تأثیر تمرین هوازی و عصاره آبی خرفه بر بیان ژنی فاکتورهای دخیل در آپوپتوز در موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان کولون

دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۹

عبدالخدر کشت ورز[۱]، مقصود پیری[۲*]، محمد علی آذربایجانی[۲]، سید علی حسینی[۳]

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۲. استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران ۳. دانشیار فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت، مرودشت، ایران

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان کولون یکی از شایع‌ترین نوع سرطان است. خرفه دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی است. هدف مطالعه حاضر بررسی تاثیر تمرین هوازی و عصاره آبی خرفه بر بیان ژنی فاکتورهای دخیل در آپوپتوز در موش‌های صحرایی مبتلا به سرطان کولون بود.

روش کار: در این مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی به‌عنوان آزمودنی انتخاب شدند و به‌صورت تصادفی در ۵ گروه شامل گروه کنترل سالم، کنترل- القای تومورکولون، تومور کولون و تمرین هوازی، تومور کولون و عصاره بذر خرفه، تومور کولون+ تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه تقسیم شدند. جهت ایجاد سرطان کولون از آزوکسی متان استفاده شد. گروه‌های دریافت‌کننده عصاره بذر خرفه ۷۵ میلی‌گرم عصاره آبی برگ خرفه را دریافت نمودند. برنامه تمرین هوازی شامل هشت هفته و هفته‌ای پنج جلسه دویدن روی نوار گردان به مدت ۶۰ دقیقه بود. پس از آخرین جلسه تمرین، موش‌ها قربانی شده و بلافاصله بافت کولون جهت سنجش بیان ژن‌ها از بدن خارج شد. میزان ژن ها با استفاده از تحلیل واریانس دوراهه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: تمرین هوازی، عصاره بذرخرفه و ترکیب این دو مداخله موجب افزایش معنادار بیان ژن‌های BAX ($p<۰/۰۰۱$)، نسبت BAX به BCL-2 ($p<۰/۰۰۱$)، Caspase-3 ($p<۰/۰۰۱$) و کاهش BCL-2 ($p<۰/۰۰۱$) شد. تفاوت معناداری بین اثر تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: احتمالا تمرین هوازی و عصاره آبی بذر خرفه موجب کنترل و بهبود نشانگران سرطان کولون می‌شوند. لذا توصیه می‌شود، این دو مداخله به‌عنوان روش کارآمدی برای مهار رشد سرطان کولون در نظر گرفته شوند.

کلیدواژه‌ها: بذر خرفه، تمرین هوازی، BAX، BCL-2، Caspase-3

***نویسنده مسئول:** استاد فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

ایمیل: m.peeri@iauctb.ac.ir **تلفن:** ۰۹۱۲۱۱۲۴۴۳۴ **نمابر:** ۰۲۱۲۲۴۸۱۶۲۲

مقدمه

سرطان کولون سومین نوع شایع سرطان و چهارمین علت شایع مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است (۱). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی، سالانه یک میلیون نفر از افراد جهان به سرطان کولون مبتلا می‌شوند (۲). سرطان کولون در سال ۱۹۵۰ بسیار نادر بود، اما به یک سرطان غالب در کشورهای غربی تبدیل شده است و اکنون تقریباً ۱۰٪ از مرگ و میرهای مرتبط با سرطان را تشکیل می‌دهد (۳). سرطان کولون در ایران طی سه دهه اخیر افزایش چشمگیری داشته است و طبق گزارش سالیانه موسسه ملی ثبت سرطان ایران، در حال حاضر از لحاظ شیوع دومین سرطان رایج در ایران است (۲). شیوع سرطان کولون در ایران ۸ نفر از هر ۱۰۰۰۰۰ نفر است (۴). تخمین زده می‌شود که هر سال در کشور ۳۶۴۱ مورد جدید سرطان رخ دهد و سالانه ۲۲۶۲ نفر در اثر سرطان کولون جان خود را از دست می‌دهند (۵). دلایلی که بروز این افزایش شامل پیری جمعیت و عادات غذایی نامناسب، سیگار کشیدن، فعالیت بدنی کم و چاقی است. بیش از ۴۰٪ از بیمارانی که درآنها سرطان کولون تشخیص داده می‌شود، بیماری‌های زمینه-ای مانند دیابت، چاقی، بیماری مزمن انسدادی ریه و نارسایی قلبی را دارند (۶). فعالیت بدنی خطر ابتلا به سرطان کولون را کاهش می دهد. مطالعات متعددی در رابطه با اثرات ورزش بر پیشگیری از عوارض وخیم سرطان و پیامد آن در این بیماران انجام شده است. همچنین برخی مطالعات نقش فعالیت ورزشی بر سرطان کولون را مورد بررسی قرار داده اند و به این نتیجه رسیده اند که کاهش فعالیت بدنی یکی از اصلی‌ترین عوامل در بروز این دو نوع سرطان می‌باشد (۶). Ahn و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که فعالیت‌های بدنی تحمل به جراحی کولون را بهبود بخشیده و دوره اقامت در بیمارستان را پس از جراحی کاهش می‌دهد (۷). مطالعات نشان داده‌اند فعالیت بدنی تا حدودی از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۶). به نظر می‌رسد فعالیت بدنی از طریق مکانیسم‌های متعددی شامل مهار تکثیر سلول‌های سرطانی، القای آپوپتوز، تنظیم متابولیسم سلول سرطانی و تنظیم سیستم ایمنی موجب پیشگیری و درمان سرطان گردد (۸). به نظر می‌رسد فعالیت بدنی در سطح سلولی از طریق اثرگذاری بر میزان آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روند از بین رفتن آنها را سرعت بخشیده و از تکثیر تومور جلوگیری می نماید (۹). شدت تمرین یکی از مهمترین عواملی است که نقش آن را در پیشگیری از سرطان تعیین می نماید. ارتباط شدت فعالیت و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی به طور مکرر مورد مطالعه قرار گرفته است (۹). در مطالعات حیوانی، تمرین با شدت متوسط می‌تواند از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری کرده و آپوپتوز را در این سلول‌ها القا نماید، که نشان از اثر محافظتی تمرینات با شدت متوسط در پیشگیری از سرطان دارد (۱۰). با این‌حال، اگر شدت فعالیت خیلی کم باشد، اثر قابل توجهی بر تکثیر سلول‌های سرطانی نداشته، ولی تمرین در شدت‌های بالا می‌تواند خود محرکی برای تکثیر سلول‌های سرطانی باشد (۱۱).

