات انجام شد.

جهت استخراج total RNA از عضلات نعلی و کف پای، به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزاء پروتئینی، محصول در 4°C ، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفورم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. محصول در 4°C ، ۱۵min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس در 4°C ، ۱۰min، ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. Plate حاوی RNA در اتانول شستشو و در $20\mu\text{L}$ آب RNase-Free حل گردید. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه BIO photometer، شرکت سازنده Eppendorf Germany) موردسنجش واقع شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از $1\mu\text{g}$ از RNA و با استفاده از Reverse Transcriptase انجام گرفت.

جهت اندازه‌گیری سطوح بیان mRNA ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II انجام شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی $20\mu\text{L}$ و هر واکنش به صورت duplicate انجام پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های MST1 آتروژین ۱ و GAPDH در بانک ژنی NCBI و توسط شرکت ماکرو ژن

آتروفی عضلانی، این سؤال پیش می‌آید که آیا بیان mRNA ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ در شرایط بدون بار شدن مکانیکی تغییر خواهد کرد و با تغییر در وزن عضله همسو می‌باشند؟ همچنین آیا تفاوتی بین بیان mRNA این ژن‌ها در عضلات مختلف وجود دارد. از این رو، هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی تغییرات و مقایسه در بیان mRNA ژن‌های MST1 و آتروژین ۱ در عضلات نعلی و کف پای موش‌های صحرایی نر ویستار در پی دو هفته بدون بار کردن مکانیکی عضله بود. با توجه به اینکه نشان داده شده است MST1 اثرات خود را از طریق لیگاز یوبی کوئیتینی آتروژین ۱ اعمال می‌نماید (۲۳)، از این رو در پژوهش حاضر بیان mRNA این ژن به عنوان عامل پائین دست MST1 مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر از نوع تجربی با کد EC/93-9/KNRC می‌باشد که به روش پس‌آزمون با گروه کنترل انجام شد. با توجه به اینکه گزارش شده است تغییرات تبدیل تارهای عضلانی از سن ۱۷ ماهگی در موش‌های صحرایی ثابت می‌شود (۲۴)، در این پژوهش ۱۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین سنی ۴-۶ ماه تهیه گردید که در دو گروه بدون بار شدن مکانیکی (HU) (N=۵) و کنترل (Con) (N=۵) به صورت تصادفی قرار گرفتند. پس از یک هفته سازگاری حیوانات با محیط جدید، موش‌های صحرایی به طور تصادفی در دو گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه بدون بار شدن مکانیکی (HU): این گروه شامل ۵ سر موش صحرایی ویستار ۴ تا ۶ ماهه بود که به مدت ۲ هفته در شرایط تعلیق اندام تحتانی قرار داشتند. پس از پایان دو هفته، موش‌های صحرایی‌ها ابتدا از طریق استنشاق کلروفورم بی‌هوش شدند و بلافاصله عضلات نعلی و کف پای استخراج و وزن گردید و این نمونه‌ها تا انجام آزمایشات مولکولی در فریزر -80°C منجمد و نگهداری شدند.

۲) گروه کنترل (Con): این گروه شامل ۵ سر موش صحرایی ویستار ۴ تا ۶ ماهه بود که به مدت ۲ هفته در شرایط زندگی طبیعی نگه داشته شدند و همزمان با گروه HU قربانی شدند و کلیه مراحل و آزمایشات مطابق با گروه دیگر روی آن‌ها انجام پذیرفت.

حیوانات در شرایط کنترل شده نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۷ صبح و شروع خاموشی ۷ عصر) دما (22 ± 1 سانتی‌گراد)، و رطوبت طبیعی نگهداری شدند. در گروه HU یک عدد موش صحرایی در هر قفس نگهداری و تمامی موش‌های صحرایی در هر دو گروه آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی داشتند. نگهداری و دستکاری حیوانات براساس کنوانسیون حمایت از حیوانات ایران و کمیته اخلاق دانشکده پزشکی ایران بود.

دو هفته‌ای بدون بار شدن مکانیکی توده بدنی موش‌ها به طور قابل توجهی کاهش یافته است ($P < 0.041$). علاوه بر این کاهش معنی داری در وزن نسبی عضله نعلی در گروه HU نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.019$).

