دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم– شماره ۹۳
تیر۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱۵
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۳/۳۰
پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۱۵

بررسی فعالیت و بیان ژن لیپوپروتئین لیپاز به دنبال یک جلسه تمرین استقامتی در عضله و پلاسمای موش صحرایی

نویسندگان: دکتر سید علیرضا حسینی کاخک[1*]، میترا خادم الشریعه[2]، منیژه شیارگر[2]، دکتر محمد رضا حامدی نیا [3]، دکتر امیر حسین حقیقی [1]، دکتر فاطمه رهبری‌زاده[4]

۱- استادیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تربیت معلم سبزوار، سبزوار، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش، دانشگاه تربیت معلم سبزوار، ایران

۳- دانشیار گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تربیت معلم سبزوار، سبزوار، ایران

٤- استادیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: سیدعلیرضا حسینی کاخک hosseini18@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: لیپوپروتئین لیپاز(LPL) یکی از آنزیم‌های کلیدی در متابولیسم چربی‌ها و حفظ تعادل انرژی است. پاسخ حاد و تاخیری آن به یک جلسه تمرین در موش‌های صحرایی به‌خوبی مورد مطالعه قرارنگرفته‌است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر یک جلسه دویدن طولانی‌مدت روی تردمیل بر بیان ژن و فعالیت LPL در عضله اسکلتی و همچنین پلاسمای موش های نر صحرایی بود.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۳۱ ±۳۸۸ گرم به‌طور تصادفی در دو گروه کنترل(دوازده سر) و تجربی(دوازده سر) قرارگرفتند. گروه تجربی، یک جلسه تمرین به مدت ۱۲۰ دقیقه و با شدت ۱۸ متر بر دقیقه را روی تردمیل انجام‌دادند. بی-درنگ، ۲ و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین، موش‌ها بیهوش و نمونه‌گیری خون و بافت عضله سولئوس انجام‌شد. بیان ژن LPL به روش RT-PCR مورد بررسی قرارگرفت. داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA با اندازه‌گیری مکرر تجزیه‌وتحلیل شدند.

نتایج: نتایج تحقیق نشان‌داد که بیان ژن LPL عضله در ۲ و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش‌داشت (به ترتیب P=0.02 و P=0.004)؛ همین-طور، فعالیت LPL عضله در ۲ و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل افزایش‌یافت (به ترتیب P=0.03 و P=0.007)؛ غلظت LPL پلاسمایی نیز در ۲۴ ساعت پس‌از تمرین افزایش معنی‌دار نشان‌داد (P=0.04).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان‌داد که یک جلسه تمرین طولانی‌مدت با افزایش بیان LPL در سطح عضله می‌تواند به افزایش هیدرولیز تری‌گلیسریدها منجرشود؛ بنابراین قابلیت عضلات برای اکسیداسیون تری‌گلیسریدها پلاسما افزایش‌یافته، متابولیسم چربی‌ها بهبودمی‌یابد.

واژگان کلیدی: تمرین، LPL، موش صحرایی، عضله، پلاسما

مقدمه

حفظ و برقراری وزن مناسب، عامل تعیین‌کنندهٔ مهم بقاء و ادامه حیات است. ثبات وزن و ترکیب بدنی در طی دوره‌های زمانی طولانی به هماهنگی و تعادل دقیق میان دریافت و مصرف انرژی نیازدارد (۱)؛ اما تنظیم وزن، پدیده پیچیده، مبهم و تا حد زیادی ناشناخته است (۲) و مکانیسم‌های گوناگونی در تنظیم آن دخالت‌دارند که از آن جمله می‌توان به عوامل ژنتیکی، فیزیولوژیکی و رفتاری اشاره‌کرد (۱). اگر به هر دلیل، تعادل میان دریافت و هزینه انرژی حفظ‌نشود افزایش یا کاهش وزن رخ‌خواهدداد که هریک به نوعی، سلامتی را به خطر می‌اندازند (۳و٤).

عوامل متعددی در تعادل و هموستاز انرژی نقش‌دارند که از آن جمله می‌توان به نقش ژن‌ها اشاره‌کرد (۵). از جمله ژن‌های مهم موثر بر متابولیسم و هموستاز انرژی لیپوپروتئین لیپاز (LPL) است (۸-٦). LPL در متابولیسم لیپیدها، میزان برداشت اسید چرب مشتق‌شده از تری-گلیسیریدها توسط بافت‌های مختلف، متابولیسم کلسترول پلاسما و تأثیرهای بین سلولی مرتبط با در دسترس‌بودن لیپید نقش اصلی دارد (۹). LPL، هیدرولیز تری‌گلیسیریدها و لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسیرید می‌شود؛ بنابراین نقشی مهم در هدایت اسیدهای چرب آزاد به سوی بافت چربی و عضلات اسکلتی ایفامی‌کند؛ این آنزیم که تعیین‌کنندهٔ مهم توزیع چربی میان بافت‌ها به‌شمارمی‌رود (۱۰) با انسولین، گرسنگی، سیری، تمرین و فعالیت بدنی تنظیم‌می‌شود (۱۱).