از طرف دیگر بسیاری از گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد سرطانی از ایجاد و توسعه سلول‌های سرطانی جلوگیری می-نمایند (۱۲). یکی از گیاهانی که اثرات ضد سرطانی آن مورد توجه محققان قرار گرفته است، بذر خرفه می‌باشد. بسیاری از مطالعات اثرات دارویی مختلف بذر خرفه را نشان داده‌اند. بذر خرفه دارای اثرات متعددی شامل اثر آنتی‌باکتریال کاهنده قندخون، آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضد تومور و اثرات محافظت-کننده عصبی می‌باشد (۱۳). خرفه حاوی ترکیبات زیادی از جمله فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، اسیدهای چرب امگا ۳، آلکالوئیدها، کومارین ها، فلاونوئیدها، پلی‌ساکاریدها و سایر مواد فعال است (۱۴). به‌طور خاص، طبق گزارش‌ها، دانه‌های خرفه نسبت به سایر گیاهان در آنتی‌اکسیداسیون مؤثرتر هستند (۱۵). با توجه به ترکیبات موجود در بذر خرفه گزارش شده بذر خرفه رشد و توسعه تعدادی از انواع مختلف سلول‌های سرطانی را مهار می-کند (۱۶). در همین راستا شواهد نشان می‌دهد عصاره بذر خرفه رشد سلول‌های بنیادی سرطان روده بزرگ را به‌صورت وابسته به دوز مهار می‌کند (۱۷). عصاره بذر خرفه می‌تواند از طریق القای آپوپتوز درسلول‌های سرطانی از توسعه تومور جلوگیری نماید (۱۸). در این راستا، کشت ورز و همکاران (۲۰۱۹) اثر هم-زمان عصاره بذر خرفه و تمرین هوازی را بر بیان ژن و پروتئین گیرنده‌های شبه تول ۲ و ۴ را در تومور کولون مورد بررسی قرار دادند و نتیجه گرفتند تمرین و عصاره بذر خرفه اثر یکدیگر را در کاهش بیان پروتئین TLR-2 و TLR-4 تقویت می‌نماید (۱۹). از آنجاییکه تمرین و همچنین بذر خرفه می‌توانند از طریق القای آپوپتوز در سلول سرطانی کولون روند رشد و توسعه تومور را مهار نماید، به نظر می‌رسد هم‌زمانی این دو مداخله بتواند به

عنوان راهکار مناسبی برای مهار توسعه این نوع سرطان مورد استفاده قرار گیرد. با این وجود مطالعه انجام شده در این خصوص نشان می دهد اثر همزمان این دو مداخله بر مسیر داخلی آپوپتوز تومور کولون مورد بررسی قرار نگرفته است. لذا هدف این مطالعه بررسی تأثیر تمرین هوازی و عصاره آبی خرفه بر بیان ژنی فاکتورهای دخیل در آپوپتوز در موش¬های صحرایی مبتلا به سرطان کولون بود.