جدول ۲ - وزن نسبی عضلات نعلی و کف پای

بدون بار	کنترل	
۳۸۳/۴±۴/۵۳	۳۳۵/۸۷±۶/۶۷	توده بدن پیش از آزمون (گرم)
۲۹۷/۴±۲/۳۹	۳۲۳/۴±۱۴/۷۶	توده بدن پس از آزمون (گرم)
۲۱/۰۸±۱/۴۳۹*	۳۴/۳±۲/۴۳	وزن نسبی نعلی به توده بدن ($\text{mg g}^{-1} \times 100$)
۱۱۰/۹۱±۳/۲۴	۱۰۵/۴۳±۳/۲۴	وزن نسبی کف پای به توده بدن ($\text{mg g}^{-1} \times 100$)

* $P < 0.05$ در مقابل گروه کنترل

نتایج آزمون تی مستقل نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین بیان mRNA هر دو ژن‌های MST1 ($P < 0.021$) و آتروژن ۱ ($P < 0.056$) در عضله نعلی موش‌های صحرایی‌های نر ویستار وجود دارد. به‌طوریکه بیان mRNA هر دو ژن در عضله نعلی موش‌های صحرایی بدون بار شده نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود (نمودار ۱).

همچنین نتایج نشان داد که بیان mRNA هر دو ژن‌های MST1 ($P < 0.071$) و آتروژن ۱ ($P < 0.330$) در عضله کف پای موش‌های صحرایی نر ویستار به دنبال بدون بار شدن مکانیکی به طور غیر معنی داری افزایش یافته بود.

پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از β -actin به عنوان ژن کنترل استفاده گردید. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل: ۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه - ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان mRNA ژن‌های موردنظر نیز با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه‌گیری شد.

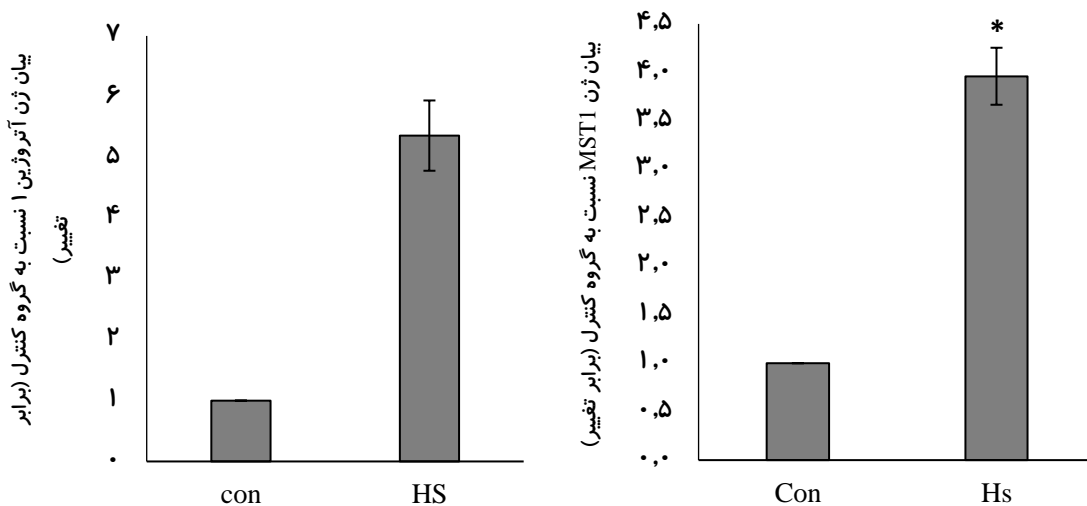
جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش حاضر

ژن‌ها	توالی پرایمر	بانک ژن
MST1	F=5'GCAATAGCTCAGTCCTTCA3' R=5'CTCGGTGTATATCTCACTCT3'	NM_024352.1
آتروژن ۱	F=5'CATCAGGAGAAGTGGATCTATGT3' R=5'GCTTCCCCAAAGTGCAGTA3'	NM_133521.1
GAPDH	F=5'GACATGCCGCTGGAGAAAC3' R=5'AGCCAGGATGCCTTTAGT3'	NM_017008.4

