پنجمین کنگره بین المللی و هفدهمین کنگره ملی ژنتیک ایران
5th International & 17th Iranian Genetics Congress
انجمن ژنتیک ایران
Iranian Genetics Society
GC17-00400495

اثر خاموشی موقت ژن مایوستاتین بر وزن نسبی عضله و چربی درون شکمی در موش صحرایی نر ویستار

Effects of MSTN silencing on abdominal fat and leg muscle relative weights in male Wistar rats

جوادمنش ع*[۱]، رشیدلمیر ا[۲]، ریاسی م[۳]، خیامی ه[۴]، خیامی ک[۴]، موحد نسب م[۳]

[۱] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد. javadmanesh@um.ac.ir

[۲] دانشیار گروه گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] دانشجوی دکتری علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

[۴] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزشی، دانشگاه فردوسی مشهد

Javadmanesh A.[1*], Rashidlamir A.[2], Riasi M[1], Khayami H[2], Khayami K[2], Movahed Nasab M[1]

1-Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

2-Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

چکیده

میوستاتین (MSTN) نقش کلیدی در کنترل رشد و توسعه بافت عضلانی اسکلتی دارد. کمبود بیان MSTN می تواند منجر به رشد بیش از حد این بافت شود. مولکول‌های طراحی شده بر مبنای الیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس می‌توانند بیان ژن را به شیوه‌ای خاص تنظیم کنند. ثابت شده است که یک روش جدید مهار بیان ژن مبتنی بر DNA، بیان MSTN را در مدل موش کاهش می‌دهد. هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری MSTN با استفاده از روش DNAi بر وزن نسبی بافت چربی احشایی و عضلات پا در موش صحرایی ویستار نر تحت تمرین مقاومتی بود. موش‌های صحرایی نر چهار هفته ای در دو گروه با میانگین وزن ۲۱۰ گرم انتخاب شدند. این گروه‌ها شامل:۱- گروه تزریق‌شده با DNAi (n=6) DNA و گروه شاهد ورزشی (n=۸) بودند. موش‌ها به مدت چهار هفته تمرین مقاومتی انجام دادند و وزن آنها در پایان هر هفته ثبت شد. در نهایت وزن هر گروه با آزمون t اندازه گیری شد. نتایج نشان می‌داد برخلاف آنچه فرض می‌شد، مولکول طراحی‌شده تأثیر قابل‌توجهی بر کاهش وزن نسبی بافت چربی احشایی و افزایش وزن نسبی عضلات پا نداشت. علت این عدم تغییر وزن ممکن است در اثر مدت زمان کوتاه آزمایش باشد.

کلمات کلیدی: DNAi، رت، ژن مایوستاتین، عضله

Abstract

Myostatin (MSTN) has a key role in controlling growth and development of skeletal muscle tissue. Deficiency in MSTN expression could result in over-growth of this tissue.

Oligonucleotide antisense molecules could regulate gene expression in a specific manner. A novel DNA-based oligonucleotide has been proved to down-regulate MSTN expression in a mouse model. The aim of this study was to assess the effect of MSTN inhibitory on a DNAi on abdominal fat and leg muscle weights of Wistar rat under resistance training. Four-week-old male rats in two groups with the average weight of 210g were selected. These groups included: DNAi injected group (n=6) and placebo group (n=8). Rats did resistance training for four weeks and their weight was recorded at the end of each week. Finally, the weight of each group was measured by t-test. The results illustrate that contrary to what was thought, the designed molecule did not have a significant effect on relative weights of leg muscles or abdominal fat. This could be due to the insufficient period of experiment.

Key words: DNAi, Rat, Myostatin, Muscle

مقدمه

مطالعات مولکولی حاکی از آن هستند که ژن مایوستاتین چندشکلی بوده و همچنین پروتئینی است شامل دو زیر واحد مشابه، که هر زیر واحد از ۱۱۰ اسیدآمینه تشکیل شده است (۱). ژن مایوستاتین بر روی کروموزوم شماره ۹ رت قرارگرفته و در تمامی گونه‌ها دارای ۳ اگزون و ۲ اینترون است (۲). مایوستاتین در عضله اسکلتی تولید و بیان‌شده سپس وارد خون می‌شود. این ژن به دلیل توانایی مهار تمایز و رشد عضله، به مایو و استاتین نام‌گذاری می‌شود (۳).