روش کار

در یک مطالعه تجربی ۳۰ سر موش صحرایی نر نژاد اسپراگوداولی ۸ هفته‌ای در دامنه وزنی ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم به عنوان آزمودنی انتخاب شدند. حیوانات در قفس‌هایی از جنس پلی‌کربنات شفاف به ابعاد ۱۵*۲۶/۵*۴۲، دمای ۲۴ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۰٪ و چرخه روشنایی به تاریکی ۱۲:۱۲ با تهویه مناسب نگهداری شدند. همچنین حیوانات طی پژوهش از غذای پلت روزانه تغذیه شدند و به‌صورت آزاد از طریق بطری-های ویژه به آب لوله‌کشی شهر دسترسی داشتند. پس از آشنایی حیوانات به محیط آزمایشگاه، به‌صورت تصادفی در ۵ گروه شامل گروه کنترل سالم، کنترل القای تومورکولون، تومور کولون و تمرین هوازی، تومور کولون و عصاره بذر خرفه، تومور کولون، تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه تقسیم شدند. کلیه اقدامات انجام شده در این مطالعه بر اساس دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در امور علمی مصوب وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران طراحی و اجرا شد. جهت ایجاد سرطان کولون از آزوکسی متان (Sigma® Product No. A2853) استفاده شد. ۱۰ میلی‌گرم آزوکسی متان به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۳ هفته و هفته‌ای یک بار به موش‌ها به‌صورت درون صفاقی تزریق شد. (۱۴). بذر خرفه از مرکز جهاد دانشگاهی تهیه و شسته و سپس به مدت ۷ روز در هوا خشک شد (در دمای اتاق). دانه‌های خرفه به‌صورت پودر شده و در آب مقطر حلشدند. بذر خرفه توسط کارشناس گیاه شناسی مورد تایید قرار گرفته و شناسه گیاه به شماره ۱۵-۰۴۹۷۹، مشخص شد. گروه‌های دریافت کننده عصاره بذر خرفه، ۷۵ میلی‌گرم عصاره آبی برگ خرفه را به صورت درون صفاقی به مدت ۸ هفته و هر هفته ۵ روز دریافت نمودند. آزمودنی‌های گروه‌های تمرین هوازی قبل از شروع تمرین، ۵ روز به‌منظور آشنایی با تردمیل جوندگان به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۹ متر بر دقیقه (m/min) روی تردمیل تمرین کردند. پس از این مرحله حداکثر سرعت دویدن موش‌ها با استفاده از آزمون حداکثر سرعت دویدن روی تردمیل مشخص شد. آزمودنی‌ها در هر جلسه ۶۰ دقیقه روی نوار گردان دویدند. در هر جلسه برنامه شامل سه مرحله بود. ابتدا برای گرم کردن ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه دویدند. سپس ۵۰ دقیقه با ٪۷۰ حداکثر سرعت دویدن که برنامه اصلی فعالیت هوازی را شامل می شد دویدند و در پایان مرحله سرد کردن را به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۸ متر در دقیقه انجام دادند. برنامه تمرینی به مدت هشت هفته (۵ روز در هفته با ۲ روز استراحت) اجرا شد. ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین و دریافت عصاره بذرخرفه، تمامی موش‌ها به مدت ۸ تا ۱۰ ساعت ناشتا شده و قبل از شروع بافت برداری وزن کشی شدند. بیهوشی با استفاده از تزریق ترکیبی از کتامین و زایلازین انجام شد، پس از بیهوشی کامل و تست درد با اطمینان از عدم هوشیاری خونگیری از بطن چپ قلب انجام شد. سپس به سرعت بافت سرطانی شده از بدن خارج شده و با شستشو بافر فسفات سالین (pbs) مخاط، خون و مواد اضافی تمیز شد و توده تومور داخل میکروتیوب ml2 کدگذاری شده قرار گرفت. میکروتیوب به داخل تانک ازت انتقال پیدا نمود و سپس تا زمان آنالیزهای بیوشیمیایی و ژنتیک داخل فریزر ۸۰- نگهداری شد. پرایمرهای سنجش بیان ژن‌های Caspase-3,BAX,BCL-2 و GAPDH با استفاده از نرم‌افزار Gene Runner نسخه ۶,۵,۵۲ طراحی شد. سطوح بیان ژن‌های مورد مطالعه با روش real-time PCR سنجیده شد. بیان نسبی این ژن‌ها با نرم‌افزار REST بر اساس روش محاسبه دلتا دلتا CT ($\Delta\Delta Ct$) مشخص گردید. ژن رفرنس نیز در این مطالعه GAPDH بود. پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین بیان ژن‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

آنالیز آماری

از تحلیل واریانس دوراهه، برای تجزیه و تحلیل داده ها استفاده شد. بر اساس این مدل ابتدا اثر تمرین و مکمل خرفه به تنهایی بر پیامدهای مورد مطالعه مورد آزمون قرار گرفت. سپس اثر تعاملی تمرین و مکمل خرفه بر این پیامدها مورد آزمون قرار گرفت. جهت تعیین اثر القای سرطان کولون بر پیامدهای مورد مطالعه از آزمون t برای گروه‌های مستقل، گروه کنترل سالم و

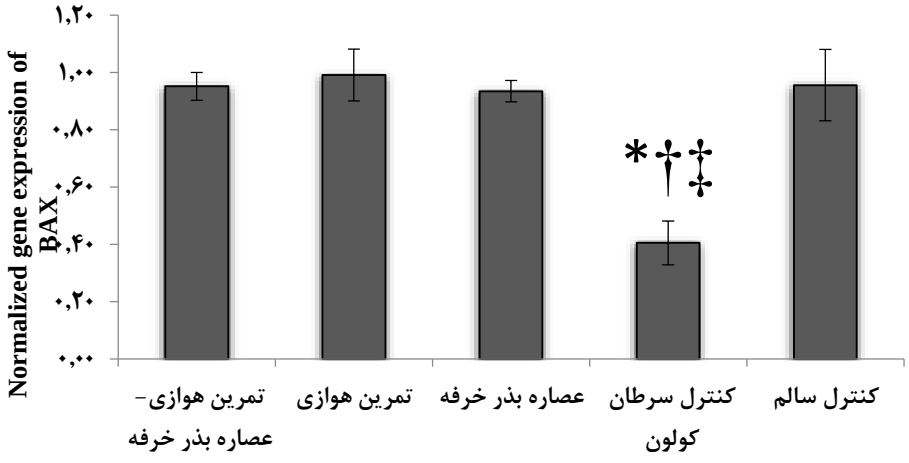
کنترل القای سرطان کولون مورد محاسبه قرار گرفت. تمام داده ها به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شده اند. سطح معناداری نیز برای تمام محاسبات ($p<0.05$) در نظر گرفته شد.