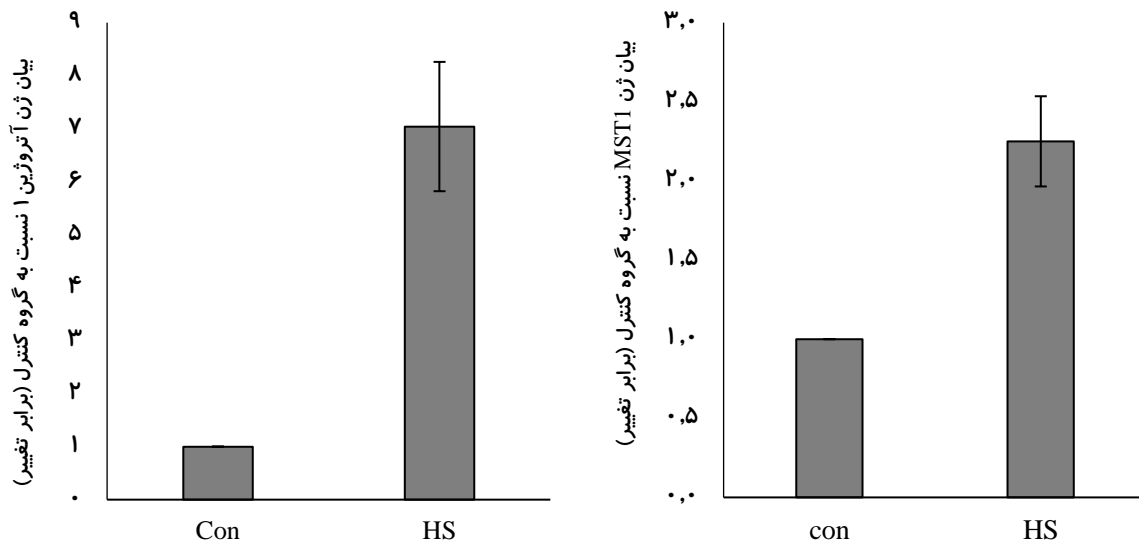
در بخش آمار توصیفی از شاخص‌های پراکندگی انحراف معیار، میانگین و نمودار استفاده شد. در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (KS) استفاده شد. همچنین همسان بودن واریانس‌ها با آزمون Leven سنجیده شد. جهت تعیین معنی‌ردار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری تی مستقل استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-20 استفاده شد.

نتایج

در جدول ۲ تغییرات توده بدنی پیش و پس از دوره آزمون و همچنین وزن نسبی عضلات نعلی و کف پای در گروه‌های پژوهش پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی ارائه شده است. نتایج نشان داد که پس از دوره



نمودار ۱- بیان mRNA ژن‌های MST1 (راست) و آتروژن ۱ (چپ) در عضله نعلی



نمودار ۲- بیان mRNA ژن های MST1 (راست) و آتروژین ۱ (چپ) در عضله کف پای

بحث

هیچ بافتی در بدن انسان به اندازه عضله اسکلتی نسبت به تغییرات ناشی از به کار گرفته شدن، پاسخ دهنده تر نیست. بی شک مطالعات حیوانی در مقایسه با مطالعات انسانی اطلاعات مفصل تری را ارائه می دهند و این فرصت را فراهم می آورند که سازوکارهای پاتولوژیک زمینه ساز برخی از آثار عدم استفاده عضلانی به صورت کامل تر مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. علیرغم مطالعات زیادی که در زمینه آتروفی عضلات اسکلتی انجام شده است، ولی مسیرهای سلولی و مولکولی درگیر در آتروفی عضلانی به طور کامل شناخته نشده اند. از این رو، آگاهی بیشتر از این مسیرها، می تواند توسعه روش های درمانی جدید برای کاهش تغییرات توده عضلانی در شرایط کاهش فعالیت عصبی مثل گچ گرفتن اندام، بستری شدن و حتی پروازهای فضایی را تضمین کند. بنابراین، ما در این پژوهش از مدل تعلیق اندام تحتانی به منظور کاهش فعالیت عصبی عضلانی استفاده کردیم. بدون بار کردن مکانیکی به عنوان مدلی برای پرواز در فضا به کار رفته است و به نظر می رسد که براساس بررسی هایی که دو مدل را به طور مستقیم مقایسه کرده است، پاسخ های آتروفیکی خیلی مشابه را بر می انگیزد. در روش تعلیق اندام تحتانی، نه تنها تحمل وزن وجود ندارد، بلکه فعالیت الکترومیوگرافی و انقباض عضلانی کاهش می یابد. نشان داده شده است که برداشتن تحمل بار بیشتر تارهای کند تنش را تحت تأثیر قرار می دهد (۲۵،۲۶).