تمرین با ایجاد تغییرات متابولیکی از راه برهم‌زدن شارژ انرژی سلولی، تقاضای سوخت سلول را در جهت تأمین انرژی مورد نیاز، برای ادامهٔ حیات سلول افزایش‌می‌دهد. بافت‌های مختلف بدن، هریک به نحوی در این فرایند دخالت‌دارند؛ اما با توجه به اینکه عضله اسکلتی از لحاظ متابولیکی بافتی بسیار فعال است از این نظر، منحصربه‌فرد می‌نماید (۱۲). اگرچه گفته‌می‌شود که LPL در انسان‌ها با تمرین نیز می‌تواند تنظیم‌شود اما اثر تمرین حاد بر LPL عضلانی و پلاسمایی کمتر مورد مطالعه قرارگرفته‌است (۱۳). بیشتر مطالعات انجام‌شده در این زمینه در رابطه با فعالیت LPL در سرم یا پلاسما پس‌از تمرین‌های طولانی-مدت است (١٤و١٥)؛ این در حالی است که با وجود آثار تنظیمی تمرین روی سطوح LPL و بیان LPL با تمرین در عضله اسکلتی (۱۳) پاسخ حاد و تأخیری آن به تمرین به-روشنی مشخص نیست (١٦). مطالعات انجام‌گرفته نیز نتایج متناقضی را در این زمینه نشان‌می‌دهند؛ برای نمونه، *سیپ و همکاران*۱ (۱۹۹۵) با بررسی اثر پنج تا سیزده روز تمرین پی‌درپی روی دوچرخه با ۵۰ تا ۷۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی، در ۳۲ مرد بزرگسال بی‌تحرک، افزایش در LPL mRNA عضله اسکلتی را بی‌درنگ بعد از تمرین گزارش-کرد (۱۷)؛ درحالی‌که *همیلتون و همکاران* (۱۹۹۸) افزایش LPL mRNA را در عضلات اسکلتی سفید موش‌های صحرایی در اثر تمرین داخل چرخ و عدم تغییر آن را در عضلات قرمز گزارش‌دادند (٦). *لادو و همکارانش* ۲ (۱۹۹۱) نیز اثر ۲ ساعت تمرین شنا در موش‌ها را بررسی-کردند و افزایش LPL را در بافت عضلانی، بی‌درنگ بعداز تمرین و عدم تغییر در فعالیت LPL و LPL mRNA را ٢٤ ساعت بعداز تمرین گزارش‌کردند (۱۸)، در مقابل *اونگ و همکاران*۳ (۱۹۹۵) نشان‌دادند که شش هفته تمرین، افزایش توده و فعالیت LPL در عضله اسکلتی موش‌ها، ١٦ ساعت بعداز آخرین جلسه تمرین سبب‌شد؛ درحالی‌که LPL mRNA تغییری‌نکرد (۱۹). در مطالعه دیگر *پائولین و همکاران* ٤ اثر یک ساعت دویدن روی تردمیل را بر غلظت LPL عضله در موش‌های نر صحرایی بررسی‌کردند؛ نتیجهٔ تحقیق از آن حاکی بود که LPL پلاسمایی بی‌درنگ و ۳ ساعت پس‌از تمرین کاهش‌یافت، درحالی‌که ٢٤ ساعت پس‌از تمرین افزایش‌یافت؛ همچنین بلافاصله پس‌از تمرین کاهش LPL عضلانی مشاهده‌شد (۲۰) و بالاخره مطالعات جدیدتر نشان‌می‌دهند که در ماهیان تمرین شنا استقامتی، افزایش غلظت LPL در عضلات قرمز را سبب-می شود (۲۱).

1. Seip et al
2. Ladu et al
3. Ong et al
4. Paulin et al.

بنابراین در تحقیق حاضر، ما برای اولین‌بار پاسخ حاد و تأخیری LPL را در دو سطح ژن و پروتئین هم در عضله و هم پلاسمای موش‌های صحرایی مطالعه‌می‌کنیم.

مواد و روش‌ها

طرح تحقیق: تحقیق حاضر از نوع تجربی (بنیادی) با طرح دو گروهی کنترل و تجربی بود.

حیوانات و نگهداری

تعداد ٢٤ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار، با وزن ٣١ ± ٣٨٨ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری‌شدند. موش‌ها در گروه‌های چهارتایی، در قفس‌های پلی-کربنات شفاف استاندارد ساخت شرکت رازی راد و در اطاق مخصوص با دمای ٢±٢٢ درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی به تاریکی ١٢:١٢ ساعت (٧ صبح تا ٧ عصر) و رطوبت نسبی ٥٠٪ نگهداری‌شدند. موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد دسترسی‌داشتند و در سرتاسر دوره تحقیق، با یک نفر جابه‌جا و دستکاری شدند. موش‌ها پس‌از یک هفته آشنایی با فضای آزمایشگاه و دستکاری توسط محقق، به‌طور تصادفی به دو گروه کنترل (دوازده سر) و تجربی (دوازده سر)، همسان از لحاظ وزن تقسیم‌شدند.

پروتکل تمرین

تمرین، شامل دویدن روی تردمیل ویژه جوندگان آزمایشگاهی بود. به‌منظور ایجاد آمادگی و رعایت اصل اضافه بار، هشت جلسه تمرین آمادگی برای موش‌های گروه تمرین درنظرگرفته‌شد و تمرین با سرعت ١٠ متر در دقیقه و زمان ٢٠ دقیقه آغازشد و در مدت دو هفته به‌تدریج زمان و سرعت دویدن افزایش‌یافت تا در روز تمرین اصلی به سرعت نهایی (١٨ متر بر دقیقه) رسید و تمرین اصلی با زمان ١٢٠ دقیقه و سرعت ١٨ متر بر دقیقه و شیب صفر درجه انجام‌شد؛ در این جلسه برای رعایت مسائل اخلاقی به‌منظور وادارکردن آنها به دویدن، از شوک الکتریکی استفاده‌نمی‌شد، بلکه این کار با میله‌ای پلاستیکی انجام‌می‌گرفت. ١٠ دقیقه اول و آخر هر جلسه و جلسه اصلی به گرم‌کردن و سردکردن اختصاص‌داده‌شد. برای همسان‌سازی موش‌ها به فضای آزمایشگاه و تردمیل، گروه کنترل نیز در طی دو هفته آشنایی، سه‌بار روی تردمیل قرارگرفتند و با سرعت ٨ متر بر دقیقه به مدت ١٠ دقیقه روی تردمیل راه‌رفتند؛ درضمن ٤ ساعت قبل از تمرین غذا از قفس موش‌ها برداشته‌شد تا خون‌گیری موش‌ها در حالت ناشتایی نسبی انجام‌شود.