جدول۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تعیین میزان بیان ژن‌های مورد مطالعه

نام ژن	توالی پرایمر
BAX	Forward: GCA AAC TGG TGC TCA AGG Reverse: CAG CCA CAA AGA TGG TCA
BCL-2	Forward: GAGTGGGATACTGGAGATGAAG Reverse:TGGTAGCGACGAGAGAAGTC
Caspase-3	Forward: AAGTGATGGAGATGAAGGAGT Reverse:CAGGCGTGAATGATGAAGAGT
GAPDH	Forward: AAG TTC AAC GGC ACA GTC AAG G Reverse: CAT ACT CAG CAC CAG CAT CAC C

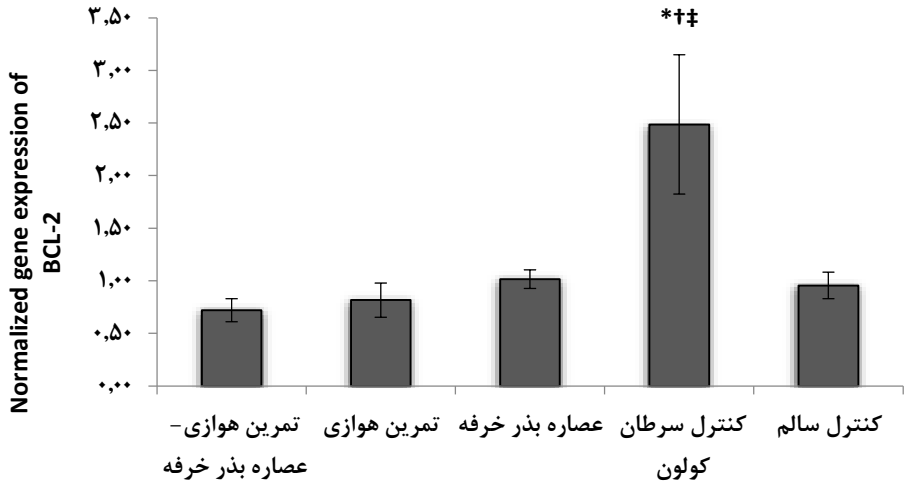
نتایج

در اثر القای سرطان کولون بیان ژن BAX ($p<۰/۰۰۱$) و بیان ژن Caspase-3 ($p<۰/۰۰۱$) بافت تومور کولون در گروه کنترل سرطان کولون نسبت به گروه کنترل سالم کاهش معنادار یافت در حالی‌که بیان ژنBCL-2 ($p<۰/۰۰۱$) و نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 ($p<۰/۰۰۱$) به‌طور معناداری نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافت (نمودار۱).



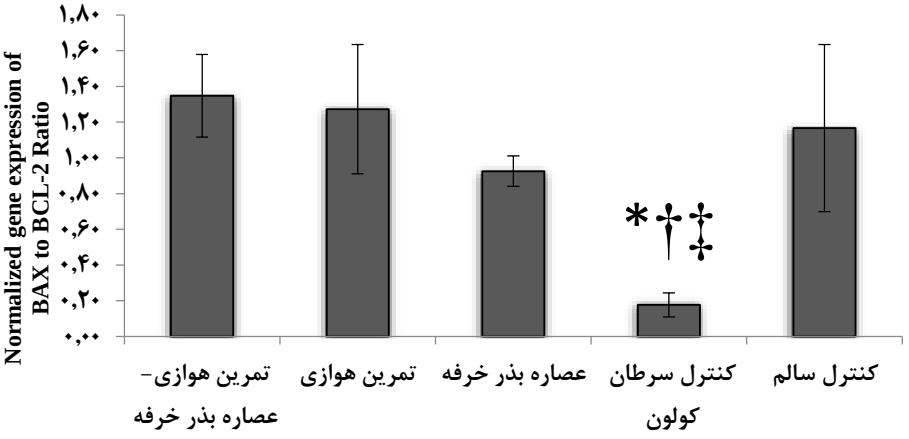
نمودار ۱. بیان ژن BAX در گروه‌های مورد مطالعه. * نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی- عصاره بذر خرفه.
†نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی. ‡ نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه عصاره بذر خرفه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

تمرین هوازی موجب افزایش معنادار بیان ژن BAX تومور کولون شد ($F=۱۲۲/۰۷, p<۰/۰۰۱ ,\eta= ۰/۸۵۹$). بذر خرفه نیز موجب افزایش معنادار بیان ژن BAX تومور کولون شد ($F=۸۰/۶۲, p<۰/۰۰۱ ,\eta= ۰/۸۰۱$). تعامل تمرین هوازی و بذر خرفه نیز افزایش معنادار بیان ژن BAX تومور کولون را به همراه داشت ($F=۱۰۸/۷۶, p<۰/۰۰۱ ,\eta= ۰/۸۴۵$). تفاوت معناداری در بیان ژن BAX تومور کولون بین گروه تمرین هوازی و گروه کنترل مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$) (نمودار۲).