اثر اصلی کاهش فعالیت عصبی عضلانی در انسان ها همانا از دست دادن توده عضلانی است که می توان آن را در سطح یک تار عضلانی منفرد و در سطح کل عضله اسکلتی مشاهده کرد. این اثر در عضلاتی

بازتر است که قبلاً تا حدود زیادی مورد استفاده قرار می گرفتند و بنابراین معمولاً در عضلات با درصد غالب تارهای کند بیش تر از عضلات با درصدهای بالای تارهای تند تنش می باشد و از این رو، احتمالاً برنامه های دستگاه ژنتیک سلول در دو نوع تار عضلانی متفاوت خواهد بود.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که رونویسی ژن MST1 پس از ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی در هر دو عضلات اسکلتی کند و تند تنش افزایش می یابد، ولی این افزایش در عضله اسکلتی کند تنش نعلی بیش تر از کف پای بود (۶ در مقابل ۲/۳ برابر). این نشان می دهد که MST1 mRNA در یک شیوه وابسته به نوع تار عضلانی برنامه آتروفی عضلانی را کنترل می کند. وی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که در شرایط آتروفیکی مختلف از قبیل مدل بدون عصب کردن هم MST1 یک الگوی وابسته به نوع تار عضلانی را دنبال می کند (۲۳). همچنین نشان داده شده است که تارهای تند تنش موش های فاقد MST1 نسبت به عضلات کند تنش مقاومت بیشتری در مقابل آتروفی عضلانی دارند (۲۳). همراستا با این پژوهش نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آتروفی کمتر در کف پای با بیان mRNA کم تر ژن MST1 همراه می باشد.

فاکتور رونویسی Foxo3 تنظیم افزایشی ژن های درگیر در هر دو مسیرهای اتوفازی و یوبی کوئیتین را واسطه گیری می کند (۲۷). مطالعات نشان دادند که مهار Foxo3 در عضلات قرار گرفته در معرض تحریکات آتروفی قادر است که از آتروفی عضلانی جلوگیری کند (۲۸، ۱۶). گزارش شده است که Foxo3 بیان mRNA آتروژین ۱ را تحریک می کند. از سوی دیگر، Akt که یک مولکول بالادست Foxo3 می

باشد، می‌تواند آن را فسفریله کرده تا از جایجایی آن به داخل هسته جلوگیری کند و در نتیجه بیان mRNA آتروژن ۱ را کاهش دهد (۱۲). در همین راستا، گزارش شده است که پروتئین Akt و سطوح فسفریله آن در شرایط بدون بار شدن مکانیکی کاهش می‌یابد. بنابراین این مسیر می‌تواند یکی از مکانیسم‌های درگیر در افزایش آتروژن ۱ باشد (۲۹). به علاوه بالا دست این مسیر می‌تواند کاهش IGF-1 باشد زیرا هانسون و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که در نتیجه ۱۴ روز تعلیق اندام تحتانی بیان IGF-1 mRNA و فسفوریلاسیون Akt کاهش می‌یابد (۳۰).

آتروژن ۱ و MuRF1 اهداف پائین دست سیگنالینگ P38 MAPK می‌باشند. در شرایط تعلیق اندام تحتانی بیان P38 افزایش می‌یابد و این می‌تواند در آتروفی عضلانی ناشی از بدون بار شدن بواسطه افزایش بیان آتروژن ۱ درگیر باشد (۳۱).

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که عضلات اسکلتی پاسخ متفاوتی به کاهش فعالیت عصبی عضلانی و بدون بار شدن مکانیکی نشان خواهند داد و این به میزان فعالیت قبلی عضله بستگی دارد. همچنین MST1 الگویی وابسته به نوع تار و به میزان فعالیت قبلی نشان می‌دهد. به علاوه MST1 احتمالاً از طریق مسیرهای پائین دستی متفاوتی در عضلات اسکلتی مختلف اثرات خود را اعمال می‌نماید. بنابراین با احتیاط می‌توان اظهار داشت که کنترل فارمارکولوژیکی بیان mRNA این ژن‌ها می‌تواند به عنوان یک رویکرد دارویی مهم در حفظ توده عضلات اسکلتی در شرایط بستری شدن یا بی‌حرکی پس از آسیب‌های ورزشی که فعالیت عصبی عضلانی کاهش می‌یابد در نظر گرفته شوند.