بیهوشی، خون گیری و تهیه بافت

نحوهٔ بیهوشی موش‌های بدین ترتیب بود که بی‌درنگ پس‌از اتمام جلسه تمرین موش‌ها از روی تردمیل برداشته‌شده، داخل قفس‌های برچسب‌گذاری‌شده قرار-داده‌شدند؛ در این مرحله، بلافاصله چهار سر موش از گروه تجربی و چهار سر از گروه کنترل با تزریق داخل صفاقی (ip) پنتوباربیتال سدیم (6 mg/100 g body mass) بیهوش شدند و نمونه‌گیری خون و عضله انجام‌شد. دو ساعت بعد نیز، چهار سر دیگر از گروه کنترل و چهار سر از گروه تجربی بیهوش و نمونه‌گیری انجام‌شد. در مرحله سوم، ٢٤ ساعت بعد نیز، چهار سر از گروه کنترل و چهار سر از گروه تجربی بیهوش و نمونه‌گیری انجام-شد؛ در مرحله سوم نیز، موش‌ها ناشتایی چهار ساعته داشتند. خون‌گیری از طریق سوراخ‌کردن مستقیم قلب و با سرنگ انجام‌شد. بافت عضله سولئوس نیز به‌سرعت جدا، به میکروتیوب‌های RNAase free و DNAase منتقل و در نیتروژن مایع منجمدشد. نمونه‌های خونی در لوله‌های فالکون حاوی EDTA سانتریفیوژ و پلاسما جدا و همراه با نمونه‌های بافت تا زمان اندازه‌گیری به یخچال ٨٠- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

اندازه‌گیری‌های بیوشیمیایی

فعالیت لیپوپروتئین لیپاز عضله و پلاسما به روش رنگ‌سنجی آنزیمی، کیت‌شناسایی LPL شرکت

Nanjing Jiancheng Bioengineering، ساخت کشور چین، اندازه‌گیری‌شد.

انسولین سرم به روش الایزا نوع sandwich، کیت شرکت Mecrodia ساخت کشور سوئد با درجه حساسیت ۰/۰۷ میکروگرم در لیتر و ضریب تغییرات درون گروهی ۴/۲٪ اندازه‌گیری‌شد.

گلوکز سرم با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آنزیمی، کیت گلوکز شرکت پارس آزمون، ساخت کشور ایران با درجه حساسیت ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ضریب تغییرات درون گروهی ۲/۱٪ اندازه‌گیری‌شد.

تخلیص mRNA و بررسی بیان ژن با RT-PCR

به‌منظور بررسی بیان ژن، واکنش semi-quantitative RT-PCR روی بافت‌های کنترل و تجربی صورت‌گرفت. حدود ۲۰ میلی‌گرم از بافت‌ها جداسازی و برای واکنش استخراج RNA به‌کارگرفته‌شد. تخلیص RNA با استفاده از کیت شرکت MN (کشور آلمان) بدین‌صورت انجام‌گرفت: ابتدا بافت‌ها با افزودن ۳۵۰µl محلول RA1 و ۳/۵µl مرکاپتواتانول لیز شدند؛ سپس محلول بافت‌ها همراه با بافرلیز به داخل ستون (دارای حلقه قرمزرنگ) افزوده و در دور۱۱هزار به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژشد؛ محلول عبورکرده از ستون در یک میکروتیوب جمع‌آوری‌شد؛ سپس شرایط، برای چسبیدن RNA با افزودن الکل۷۰٪ به میزان ۳۵۰ میکرولیتر مناسب و در این مرحله چندبار با پیپت، ترکیب خوب مخلوط‌شد. محلول هموژنیزه‌شده بالا، به ستون تخلیص RNA (دارای حلقه آبی‌رنگ) اضافه و در دور ۱۱هزار به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفوژ شد و سپس ۳۵۰µl بافرMDB افزوده و در دور ۱۱هزار به مدت ۱ دقیقه سانتریفوژشد؛ با استفاده از µl ۹۵ محلول DNase I و زمان انکوباسیون ۱۵ دقیقه‌ای، DNAهای همراه با RNA که به غشاء متصل شده‌اند، از‌بین‌رفتند سپس ۲۰۰µl محلول RA2 و در ادامه ۶۰۰µl محلول RA3 به ستون افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت ۳۰ ثانیه سانتریفیوژشد؛ در مرحله بعدی، ۲۵۰µl محلول RA3 افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژشد. به ستون µl ۶۰ آب RNase free افزوده و در دور ۱۱۰۰ به مدت ۱ دقیقه، سانتریفیوژ و در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری‌شد. میزان کمی RNA استخراج‌شده با قرائت جذب نوری (OD) آن، در nm ۲۶۰ در بیوفتومتر مشخص شد. به‌منظور ساخت cDNA در یک لوله فاقد RNase، ۱۰۰ تا ng ۴۰۰ از RNA توتال اضافه شد و ۰/۵µg از پرایمر الیگو dT به آن اضافه گردید؛ حجم نهایی با آب مقطر فاقد RNase به µl۱۱رسید. مجموعه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ دقیقه انکوبه‌شد و سپس بی‌درنگ روی یخ، سرد شد. بافر RT(5X)، به حجم µl ۴، dNTPmix(10mM) به میزان µl ۲، Ribonuclease inhibitor (RNasin) ۲۰ واحد اضافه شد و با آب مقطر فاقد RNase به حجم نهایی µl ۱۹رسانده و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شد؛ سپس ۲۰۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس (M-Mul-V) اضافه و به مدت ۱ ساعت در ۴۲ درجه انکوبه‌شد؛ در مرحلهٔ بعدی، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه قرارگرفت که غیرفعال‌شدن آنزیم را سبب و سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل‌شد؛ محصول cDNA در ۷۰- درجه ذخیره گردید. با استفاده از نمونه cDNAهای تهیه‌شده در بالا، طبق پروتکل زیر PCR صورت‌گرفت؛ در این روند از بتا اکتین برای کنترل داخلی استفاده‌شد و به صورت جداگانه، برای هر نمونه، یک واکنش PCR نیز با پرایمرهای بتا اکتین صورت‌گرفت.