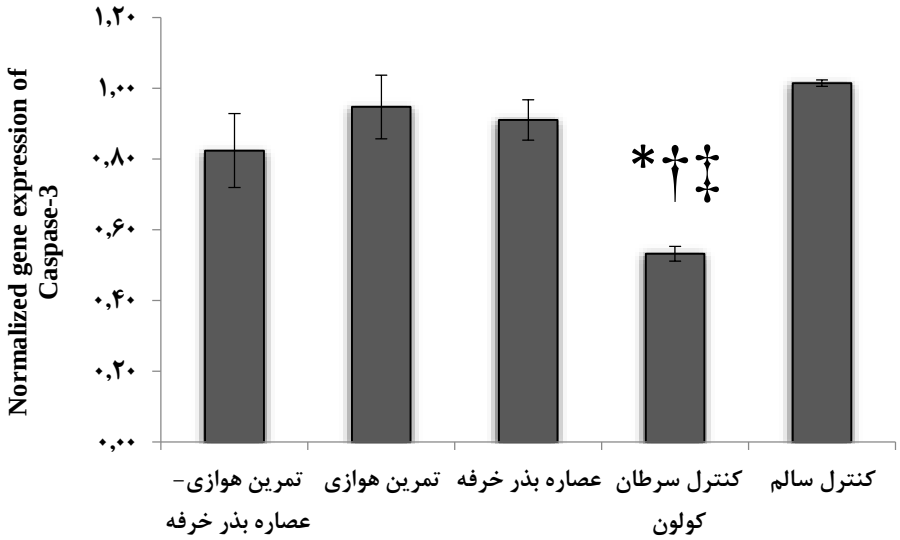
نمودار ۲. بیان ژن BCL-2 در گروه‌های مورد مطالعه. * نشانه افزایش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی- عصاره بذر خرفه. † نشانه افزایش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی. ‡ نشانه معنی‌دار نسبت به گروه عصاره بذر خرفه.

اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شده است. تمرین هوازی کاهش معنادار بیان ژن BCL-2 تومور کولون را به همراه داشت (F=۴۷/۷۴, p<۰/۰۰۱ ,η= ۰/۷۰۵). بذر خرفه نیز موجب کاهش معنادار بیان ژن BCL-2 تومور کولون شد (F=۳۰/۳۰, p<۰/۰۰۱ ,η= ۰/۶۰۲). تعامل تمرین هوازی و بذر خرفه نیز کاهش معنادار بیان ژن BCL-2 تومور کولون را موجب شد (F=۲۳/۳۹, p<۰/۰۰۱ ,η= ۰/۵۳۹). تفاوت معناداری در بیان ژن BCL-2 تومور کولون بین گروه تمرین هوازی و گروه کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (نمودار۳).



نمودار ۳. نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 در گروه‌های مورد مطالعه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است. * نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی- عصاره بذر خرفه. † نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه تمرین هوازی. ‡ نشانه کاهش معنی‌دار نسبت به گروه عصاره بذر خرفه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

تمرین هوازی نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 تومور کولون را به‌طور معناداری کاهش داد (η= ۰/۷۷۹, ۰/۰۰۱ , F=۷۰/۵۱p<) بذر خرفه نیز نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 تومورکولون را کاهش داد (η= ۰/۵۱۰, p<۰/۰۰۱ ,F=۲۰/ ۸۱). تعامل تمرین هوازی و بذر خرفه نیز کاهش معنا داری بر نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 تومور کولون داشت (η= ۰/۴۱۰, F=۱۳/۸۹, p< ۰/۰۰۱). تفاوت معناداری در نسبت بیان ژن BAX/ BCL-2 تومور کولون بین گروه تمرین هوازی و گروه کنترل مشاهده نشد (p<./۰۵) (نمودار۴).



نمودار ٤. بیان ژن CASPASE-3 در گروههای مورد مطالعه. * نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه تمرین هوازی- عصاره بذر خرفه. † نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه تمرین هوازی. ‡ نشانه کاهش معنی دار نسبت به گروه عصاره بذرخرفه. اطلاعات بر اساس میانگین و انحراف استاندارد گزارش شده است.

تمرین هوازی بیان ژن CASPASE-3 تومور کولون را به‌طور معناداری افزایش داد (η= ۰/۵۸۸, p<۰/۰۰۱ ,F=۲۸/۵۰). بذر خرفه نیز افزایش معنادار بیان ژن CASPASE-3 تومور کولون را به وجود آورد (η= ۰/۴۶۲, p<۰/۰۰۱ ,F=۱۷/۱۴). تعامل تمرین هوازی و بذر خرفه نیز موجب افزایش معنا داری بر بیان ژن CASPASE3 تومورکولون شد (η= ۰/۷۶۹, p<۰/۰۰۱ ,F=۶۶/۷۰). تفاوت معناداری در بیان ژن Caspase-3 تومور کولون بین گروه تمرین هوازی و گروه کنترل مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

بحث

یافته های این مطالعه نشان داد تمرین هوازی موجب افزایش بیان ژن BAx و Caspase-3 و کاهش بیان ژن BCL-2 می شود. در سلول‌های طبیعی مسیر آپوپتوز میتوکندری عمدتاً از طریق پروتئین‌های خانواده Bcl-2 انجام می‌شود که شامل اعضای پرواپوپتوز مانند Bax، Bak و BNIP3 می‌باشد که نفوذپذیری میتوکندری را افزایش داده و از طریق آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری مراحل بعدی آپوپتوز مانند تحریک فعال‌شدن کاسپازها، می‌نماید. از طرف دیگر اعضای ضد آپوپتوز مانند Bcl-2 و Bcl-xL با افزایش ثبات غشاء میتوکندری آزادسازی سیتوکروم C را مهار نموده و از بروز آپوپتوز جلوگیری می‌نمایند (۲۰). اما آپوپتوز روند رشد تومور را مهار می‌نماید و در این شرایط پروتئین سرکوب گر تومور p53 فعال می‌شود و به‌طور هم‌زمان Bcl-2 را سرکوب کرده و Bax را فعال می‌کند. در این وضعیت نشت سیتوکروم C از میتوکندری توسعه یافته و از تشکیل یک کمپلکس آپوپتوزوم با اتصال به فاکتور فعال‌کننده پروتئاز آپوپتوز ۱ پشتیبانی می‌کند، که مولکول‌های کاسپاز-۹ را فعال می‌کند (پس از جدا شدن زیموژن پروکاسپاز-۹) و سرانجام موجب فعال‌شدن کاسپاز -۳ به‌عنوان یکی از مهمترین فعال‌کننده‌های اپوپتوز می‌گردد (۲۱).