علاوه بر این، افزایش بیان MST1 mRNA می‌تواند یکی از مکانیسم‌های درگیر در افزایش آتروژن ۱ باشد. مشخص شده است که تحت شرایط استرس اکسایشی در نورون‌های عصبی، MST1 با فسفریله کردن Foxo3 موجب انتقال آن به هسته شده و فعال سازی ژن‌های پیش آپوپتوزی را به دنبال دارد (۳۲). همچنین وی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که استس که MST1 از طریق فسفریله کردن serin7 در Foxo3 می‌تواند موجب افزایش و انتقال هسته‌ای آن در عضلات اسکلتی گردد. با توجه به اینکه کاهش ۴۰ درصد را در بیان mRNA آتروژن ۱ در موش‌های فاقد ژن MST1 نشان دادند، پس احتمالاً MST1 از طریق تعدیل مسیرهای پایین دست Foxo3 بیان آتروژن ۱ را کنترل می‌کند (۲۳).

همانطور که بالاتر اشاره شد هر چند که در پژوهش لین و همکاران (۲۰۰۲) نشان داده شده که بیان MST1 و نقش آتروفیکی آن در شرایط بدون عصب شدن در عضلات تند انقباض بیشتر است (۳۳) ولی پژوهش حاضر مخالف آن را نشان داد به طوری که بیان آن در زمان تعلیق در عضله نعلی بیشتر بود. این احتمال وجود دارد که بیان mRNA این ژن ابتدا تحت تأثیر فعالیت عصبی عضلانی می‌باشد. در همین راستا، نشان داده شده است که کاهش فعالیت EMG مطلق در عضله کف پای (۹۰ mv/h) نسبت به عضله نعلی (۴۷۳ mv/h) در شرایط تعلیق اندام تحتانی کمتر می‌باشد (۳۴-۳۵). این مطابق با ادبیات می‌باشد که آتروفی بیشتر در عضلات نعلی بستگی به میزان فعالیت قبلی آن دارد و با توجه به اینکه کاهش فعالیت در عضله نعلی مشهودتر است، بیان mRNA این ژن هم در این عضله اسکلتی بیشتر می‌باشد. ولی در عضله نعلی که افت فعالیت عصبی عضلانی کمتری دارد تنظیم افزایشی این ژن هم در آن کمتر می‌باشد.

از نتایج جالب توجه این پژوهش این بود که علیرغم افزایش بیشتر MST1 mRNA در نعلی نسبت به کف پای، بیان mRNA آتروژن ۱

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر تحت حمایت مرکز علوم و اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان با کد EC/93-9/KNRC می‌باشد.

References

- Tidball JG. Mechanical signal transduction in skeletal muscle growth and adaptation. *J Appl Physiol* 2005;98(5):1900-8. doi:10.1152/jappphysiol.01178.2004
- Andersson DC, Betzenhauser MJ, Reiken S, Meli AC, Umanskaya A, Xie W, et al. Ryanodine receptor oxidation causes intracellular calcium leak and muscle weakness in aging. *Cell Metab* 2011;14(2):196-207. doi:10.1016/j.cmet.2011.05.014
- Hulmi JJ, Silvennoinen M, Lehti M, Kivela R, Kainulainen H. Altered Redd1, myostatin, and Akt/Mtor/Foxo/Mapk signaling in streptozotocin-induced diabetic muscle atrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012;302(3):E307-15. doi:10.1152/ajpendo.00398.2011
- Rodriguez J, Vernus B, Chelhi I, Cassar-Malek I, Gabillard JC, Hadj Sassi A. Myostatin and the skeletal muscle atrophy and hypertrophy signaling pathways. *Cell Mol Life Sci* 2014;71(22):4361-71. doi:10.1007/s00018-014-1689-x
- Giger JM, Bodell PW, Zeng M, Baldwin KM, Haddad F. Rapid muscle atrophy response to unloading: pretranslational processes involving MHC and actin. *J Appl Physiol* 2009;107(4):1204-12. doi:10.1152/jappphysiol.00344.2009