پرایمرهای ژن LPL LPLR TTGTAGGGCATCTGAGAGCGAGTC و LPLF: GCACGAGCGCTCCATCCAT را شامل می‌شوند.

پرایمرهای ژن بتا اکتین، β-actin-For : 5'-TCC CTG GAG AAG AGC TAC G-3' و β-actin-Rev :5'- GTA GTT TCG TGG ATG CCA CA-3' را شامل می‌شوند.

برای ارزیابی نتایج PCR از الکتروفورزکردن محصول PCR، روی ژل آگارز و آنالیز با نرم‌افزار UVtech استفاده‌شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

برای بررسی اثر تمرین بر بیان ژن LPL و LPL بافتی و پلاسمایی از آزمون ANOVA با اندازه‌گیری مکرر (Repeated Measures ANOVA)، در سطح ۵٪ استفاده‌شد و تمام عملیات با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام‌گرفت.

یافته‌های تحقیق

یافته‌های تحقیق در جدول شماره ۱ و شکل‌های ۱ تا ۳ آمده‌است. نتایج تحقیق نشان‌داد که گلوکز (F=0.75 و P=0.51) و انسولین (F=2.89 و P =0.14) پلاسمایی در سه زمان میان گروه کنترل و تجربی تفاوت معنی‌دار نداشت.

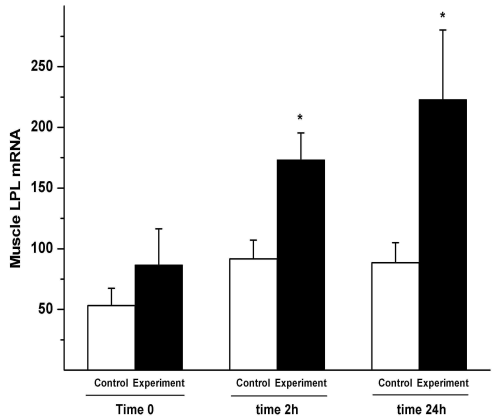
همان‌طوری‌که در جدول و شکل شماره ۱ دیده‌می‌شود بیان ژن LPL عضله در هر سه زمان بلافاصله (Time 0)، ۲ ساعت پس‌از تمرین (Time 2h) و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین (Time 24h) در گروه تجربی (Experiment) در مقایسه با گروه کنترل (Control) افزایش‌یافته‌است. هرچند، افزایش بیان فقط در ۲ و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین از لحاظ آماری معنی دار است (به ترتیب F=0.39 و P =0.02 و F=3.17 و P =0.004).

شکل شماره ۲ فعالیت LPL در عضله را نشان‌می‌دهد. همان‌طورکه مشاهده‌می‌شود الگوی تغییرات فعالیت LPL از الگوی بیان ژن آن تبعیت‌می‌کند به‌طوری‌که افزایش در هر سه مرحله دیده‌می‌شود و به‌جز در مرحله اول (بی‌درنگ پس‌از تمرین) در ۲ و ۲۴ ساعت پس‌از تمرین، افزایش معنی دار فعالیت LPL مشاهده‌می‌شود (به ترتیب F=0.03، P =0.03 و F=0.58 و P =0.007).

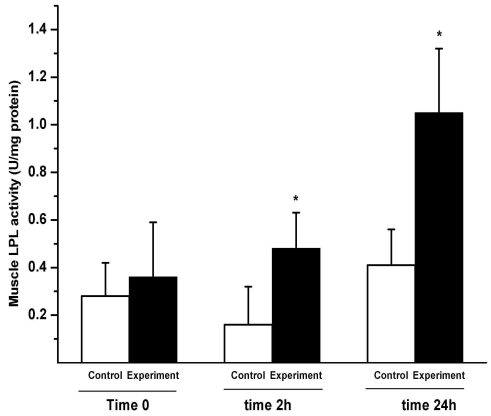
شکل شماره ۳ فعالیت LPL پلاسما را نشان‌می‌دهد؛ این شکل از آن حاکی است که فقط در ۲۴ ساعت پس‌از تمرین، فعالیت LPL پلاسما افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل داشته‌است (F=4.43 و P =0.04).

جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد متغیرها بر حسب گروه‌ها و زمان‌های مختلف

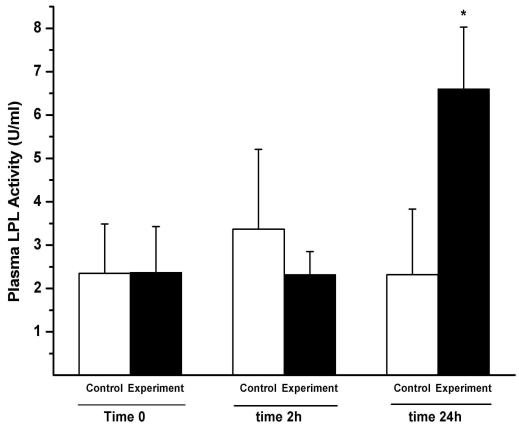
متغیرها		بی‌درنگ پس‌از تمرین	دو ساعت پس‌از تمرین	۲۴ ساعت پس‌از تمرین
فعالیت LPL بافت عضلانی (U/mg protein)	کنترل	۰/۲۸ ±۰/۱۴	۰/۱۶ ±۰/۱۶	۰/۴۱ ±۰/۱۵
	تجربی	۰/۳۶ ±۰/۲۳	*۰/۴۸ ±۰/۱۵	*۱/۰۵ ±۰/۲۷
LPL mRNA بافت عضلانی	کنترل	۵۳/۲۲ ±۱۴/۱۹	۹۱/۷۱ ±۱۵/۳۸	۸۸/۶۰ ±۱۶/۳۹
	تجربی	۸۶/۶۱ ±۲۹/۸۲	* ۱۷۳/۱۴ ±۲۲/۳۴	*۲۲۲/۷۷ ±۵۷/۴۲
LPL پلاسما (U/ml)	کنترل	۲/۳۵ ±۱/۱۴	۳/۳۷ ±۱/۸۴	۲/۳۲ ±۱/۵۱
	تجربی	۲/۳۷ ±۱/۰۶	۲/۳۲ ±۰/۵۳	*۶/۶۰ ±۱/۴۳
انسولین (µg/l)	کنترل	۲/۲۱ ±۰/۲۱	۲/۵۹ ±۰/۹۹	۳/۲۷ ±۱/۱۹
	تجربی	۱/۷۲ ±۰/۴۵	۱/۶۲ ±۰/۳۷	۲/۲۲ ±۰/۸۳
گلوکز (mg/dl)	کنترل	۱۰۶/۲۵ ±۴/۲	۹۵/۷۵ ±۲۲/۶۹	۸۶/۲۵ ±۷/۲۲
	تجربی	۹۴/۷۵ ±۱۸/۹۹	۸۷/۷۵ ±۱۰/۳۴	۱۰۴/۲۵ ±۱۹/۰۵



شکل ۱. بیان ژن LPL در عضله پیش و پس‌از تمرین در دو گروه کنترل و تجربی در زمان‌های مختلف. P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است.



شکل ۲. فعالیت LPL در عضله پیش و پس‌از تمرین در دو گروه کنترل و تجربی در زمان‌های مختلف. P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است.



شکل ۳. فعالیت LPL پلاسما پیش و پس‌از تمرین در دو گروه کنترل و تجربی در زمان‌های مختلف. P < ۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار است.

بحث و نتیجه‌گیری

LPL آنزیم کلیدی متابولیسم چربی‌ها بوده (۱۳) که از آن با عنوان یکی از ژن‌های کاندید برای چاقی نام‌برده‌می‌شود (۲۲)؛ آن، همچنین به عنوان عامل محدودکننده انتقال لیپوپروتئین‌های غنی از تری‌گلیسرید به داخل بافت‌ها معرفی‌شده‌است (۲۳)؛ به‌طوری‌که در عضلات اسکلتی مسئول هیدرولیز تری گلیسریدها و تولید اسیدهای چرب آزاد (FFA) است (۱۰).

ما در این مطالعه برای اولین‌بار، پاسخ حاد و تاخیری LPL را در دو سطح ژن و پروتئین و در دو بافت عضله و خون در موش‌های صحرایی مطالعه‌کردیم. تحقیق حاضر نشان‌داد که یک جلسه تمرین استقامتی طولانی‌مدت به‌صورت دویدن روی تردمیل باعث افزایش بیان ژن LPL و فعالیت آن در عضله اسکلتی موش‌های صحرایی ۲ و ۲٤ ساعت پس‌از تمرین و همچنین افزایش فعالیت LPL پلاسما، ۲٤ ساعت پس‌از تمرین را سبب‌شد. افزایش LPL در عضله به این معنی است که دسترسی عضله به FFA افزایش‌می‌یابد (۲٤) و این موضوع می‌تواند توجیه‌کنندهٔ آثار مثبت یک جلسه تمرین بر متابولیسم چربی‌ها باشد.