در شرایط سالمندی، بیماری‌های دیژنراتیو و مسمومیت با سموم تمرینات هوازی از طریق مهار BAX و فعال‌سازی

BCL-2 از بروز آپوپتوز جلوگیری می‌نماید (۲۲). اما در سلول-های سرطانی تمرینات هوازی موجب افزایش فعالیت BAx کاهش فعالیت BCL-2 و به دنبال آن فعال‌شدن آپوپتوز و مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود (۲۳). نتایج این مطالعه همسو با نتایج Campbell و همکاران می‌باشد (۲۳). در این مطالعه تمرین هوازی موجب افزایش BAX کاهش میزان BCl-2 و افزایش نسبت BAx به BCL-2 شد. که موجب افزایش آپوپتوز در تومور کولون شده و از رشد تومور جلوگیری می‌نماید (۲۳). از آنجایی که سرطان با رشد سلولی کنترل نشده همراه با کاهش آپوپتوز همراه است به‌نظر می‌رسد تمرین هوازی با افزایش آپوپتوز توانسته از رشد بی‌رویه تومور کولون در این مطالعه جلوگیری نماید. مکانیسم مولکولی اصلی که چگونه تمرینات هوازی می‌توانند موجب مهار عوامل آنتی‌اپوپتوتیک و فعال‌سازی عوامل پرو آپوپتوتیک در بافت تومور گردد به درستی معلوم نیست، اما مکانیسم‌های پیشنهادی در این خصوص مطرح شده است. از آنجایی‌که هنگام تمرین هوازی پدیده توزیع مجدد گردش خون ایجاد شده و بخش عمده‌ای از گردش خون به عضلات فعال می‌رود، گردش خون دستگاه گوارش کاهش می-یابد. در این شرایط سلول‌های بافت کولون دچار کمبود جریان خون و به دنبال آن هایپوکسی می‌گردند. بروز هیپوکسی باعث افزایش استرس اکسیداتیو و افزایش یون‌های کلسیم داخل سلولی می‌شود که مسیر داخلی آپوپتوز را فعال می‌کند (۲۴). بنابراین، ممکن است تمرینات هوازی اعمال شده در این مطالعه با ایجاد هایپوکسی در سلول‌های تومور کولون موجب توسعه گونه‌های فعال اکسیژن شده و در نتیجه با فعال‌کردن مسیر داخلی آپوپتوز، بیان ژن BAX را فعال نموده و هم‌زمان موجب کاهش بیان ژن BCL-2 شده که حاصل آن افزایش نفوذپذیری میتوکندریایی و نشت سیتوکروم C به داخل سیتوزول شده و سرانجام موجب فعال‌شدن بیان ژن کاسپاز-۳ شده است. یکی دیگر از دلایل احتمالی افزایش بیان ژن‌های آپوپتوز، تغییر در تولید استرس اکسیداتیو به دلیل تمرین هوازی در بافت تومور است. فرآیند کاهش جریان خون موضعی در بافت تومور و سپس برقراری مجدد گردش خون بافت در این مطالعه می‌تواند گونه‌های اکسیژن فعال را نیز تولید کند (۲۵)، که با اکسیدکردن بازهای پورین و پیریمیدین، به‌ویژه گوانین، به DNA آسیب می‌رساند، و باعث آپوپتوز سلول‌های سرطانی می شود (۲۶).

یافته دیگر افزایش بیان ژن BAX، نسبت bAx به BCL-2 و کاسپاز -۳ و کاهش بیان ژن BCL-2 در اثر دریافت عصاره بذر خرفه بود. مطالعه پیشین نیز اثر مهارکنندگی عصاره بذر خرفه را بر رشد و توسعه تومور کولون گزارش نمود (۲۵). Jin و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند عصاره خرفه می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطانی کولون و سلول‌های بنیادی سرطان کولون را مهار کند که این اثر وابسته به دوز می‌باشد. هر چند مکانیسم زیربنای این یافته مستلزم مطالعه بیشتر بوده و به‌طور کامل معلوم نسیت. Jin و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند روغن بذر خرفه منجر به سمیت سلولی و مهار رشد رده‌های سلولی سرطان کبد و سرطان ریه انسان می‌شود (۱۷). احتمالا عصاره بذر خرفه از طریق القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی روند مرگ این سلول‌ها را توسعه داده و از رشد آنها جلوگیری می-نماید. مطالعات قبلی اثرات مفید این عصاره را بر سلول‌های سرطانی نشان داده‌اند(۲۵). تحقیقات نشان می‌دهد عصاره بذر خرفه تکثیر، تهاجم و متاستاز رده سلولی سرطان کبد را مهار می‌کند (۲۶). از طرف دیگر به‌نظر می‌رسد عصاره بذر خرفه از طریق فعالسازی مسیر سیگنالینگ TLR4/NF-kappaB می-تواند روند اثر ضد توموری خود را القا نماید (۲۷). از طرف دیگر پلی‌ساکاریدهای خرفه دارای چندین فعالیت بیولوژیکی از جمله خواص ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی هستند. علاوه بر پلی‌ساکاریدها، سایر ترکیبات زیست فعال مانند سربروزیدها، همایزوفلاوونوئیدها و آلکالوئیدها نیز فعالیت‌های سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی را علیه رده‌های سلولی سرطان انسان نشان می‌دهند. پورتولاسربروزید A از طریق فعال‌سازی مسیر مرگ میتوکندریایی P38 MAPK و JNK، آپوپتوز سلولی در سلول‌های سرطانی کبد انسان را تحریک می‌کند (۲۸).