20. Zhao B, Li L, Guan KL. Hippo signaling at a glance. *J Cell Sci* 2010;123(Pt 23):4001-6. doi:10.1242/jcs.069070
21. Watt KI, Judson R, Medlow P, Reid K, Kurth TB, Burniston JG. Yap is a novel regulator of C2C12 myogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;393(4):619-24. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.034
22. You B, Yan G, Zhang Z, Yan L, Li J, Ge Q. Phosphorylation of cardiac troponin I by mammalian sterile 20-like kinase 1. *Biochem J* 2009;418(1):93-101. doi:10.1042/BJ20081340
23. Wei B, Dui W, Liu D, Xing Y, Yuan Z, Ji G. MST1, a key player, in enhancing fast skeletal muscle atrophy. *BMC Biol* 2013;11:12. doi:10.1186/1741-7007-11-12
24. Deschenes MR, Maresh CM, Crivello JF, Armstrong LE, Kraemer WJ, Covault J. The effects of exercise training of different intensities on neuromuscular junction morphology. *J Neurocytol* 1993;22(8):603-15.
25. Martin TP, Edgerton VR, Grindeland RE. Influence of spaceflight on rat skeletal muscle. *J Appl Physiol* 1988;65(5):2318-25. doi:10.1152/jappl.1988.65.5.2318
26. Edgerton VR, Zhou MY, Ohira Y, Klitgaard H, Jiang B, Bell G, et al. Human fiber size and enzymatic properties after 5 and 11 days of spaceflight. *J Appl Physiol* 1995;78(5):1733-9. doi:10.1152/jappl.1995.78.5.1733
27. Zhang BT, Yeung SS, Liu Y, Wang HH, Wan YM, Ling SK, et al. The effects of low frequency electrical stimulation on satellite cell activity in rat skeletal muscle during hindlimb suspension. *BMC cell biol* 2010;11:87. doi:10.1186/1471-2121-11-87
28. Reed SA, Sandesara PB, Senf SM, Judge AR. Inhibition of FoxO transcriptional activity prevents muscle fiber atrophy during cachexia and induces hypertrophy. *FASEB J* 2012;26(3):987-1000. doi:10.1096/fj.11-189977
29. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14440-5. doi:10.1073/pnas.251541198
30. Hanson AM, Kittilson JD, Martin LE, Sheridan MA. Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insulin-like growth factor system. *Gen Comp Endocrinol* 2014;196:130-8. doi:10.1016/j.ygcen.2013.11.013
31. Zhang P, Chen X, Fan M. Signaling mechanisms involved in disuse muscle atrophy. *Med Hypotheses* 2007;69(2):310-21. doi:10.1016/j.mehy.2006.11.043
32. Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, Yang Y, Villén J, Becker EB, et al. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell* 2006;125(5):987-1001. doi:10.1016/j.cell.2006.03.046
33. Lin Y, Khokhlatchev A, Figeys D, Avruch J. Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(50):47991-8001. doi:10.1074/jbc.M202630200
34. Ohira Y, Nomura T, Kawano F, Sato Y, Ishihara A, Nonaka I. Effects of nine weeks of unloading on neuromuscular activities in adult rats. *J Gravit Physiol* 2002;9(2):49-59.
35. Ohira Y, Kawano F, Wang XD, Sudoh M, Iwashita Y, Majima HJ, et al. Irreversible morphological changes in leg bone following chronic gravitational unloading of growing rats. *Life Sci* 2006;79(7):686-94. doi:10.1016/j.lfs.2006.02.022
6. Adams GR, Caiozzo VJ, Baldwin KM. Skeletal muscle unweighting: spaceflight and ground-based models. *J Appl Physiol* 2003;95(6):2185-201. doi:10.1152/jappphysiol.00346.2003
7. Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2000;89(2):823-39. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.823
8. Bodine SC, Stitt TN, Gonzalez M, Kline WO, Stover GL, Bauerlein R, et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat Cell Biol* 2001;3(11):1014-9. doi:10.1038/ncb1101-1014
9. Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, et al. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *The Journal of Cell Biology* 2009;185(6):1083-1095. doi:10.1083/jcb.200901052
10. Gomes MD, Lecker SH, Jagoe RT, Navon A, Goldberg AL. Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(25):14440-5. doi:10.1073/pnas.251541198
11. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 2001;294(5547):1704-8. doi:10.1126/science.1065874
12. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, Skurk C, Calabria E, Picard A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell* 2004;117(3):399-412.
13. Zhao J, Brault JJ, Schild A, Cao P, Sandri M, Schiaffino S, et al. FoxO3 coordinately activates protein degradation by the autophagic/lysosomal and proteasomal pathways in atrophying muscle cells. *Cell Metab* 2007;6(6):472-83. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.004
14. Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* 2007;6(6):458-71. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.001
15. Carvalho RF1, Castan EP, Coelho CA, Lopes FS, Almeida FL, Michelin A, et al. Heart failure increases atrogin-1 and MuRF1 gene expression in skeletal muscle with fiber type-specific atrophy. *J Mol Histol* 2010;41(1):81-7. doi:10.1007/s10735-010-9262-x
16. Reed SA, Senf SM, Cornwell EW, Kandarian SC, Judge AR. Inhibition of I kappa B kinase alpha (IKK α) or IKKbeta (IKK β) plus forkhead box O (Foxo) abolishes skeletal muscle atrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 2011;405(3):491-6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.01.059
17. Fanzani A, Conraads VM, Penna F, Martinet W. Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2012;3(3):163-79. doi:10.1007/s13539-012-0074-6
18. Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. Molecular events and signalling pathways involved in skeletal muscle disuse-induced atrophy and the impact of countermeasures. *J Cell Mol Med* 2009;13(9B):3032-50. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00864.x
19. Graves JD, Draves KE, Gotoh Y, Krebs EG, Clark EA. Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276(18):14909-15. doi:10.1074/jbc.M010905200