در یکی از اولین تحقیقات در این حوزه، *اوسکای و همکاران* (۱۹۹۲) نشان‌دادند که یک جلسه تمرین دویدن روی تردمیل، افزایش فعالیت LPL در عضله سولئوس موش‌های صحرایی را بی‌درنگ بعداز تمرین موجب شد (۲۵). در مطالعه حاضر نیز، افزایش LPL عضله بلافاصله پس‌از تمرین مشاهده‌شد ولی این افزایش معنی دار نبود. شاید تعداد کم نمونه‌ها دلیل این تفاوت در یافته‌ها باشد؛ همچنین *لادو و همکارانش* (۱۹۹۱) اثر ۲ ساعت تمرین شنا در موش‌ها را بررسی‌کردند و افزایش LPL mRNA در بافت عضلانی را بلافاصله پس‌از تمرین گزارش‌کردند (۱۸). در تحقیق حاضر نیز، LPL mRNA بی‌درنگ و ۲ ساعت بعداز یک جلسه تمرین ۲ ساعتهٔ دویدن روی تردمیل، در عضله افزایش‌یافت؛ اما این افزایش در ۲ و ۲٤ ساعت پس‌از تمرین معنادار بود. شاید به دلیل تفاوت در نوع تمرین (شناکردن در مقابل دویدن)، ما افزایش معناداری را بلافاصله بعداز تمرین مشاهده‌نکردیم چراکه به‌طورکلی به‌نظرمی‌رسد در تحقیق *لادو و همکاران*، تمرین به‌کاررفته، صرف هزینهٔ انرژی بیشتری را در مقایسه با تمرین ما سبب‌شده‌باشد؛ البته عدم تغییر معنی‌دار LPL mRNA بی‌درنگ و افزایش آن ۲ و ۲٤ ساعت بعداز تمرین، با مبانی نظری و ادبیات تحقیق در این زمینه نیز هم‌خوانی‌دارد؛ به‌طوری‌که مطالعات از آن حاکی است که LPL نقش کمتری در تأمین انرژی مورد نیاز عضله از طریق در دسترس‌بودن FFA در حین تمرین‌دارد، همچنین، بیشتر در بازسازی ذخایر TG عضله بعداز تمرین دخالت‌می‌کند (۱۹)؛ بنابراین پاسخ تأخیری LPL به تمرین را از این منظر می‌توان‌توجیه‌کرد.

در مطالعهٔ حاضر نیز، کشتن موش‌ها بلافاصله بعداز تمرین شدید و طولانی‌مدت انجام‌شد و شاید بر اساس توضیح‌های داده‌شده، افزایش معنی‌دار LPL mRNA بی‌درنگ بعداز تمرین مشاهده نشده‌باشد؛ *لادو و همکارانش*، بخشی از این افزایش را به کاهش غلظت انسولین و افزایش غلظت کاتکولامین‌ها و cAMP و بخشی را به تغییر در ثبات LPL mRNA و نسخه‌برداری ژن در اثر تمرین نسبت‌دادند (۱۸)؛ در تحقیق حاضر نیز غلظت انسولین بر اثر تمرین کاهش (نزدیک به معنی‌داری) یافت که می‌تواند یک مکانیسم احتمالی برای افزایش LPL mRNA باشد؛ به‌طوری‌که مطالعات نشان‌می‌دهند، تزریق انسولین، طی تمرین، فعالیت LPL عضله اسکلتی را کاهش‌می‌دهد و کاهش آن نیز بر اثر تمرین، فعالیت LPL را افزایش‌می‌دهد، هرچند این آثار به‌صورت مستقیم اعمال‌نمی‌شوند ولی در جایگاه مکانیسم‌های احتمالی مطرح‌اند (۷و۲٦).

از دیگر مکانیسم‌های احتمالی افزایش LPL mRNA در تحقیق حاضر می‌توان به افزایش غلظت کاتکولامین‌ها اشاره‌کرد. اگرچه در این تحقیق، غلظت کاتکولامین‌ها اندازه‌گیری‌نشد، اما مطالعات پیشین نشان‌-

داده‌اند که یک جلسه تمرین شدید (۷۰٪ حداکثر اکسیژن مصرفی) روی تردمیل در موش‌ها، افزایش غلظت کاتکولامین‌ها می‌شود (۲۷)؛ درنتیجه با توجه به شدت و مدت تمرین در تحقیق حاضر، به‌احتمال، غلظت کاتکولامین‌ها بر اثر تمرین افزایش‌یافته‌است و لذا مکانیسم دیگر افزایش LPL را از این طریق می‌توان‌توضیح‌داد.

مطالعه *آتاناسوا و همکاران* (۲۰۰۵) نیز نشان‌داد که تمرین هوازی روی تردمیل، افزایش LPL در عضله سولئوس موش‌های نر صحرایی را سبب‌شد (۱۳). هر‌چند موش‌ها در مطالعهٔ ما یک جلسه تمرین طولانی‌مدت استقامتی انجام‌دادند و در مطالعه آتاناسوا تمرین به مدت هشت هفته بود ولی نتایج مشابه و قابل مقایسه بوده، نشان‌دهندهٔ تغییرات متابولیسم چربی در عضله متعاقب تمرین (صرف‌نظر از مدت آن) است که می‌تواند افزایش مصرف تری‌گلیسریدها در عضله را در تمرین‌های استقامتی توضیح‌دهد؛ البته به‌طور منطقی بایدگفت که آثار یک جلسه تمرین بر متابولیسم چربی نمی‌تواند به اندازهٔ یک دوره برنامه تمرین استقامتی به مدت چند هفته یا ماه باشد.