آخرین یافته این مطالعه اثر تعاملی تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه را بر بیان ژن‌های درگیر در روند مسیر آپوپتوز بافت تومور کولون نشان داد. به‌نظر می‌رسد تمرین هوازی و هم عصاره بذر خرفه از طریق مکانیسم‌های متفاوت موجب افزایش القای آپوپتوز در بافت تومور شده و به همین دلیل در گروهی که به طور هم‌زمان تمرین هوازی نموده و هم عصاره بذر خرفه دریافت کرده، توانسته‌اند اثر یکدیگر را بر میزان آپوپتوز تومور کولون تقویت نمایند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه اثر ضدسرطانی در بافت مبتلا به تومور کولون دارند. این دو مداخله از طریق القای آپوپتوز و فعال نمودن مسیر داخلی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی موجب توسعه مرگ این سلول‌ها می‌گردند. از طرف دیگر هر چند این دو مداخله هر یک به تنهایی از طریق مکانیسم‌های متفاوتی موجب فعال‌سازی مسیر داخلی آپوپتوز می‌شوند، اما زمانی که با یکدیگر همراه شوند، اثرات خوب همدیگر را تقویت نموده و به‌عبارتی، بهتر بر نشانگران مسیر داخلی آپوپتوز اثر سینرژیست دارند. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این مطالعه توصیه می‌گردد استفاده هم-زمان از تمرین هوازی و عصاره بذر خرفه راهکار مناسبی در جهت مهار توسعه و رشد سرطان کولون می‌باشد. با این وجود نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از کلیه کسانی که در این تحقیق همکاری لازم را داشتند تشکر می‌کنند. این مقاله برگرفته از رساله دکتری آقای عبدالخدر کشت ورز دانشجو رشته فیزیولوژی ورزشی است (با کد اخلاق به شناسه IR.IUB.M.REC.1399.028 از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت) و نویسنده هیچگونه کمک مالی از موسسات خصوصی و دولتی دریافت نکرده است.

تعارض منافع

در این پژوهش هیچگونه تعارض منافعی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

References

1. Cheng H, Jiang X, Zhang Q, Ma J, Cheng R, Yong H, et al. Naringin inhibits colorectal cancer cell growth by repressing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Experimental and therapeutic medicine. 2020;19(6):3798-804.
2. Yazdizadeh B, Jarrahi AM, Mortazavi H, Mohagheghi MA, Tahmasebi S, Nahvijo A. Time trends in the occurrence of major GI cancers in Iran. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2005;6(2):130-4. (in Persian).
3. Vasen HF, Tomlinson I, Castells A. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. Nature reviews Gastroenterology & hepatology. 2015;12(2):88-97.
4. Shadi Kolahdoozan MD M, A Sadjadi MD M, Radmard AR, Hooman Khademi MD M. Five common cancers in Iran. Archives of Iranian medicine. 2010;13(2):143. (in Persian)
5. Ekhlaspour P, Nazari Robati F, Tezerji S. The effect of resveratrol and quercetin on colon cancer. Sadra Medical Journal. 2021;9(2),119-32. (in Persian)
6. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. Annals of internal medicine. 1995;122(5):327-34.
7. Ahn KY, Hur H, Kim DH, Min J, Jeong DH, Chu SH, et al. The effects of inpatient exercise therapy on the length of hospital stay in stages I–III colon cancer patients: randomized controlled trial. International journal of colorectal disease. 2013;28(5):643-51.
8. Wang Q, Zhou W. Roles and molecular mechanisms of physical exercise in cancer prevention and treatment. Journal of Sport and Health Science. 2021;10(2):201-10.
9. Idorn M, Hojman P. Exercise-dependent regulation of NK cells in cancer protection. Trends in molecular medicine. 2016;22(7):565-77.
10. Westerlind KC, McCarty HL, Gibson KJ, Strange R. Effect of exercise on the rat mammary gland: implications for carcinogenesis. Acta physiologica scandinavica. 2002;75(2):147-56.
11. Thompson HJ. Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. Cancer research. 1994;54(7):1960-3.
12. Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, et al. Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2017;22(4):982-95. (in Persian)
13. Gu JF, Zheng ZY, Yuan JR, Zhao BJ, Wang CF, Zhang L, et al. Comparison on hypoglycemic and antioxidant activities of the fresh and dried Portulaca oleracea L. in insulin-resistant HepG2 cells and streptozotocin-induced C57BL/6J diabetic mice. Journal of ethnopharmacology. 2015;23(161):214-23.
14. Hajrezaie M, Hassandarvish P, Moghadamtousi SZ, Gwaram NS, Golbabapour S, NajiHussien A,