The effect of the Mechanical Unloading of Lower Limb on MST1 and Atrogin1 Gene Expression in Plantaris and Soleus Muscles of Wistar Rats

Abdolreza Kazemi (Ph.D.)^{1,2*}

1- Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

2- Dept. of Physical Education and Sport Sciences, Faculty of Humanity and Literature, Vali E ASR University, Rafsanjan, IR Iran.

Received: 13 August 2018, Accepted: 2 November 2018

Abstract:

Introduction: The mammalian Ste 20-like kinase (MST) is involved in the activation of the ubiquitin pathway ligase atrogin1 in denervation atrophy. The aim of the present study was the study of changes in MST1 mRNA and Atrogin1 mRNA gene expression in the muscles of male Wistar rats with mechanical unloading of hind limb muscles.

Methods: In the present study 10 Wistar rats (4-6 month) divided into 2 groups randomly (control (N=5) and unloading of the hind limb (N=5) groups). The practical group unloaded of hind limb for 14 days and the control group spent the normal life during this period. After 14 days, the rats were sacrificed and their muscles and Plantaris were collected and after weighing the muscle, they were kept in liquid nitrogen.

Results: The results of this study showed that after 14 days of lower limb suspension, the relative weight of both soleus and plantar muscles decreased but this reduction was not significant in Plantaris skeletal muscle. In addition, the expression of genes MST1 mRNA ($P=0.021$) significantly increased and also atrogin-1 mRNA ($P=0.056$) in soleus muscle increased. Also, MST1 mRNA ($P=0.071$) and atrogin-1 mRNA ($P=0.33$) in Plantaris muscle increased insignificantly. Comparison of the genes expression in two skeletal muscles showed that the expression of MST1 mRNA in soleus more than Plantaris, on the other hand, expression of atrogin-1 mRNA in Plantaris increased more than soleus muscle.

Conclusion: According to the results of this study, it can be claimed that MST1 can be one of the main targets of controlling atrophy in conditions mechanical unloading, such as hospitalization and space travel. However, the lower targets of MST1 can be different in two muscles.

Keywords: Mechanical unloading, Skeletal muscle mass, MST1, Atrogin 1

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: A. Kazemi, Email: a.kazemi@vru.ac.ir

Citation: Kazemi A. The effect of the mechanical unloading of lower limb on MST1 and Atrogin1 gene expression in Plantaris and soleus muscles of Wistar rats. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2018;13(3):33-41.