همیلتون و همکاران (۱۹۹۸) نیز افزایش در LPL mRNA و توده آن را در عضلات اسکلتی سفید، ۲ تا ٤ ساعت بعداز چهارده تا بیست روز تمرین دویدن داخل چرخ گزارش‌کردند؛ آنها تغییری در LPL mRNA عضله سولئوس مشاهده‌نکردند. افزایش مشاهده‌شده در عضلات اسکلتی سفید به‌طوری معنی‌دار ۲۵ تا ۲۷ ساعت پس‌از تمرین کاهش‌یافت درحالی‌که غلظت LPL عضله در این مدت همچنان بالا باقی‌مانده‌بود (٦). افزایش LPL mRNA عضله سولئوس در مطالعه حاضر می تواند بخشی، مربوط به ماهیت اجباری‌بودن تمرین (تردمیل) در مقایسه با اختیاری‌بودن تمرین(چرخ) در مطالعه همیلتون باشد؛ چراکه همیلتون معتقد است تعیین‌کنندهٔ اصلی فعالیت LPL در عضلات میزان انقباض‌های آنهاست و در دویدن داخل چرخ بیشتر عضلات سفید درگیر می‌شوند و بنابراین افزایش LPL در آنها مشاهده‌می‌شود (٦). ولی در مطالعه حاضر از تمرین دویدن اجباری روی تردمیل استفاده‌شد؛ همین الگوی متفاوت تمرین می‌تواند توجیه‌کنندهٔ تفاوت مشاهده‌شده در این دو مطالعه باشد؛ ازطرفی، *اونگ و همکاران* (۱۹۹۵) نشان‌دادند که شش هفته تمرین، افزایش توده و فعالیت LPL در عضله اسکلتی بعداز آخرین جلسه تمرین سبب‌شد، درحالی‌که LPL mRNA تغییری‌نکرد. در این مطالعه، محققان مطرح‌کردند که فعالیت LPL در عضله می‌تواندافزایش‌یابد، درحالی‌که بیان ژن آن تغییرنکند که دلیل آن را حوادث بعداز نسخه‌برداری معرفی‌کردند (۱۹).

درحالی‌که در مطالعه حاضر تغییرات ژن و فعالیت LPL از الگوی مشابهی پیروی‌می‌کردند. همسو با نتایج تحقیق حاضر مطالعه *ماگنونی و وبر*[1] (۲۰۰۷) نیز نشان‌داد که تمرین شنا استقامتی در تونل مخصوص شنا در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، افزایش فعالیت LPL در عضلات قرمز می‌شود. در این مطالعه مطرح شد که تمرین استقامتی طولانی‌مدت، فعال‌شدن قوی LPL در عضلات قرمز را سبب و لیپوپروتئین‌های مشتق از این فعالیت به عنوان شاتل انرژی میان ذخایر چربی و عضلات اسکلتی در حال کار استفاده می‌شوند (۲۱).

تحقیقات نشان‌داده‌اند که فعالیت بدنی، افزایش مصرف اسیدهای چرب آزاد به وسیله بافت‌های محیطی و تنظیم چربی‌های پلاسمارا سبب‌شود (۲۸). یکی از مکانیسم‌های احتمالی برای این فرایند، افزایش در بیان ژن LPL است. در تحقیق حاضر اگرچه چربی‌های پلاسما اندازه‌گیری‌نشد، اما با توجه به ادبیات تحقیق (۲۰) و مدت زمان جلسه تمرین در این تحقیق، منطقی است چنین فرض‌شود که به‌احتمال، تری‌گلسیرید و کلسترول تام سرم کاهش‌یافته‌باشد که خود می‌تواند از افزایش بیان ژن LPL در عضله اسکلتی ناشی باشد.

1. Magnoni and Weber

نتیجه‌گیری

افزایش بیان ژن و فعالیت LPL در عضله و سرم موش‌های صحرایی در پاسخ به یک جلسه تمرین، مؤید آثار مثبت تمرین استقامتی (حتی یک جلسه) بر متابولیسم چربی‌ها و به‌احتمال، بهبود چربی‌های خون است؛ لذا اگر تمرین به‌صورت متناوب و منظم تکرار شود احتمال‌دارد که بیان ژن و فعالیت پلاسمایی LPL به نحوی تغییرکند تا افزایش بیشتر هیدرولیز تری-گلیسریدها و جلوگیری از چاقی را سبب‌شود.

تشکر و قدردانی

از همکاری‌های مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه شهید بهشتی، جناب آقای دکتر *هدایتی و همکاران*، برای انجام بخشی از آزمایش‌ها و همچنین دکتر *مهدی جباری نوقابی* به‌منظور مشاوره و تجزیه‌وتحلیل آماری قدردانی‌می‌شود.

منابع

1. Jequier E, Tappy L. Regulation of body weight in humans. Physiol Rev. 1995; 79(2): 452-472.
2. Arch J. Central regulation of energy balance: inputs, outputs and leptin resistance. Proc Nutr Soc. 2005; 64(1): 39-46.
3. Schwarts MW, Woods SC, Seely RJ, Brash GS, Baskin DG, and Leibel RL. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? Diabetes. 2003; 52 (2): 232-238.
4. Woods S, and Seeley R. Adiposity signals and the control of energy homeostasis. Nutrition. 2000; 16(10): 894 –902.
5. Hamman A, Matthaei S. Regulation of energy balance by leptin. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 1996; 104(4):293-300.
6. Hamilton M, Etienne J, Mcclure W, Pavey B, and Holloway A. Role of local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise. Physiol 275 (Endocrinol Metab). 1998; 38: e1016- 1022.
7. Tsutsumi K. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. Curr Vasc Pharmacol. 2003; 1(1): 11-17.
8. Mead JR, Iravine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation and role in disease. J Mol Med. 2002; 80(12): 753-769.
9. Hamilton M and Bey L. Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: a molecular reason to maintain daily low- intensity activity. J Physiology. 2003; 551(2):673-682.
10. Kiens B, Roepstroff C, Glatz JFC, Bonen A, Schjerling P, Knudsen J, and Nielsen JN. Lipid binding protein and lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle: influence of physical activity and gender. J Appl Physiol. 2004; 97:1209-1218.
11. Goldberg IJ, Eckel RH, Abumard NA. Regulation of fatty acid uptake into tissue: lipoprotein lipase and CD36-mediated pathways. J lipid Res. 2009; 50: S86- S90.
12. Zurlo F, Larson K, Bogardus C, and Ravussin E. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. J Clin Invest. 1990; 86(5): 1423–1427.
13. Atanassova P, Delchev S, Georgieva K, Koeva Y. Lipoprotein lipase enzyme histochemical activity in subcutaneous adipose tissue and skeletal muscle of the rat after submaximal exercise training. J. Conference of Biol. 2005; 263-268.
14. Bergeron J. Race differences in the response of postheparin plasma lipoprotein lipase and hepatic lipase activities to endurance exercise training in men Results from the HERITAGE Family Study. Atherosclerosis. 2001;159(2): 399-406
15. Herd SL, Hardman AE, Boobis LH, Cairns CJ. The effect of 13 weeks of running training followed by 9 d of detraining on postprandial lipaemia. Br J Nutr. 1998 ;80(1):57-66.
16. Seip R, Mair K, Cole T, and Semenkovich C. Induction of human skeletal muscle lipoprotein lipase gene expression by short-term exercise is transient. J Physiol. 1997; 272: 255- 261.