امروزه استفاده از روش‌های مبتنی بر الیگونوکلوتئیدهای آنتی‌سنس به‌منظور درمان بیماری‌های متعدد ناشی از بیان ژن‌های جهش‌یافته و یا عدم بیان ژن‌های طبیعی در تحقیقات پزشکی، دارویی و کشاورزی کاربرد فراوان دارد. از مهارکننده‌هایی که در حوزه فناوری‌های الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس قرار می‌گیرند عبارتند از: ۱- روش‌های مبتنی بر RNA interference (RNAi) که از ۴ مولکول RNA دو رشته‌ای کوچک ۲۱-۲۲ نوکلئوتیدی با نام siRNA، با طول تقریبا ۷.۵nm و قطر ۲nm ساخته شده است. siRNAها می‌توانند با مصرف انرژی، پس از شکست RNA دو رشته‌ای بلند توسط آنزیم دایسر که فعالیت ریبونوکلئازی داشته، ایجاد و mRNA هدف را بشکنند. با تخریب mRNA هدف بیان ژن متوقف شده که به این حالت اصطلاحا خاموشی ژن پس از رونویسی گفته می‌شود (۴). ۳- روش‌های مبتنی بر DNA interference (DNAi) که روشی جدید برای خاموش کردن ژن‌ها به‌حساب می‌آید. در این فرآیند یک مولکول تک‌رشته‌ای DNA با طول ۳۴-۲۴ نوکلئوتید، غالبا مکمل ناحیه خاصی از پروموتور ژن طراحی شده و با اتصال به این ناحیه موجب توقف عمل رونویسی می‌شود (۵ و ۶).

عضله اسکلتی یک بافت سازگارپذیر است که به نیازهای محیطی و فیزیولوژیکی مانند رشد، عملکرد ورزشکاران و غیره پاسخ می‌دهد. علاوه بر این پاسخ‌های فیزیولوژیکی مثبت، اختلال در توده و عملکرد عضلانی در اثر کهولت، بیماری و همچنین بی‌تحرکی کاهش می‌یابد که به‌طور عمده تحت کنترل ژنتیک و مسیرهای سیگنالینگ تنظیم می‌گردد (۷). تغییر در توده‌ی عضله، در نتیجه عدم تعادل بین سنتز و تجزیه‌ی پروتیین اتفاق می‌افتد که به نوع و میزان فعالیت جسمانی بستگی دارد (۸).

از آنجا که تاکنون مطالعات زیادی در مورد اثربخشی استفاده از مولکول DNAi در مهار بیان در رت وجود ندارد. هدف از مطالعه پیش‌رو بررسی تاثیر مولکول طراحی شده DNAi در افزایش وزن عضله در رت است. در این مطالعه رت‌ها علاوه بر تزریق این مولکول از تمرین مقاومتی نیز استفاده کردند.

مواد و روش‌ها

طراحی DNAi: در ابتدا توالی پروموتور ژن مایوستاتین رت توسط وب‌سایت NCBI تهیه شد. سپس با کمک معیارهای طراحی DNAi (رودریگز و همکاران، ۲۰۱۶)، توالی AAT(X)AACTCACA(X)AGGCTTAAA(X)GCA'3 5'TAT مکمل ناحیه پروموتور و به طول ۲۶ نوکلئوتید انتخاب شد. به‌منظور پایدار کردن این توالی در برابر آنزیم‌های RNase درون‌سلولی، اصلاح شیمیایی فسفوروتیوات (مناطق مشخص‌شده با حرف x) روی توالی DNAi قرار داده شد. جهت اطمینان از عدم وجود اهداف غیراختصاصی از برنامه تحت وب NCBI-Blast استفاده شد. درنهایت این توالی توسط شرکت ژن فناوران (تهران، ایران) سنتز شد.

جهت انجام پژوهش پیش‌رو تعداد ۲۴ رت سالم، نر و چهار هفته‌ای نژاد ویستار خریداری شدند و در محل آزمایشگاه حیوانات دانشکده تربیت بدنی دانشگاه فردوسی مشهد نگهداری شدند. طبق پروتکل رفتار با حیوانات براساس اصول بیانیه هلسینکی، رت‌ها در گروه‌های سه الی دو درون قفس‌هایی از جنس پلیکربنات، در دمای ۲۲ تا ۲۴ °C و چرخه روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته، با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. پس از سه روز سازگاری با محیط، مرحله آشناسازی با پروتکلهای تمرینی مقاومتی طی یک هفته و هر هفته سه جلسه انجام گرفت. رت‌ها به‌طور تصادفی به دو گروه با میانگین وزن ۲۱۰ گرم به شرح زیر تقسیم شدند: ۱- گروه تیمار با تزریق DNAi (به میزان 10 $\mu g/kg$ وزن بدن) ۲- شاهد با تزریق سرم فیزیولوژیک. تزریق‌های بصورت صفاقی و سه نوبت در هر هفته انجام گرفت.

پروتکل تمرین مقاومتی: یک هفته آشناسازی با تمرینات مقاومتی روی نردبانی به‌طول ۱ متر و نرده‌های (2 سانتی‌متری) با شیب ۸۵ درجه، طوری انجام شد که رت‌ها برای بالا رفتن از نردبان، بدون وزنه، در پایین آن قرار داده می‌شدند. پس ازیک هفته آشناسازی، تمرینات اصلی شامل سه جلسه در هفته، هر جلسه سه ست و هر ست با پنج تکرار بود که به‌مدت چهار هفته انجام شد. زمان استراحت بین تکرارها یک دقیقه و بین ستها دو دقیقه بود. میزان وزنه ۵۰ ٪وزن هر رت در اولین هفته از دوره تمرینی در نظر گرفته شد که با ۱۰ ٪افزایش در هر هفته ادامه یافت. جهت تعیین میزان وزنه، وزن هر رت، هر هفته اندازه‌گیری شد. برای اتصال وزنه‌ها به دم حیوان در قسمت نزدیک به تنه، از چسب نواری استفاده شد.