et al. Chemopreventive evaluation of a Schiff base derived copper (II) complex against azoxymethane-induced colorectal cancer in rats. PloS one. 2014;9(3):912-46. (in Persian)
15. Zhu H, Wang Y, Liu Y, Xia Y, Tang T. Analysis of flavonoids in Portulaca oleracea L. by UV–vis spectrophotometry with comparative study on different extraction technologies. Food Analytical Methods. 2010;3(2):90-7.
16. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Siddiqui MA. Portulaca oleracea seed oil exerts cytotoxic effects on human liver cancer (HepG2) and human lung cancer (A-549) cell lines. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. 2015;16(8):3383-7.
17. Jin H, Chen L, Wang S, Chao D. Portulaca oleracea extract can inhibit nodule formation of colon cancer stem cells by regulating gene expression of the Notch signal transduction pathway. Tumor Biology. 2017;39(7):101-4.
18. Mulla SK, Swamy PA. Anticancer activity of ethanol and polyphenol extracts of Portulaca quadrifida linn. On human colon cancer cell lines. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences. 2012;3(3):488-98.
19. Keshtvarz AK, Peeri M, Azarbayjani MA, Hosseini SA. The Effect of Aerobic Training with Purslane (Portulaca Oleracea) Seed on Toll Like Receptors in Colon Tumor Tissue of Adult Rats with Colon Cancer. Jorjani Biomedicine Journal. 2019;7(4):49-56. (in Persian)
20. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science. 1997;277(5324):370-2.
21. Vodovotz Y, Kim PK, Bagci EZ, Ermentrout GB, Chow CC, Bahar I, Billiar TR. Inflammatory modulation of hepatocyte apoptosis by nitric oxide: in vivo, in vitro, and in silico studies. Current molecular medicine. 2004;4(7):753-62.
22. Navazani P, Vaseghi S, Hashemi M, Shafaati MR, Nasehi M. Effects of Treadmill Exercise on the Expression Level of BAX, BAD, BCL-2, BCL-XL, TFAM, and PGC-1α in the Hippocampus of Thimerosal-Treated Rats. Neurotoxicity Research. 2021;39(4):1274-84. (in Persian)
23. Campbell KL, McTiernan A, Li SS, Sorensen BE, Yasui Y, Lampe JW, et al. Effect of a 12-month exercise intervention on the apoptotic regulating proteins Bax and Bcl-2 in colon crypts: a randomized controlled trial. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2007;16(9):1767-74.
24. Radi E, Formichi P, Battisti C, Federico A. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Journal of Alzheimer's disease. 2014;42(3):125-52.
25. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. Medicine and science in sports and exercise. 2001;33(3):368-70.
26. Ji Q, Zheng GY, Xia W, Chen JY, Meng XY, Zhang H, et al. Inhibition of invasion and metastasis of human liver cancer HCCLM3 cells by portulacerebroside A. Pharmaceutical Biology. 2015;53(5):773-80.
27. Zhao R, Zhang T, Ma B, Li X. Antitumor activity of Portulaca oleracea L. polysaccharide on HeLa cells through inducing TLR4/NF-κB signaling. Nutrition and cancer. 2017;69(1):131-9.
28. Zheng GY, Qu LP, Yue XQ, Gu W, Zhang H, Xin HL. Portulacerebroside A induces apoptosis via activation of the mitochondrial death pathway in human liver cancer HCCLM3 cells. Phytochemistry Letters. 2014, 7(7):77-84.

The Effect of Aerobic Exercise and Aqueous Extract of Portulaca Oleracea on Gene Expression of Factors Involved in Apoptosis in Rats With Colon Cancer

Received: 8 Mar 2022 Accepted: 19 Jun 2022

Abdol Kheder Keshtvarz[1], Maghsoud Peeri[2*], Mohammad Ali Azarbayjani[2], Seyed Ali Hosseini[3]
1. Ph.D Student, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran 2. Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran 3. Associate Professor of Sports Physiology, Department of Sports Physiology, Islamic Azad University, Marvdasht Branch, Marvdasht, Iran

Abstract

Introduction: Colon cancer is one of the most common types of cancer. Portulaca oleracea, on the other hand, has antioxidant and anti-inflammatory properties. The aim of this study was to evaluate the effect of aerobic exercise and aqueous extract of portulaca oleracea on gene expression of factors involved in apoptosis in rats with colon cancer.

Materials and Methods: In an experimental study, 30 male Sprague-Dawley rats were selected as subjects and randomly divided into 5 groups including healthy control group, tumor-induction control, colon tumor and aerobic exercise, colon tumor and portulaca oleracea seed extract. Colon tumor + aerobic exercise and portulaca oleracea extract were divided. 10 mg azoxethane per kg body weight was used to cause colon cancer. Groups receiving portulaca oleracea extract received 75 mg of aqueous extract of portulaca oleracea intraperitoneally. The aerobic exercise program consisted of eight weeks and five weekly sessions of running on a treadmill for 60 minutes. Forty-eight hours after the last training session, the mice were sacrificed and colon tissue was immediately removed from the body to measure gene expression. The amount of genes was analyzed using two-way analysis of variance.

Results: Aerobic exercise, portulaca oleracea extract and the combination of these two interventions significantly increased the expression of BAX ($p < 0.001$) genes, BAX to BCL-2 ratio ($p < 0.001$), Caspase-3 ($p < 0.001$) and decreased BCL-2 ($p < 0.001$). No significant difference was observed between the effect of aerobic exercise and portulaca oleracea seed extract.

Conclusion: Aerobic exercise and aqueous extract of portulaca oleracea may control and improve the symptoms of colon cancer. Therefore, it is recommended that these two interventions be an effective method to inhibit the growth of colon cancer.

Keywords: Portulaca oleracea seed, Aerobic exercise, BAX, BCL-2, Caspase-3

***Corresponding Author:** Professor, Department of Exercise Physiology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: m.peeri@iauctb.ac.ir **Tel:** +989121124434 **Fax:** +982122481622