17. Seip RL, Poulos TJA, Kovich CFS. Exercise induces human lipoprotein lipase gene expression in skeletal muscle but not adipose tissue. Am J Physiol. 1995 Feb;268(2 Pt 1):E229-36

18. Ladu M. Kapsas H and Palmer W. Regulation of lipoprotein lipase in muscle and adipose tissue during exercise. J Appl Physiol. 1991; 71(2): 404- 409.

19. Ong J, Simsolo R, Saghizadeh M, Goers J, and Kern P. Effects of exercise training and feeding on lipoprotein lipase gene expression in adipose tissue, heart, and skeletal muscle of the rat. Metabolism. 1995;44(12):1596-605.

20. Paulin A, Lalonde J, Deshaies Y. Beta-adrenergic blockade and lipoprotein lipase activity in rat tissues after acute exercise. Am J Physiol. 1991;261(4 Pt 2):R891-7.

21. Magnoni L, and Weber J-M. Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: plasma lipids as a fuel for muscle. J Experim Biol. 2007, 210: 4016-4023

22. Kern PA. Potential role of TNFα and lipoprotein lipase as candidate genes for obesity. J Nutr. 1997, 127: 1971S-1922S.

23. Perreault L, Lavely JM, Kittelson JM, Horton TJ. Gender differences in lipoprotein lipase activity after acute exercise. Obes Res. 2004; 12(2): 241- 249.

24. Donahoo WT, Jensen DR, Shepard TY, and Eckel RH. Seasonal variation in lipoprotein lipase and plasma lipids in physically active, normal weight humans. J Clin Endocrinol Metab 2000, 85: 3065-3068

25. Oscai LB, Tsika RW, Essig DA. Exercise training has a heparin-like effect on lipoprotein lipase activity in muscle. Can J Physiol Pharmacol. 1992;70(6):905-9.

26. Friedman JM, Hallas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. Nature. 1998; 395: 763-770.

27. Lin X, Chavez M, Bruch R, Kilroy G, Simmons L, Lin L, et al. The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. J Nutr. 1998; 128: 1606–1613.

28. Pataly M, Lofgren I, Freake H, Koo S, and Fernandez M. The lowering of plasma lipids following a weight reduction program is related to increased expression of the LDL receptor and lipoprotein lipase. J Nutr. 2005; 135: 735–739.

Daneshvar

Medicine

Evaluation of lipoprotein lipase gene expression and activity following a session of endurance exercise in muscle tissue and plasma of rat

Seyed Ali Reza Hosseini-Kakhk[1*], Mitra Khademosharie[1], Manije Shiargar[1], Mohammad Reza Hamedinia[1], Amir Hosseini Haghighi[1], Fatemeh Rahbarizadeh[2]

1.Department of Exercise Physiology, Sabzevar Tarbiat Moallem University, Sabzevar, Iran.
2.Department of Medical Biotechnology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

E-mail: hosseini18@yahoo.com

Background and Objective: Lipoprotein lipase (LPL) is a key enzyme in lipid metabolism and maintenance of energy homeostasis. Acute and delayed response of LPL to one session of exercise has not been well studied. The purpose of the present study was to examine the effect of one session of prolonged treadmill running on soleus muscle LPL mRNA and activity and plasma LPL activity in male Wistar rats.

Materials and Methods: Twenty four male Wisatr rats (weight: 388 ± 31 g) were randomly divided into two groups: control group (n=12) and trained group (n=12). The exercised rats ran on treadmill for 120 minutes (18 m/min, 0 º incline). Rats were anesthetized, sacrificed, and blood and soleus muscle sample were taken 0, 2, and 24 h after exercise. Semi-quantitative RT-PCR was used to measure LPL mRNA level in soleus muscle. Data were analyzed using repeated measures ANOVA.

Results: The results showed that muscle LPL mRNA significantly increases 2 and 24 hours after exercise (p =0.002 and p =0.004 respectively). Also, muscle LPL activity significantly increased 2 and 24 hours after exercise (p=0.03 and p=0.007 respectively). Plasma LPL activity also significantly increased 24 hours after exercise (p =0.004).

Conclusion: The study showed that single session of prolonged exercise via increasing muscle LPL gene expression can promote triglyceride hydrolysis. Therefore, the ability of muscle for FFA oxidation increases and lipid metabolism improves.

Key words: Exercise, LPL, Rats, Muscle, Plasma

Scientific-Research Journal of Shahed University Seventeenth Year, No.93 June, July 2011

Received: 5/3/2011
Last revised: 20/6/2011
Accepted: 5/7/2011

Daneshvar(medicine) shahed University/ 18th year/2011/NO.93