آنالیز آماری: وزن بدن هر رت در هر هفته اندازه‌گیری شد. در نهایت آنالیز داده‌های حاصل از وزن بدن با تست T در SAS آنالیز شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از وزن بدن در دو گروه تیمار شده با DNAi در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌داد تفاوت وزن در دو گروه در طول چهار هفته مداخله معنی‌داری نبوده است (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین وزن بدن رت در دو گروه تیمار و کنترل

گروه‌های آزمایشی	میانگین وزن بدن تیمار DNAi	میانگین وزن بدن شاهد	معنی‌داری
هفته صفر	۲۱۳.۳۳	۲۱۲.۳۱	۰.۹۵
هفته اول	۲۳۷.۹۸	۲۲۸.۳۳	۰.۶۸
هفته دوم	۲۵۲.۲۶	۲۴۲.۶۹	۰.۶۷
هفته سوم	۲۵۶.۰۰۱	۲۵۵.۳۰	۰.۶۶
هفته چهارم	۲۷۸.۱۳	۲۶۷.۳۵	۰.۶۱

در سالهای اخیر مطالعات زیادی با کمک‌گرفتن از الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس توانسته‌اند عملکرد ژنی را مختل کنند. یکی از جدیدترین این روش ها DNAi است که ما در این مطالعه سعی کردیم تاثیر استفاده از این روش بر افزایش وزن بدن را همزمان با تمرین ورزشی مقاومتی در رت‌ها بسنجیم. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد اگرچه میانگین وزن در گروهی که تزریق صفاقی DNAi را دریافت کرده بودند در طی چهار هفته بیشتر بود اما این اختلاف از نظر آماری معنی‌داری نشد. نتایج این مطالعه در راستای بسیاری از مطالعاتی بودند که از الیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس برای مهار بیان ژن استفاده کرده بودند (۹ و ۱۰). در این مطالعات نیز هماند پژوهش پی رو زمانی که از این مولکول‌های بصورت صفاقی استفاده می‌شد تاثیر معنی‌داری در افزایش وزن بدن مشاهده نشد. از دلایل وقوع این پدیده می‌توان به کاهش بافت چربی تجمعی در بافت‌ها بعلت افزایش توده عضلانی اشاره کرد (۱۱). در بسیاری از مطالعات اگرچه تغییر قابل ملاحظه‌ای در افزایش وزن بدن مشاهده نشده اما استفاده از این مولکول‌ها در مهار بیان ژن مایوستاین بطور قطع اثر گذار ارزیابی شد که نیاز است در ادامه این پژوهش میزان بیان ژن در عضلات نیز اندازه‌گیری شود. همچنین در مطالعات آتی شاید بتوان با افزایش دفعات تزریق، بالا بردن دوز و تزریق عضلانی تفاوت عملکرد این مولکول در رت را بهتر تخمین زد.

1- Bellinge, R., Liberles, D., Iaschi, S., O'brien, P., & Tay, G. (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. Animal genetics, 36(1), 1-6 .

2- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. nature, 391(6669), 806-811 .

3- McPherron, A. C., Lawler, A. M., & Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-p superfamily member. nature, 387(6628), 83-90 .

4- Carmell, M. A., Xuan, Z., Zhang, M. Q., & Hannon, G. J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. Genes development, 16(21), 2733-2742 .

5- Tolcher, A. W., Rodrigueza, W. V., Rasco, D. W., Patnaik, A., Papadopoulos, K. P., Amaya, A., . . . Sooch, M. P. J. C. c. (2014). A phase 1 study of the BCL2-targeted deoxyribonucleic acid inhibitor (DNAi) PNT2258 in patients with advanced solid tumors. Cancer chemotherapy pharmacology, 73(2), 363-371 .

6- Riasi, M., & Javadmanesh, A. (2020, November). Limitations of DNA Interference in Targeted Drug Delivery. In International Congress on Biomedicine 2020.

7- Stewart CE, Rittweger J. Adaptive processes in skeletal muscle: molecular regulators and genetic influences. J Musculoskelet Neuronal Interact 2006;6(1):73-86.

8- Watson, K., & Baar, K. (2014, December). mTOR and the health benefits of exercise. In Seminars in cell & developmental biology (Vol. 36, pp. 130-139). Academic Press.

9- Riasi, M., Mozaffari Jovin, S., & Javadmanesh, A. (2022). Effect of Intramuscular and Intraperitoneal Injections of conjugated MSTN-siRNA-cholesterol on Inhibition of Myostatin Gene expression. Journal of Cell and Molecular Research, 14(1), 20-27.

10- Kinouchi, N., Ohsawa, Y., Ishimaru, N., Ohuchi, H., Sunada, Y., Hayashi, Y., . . . Noji, S. (2008). Atelocollagen-mediated local and systemic applications of myostatin-targeting siRNA increase skeletal muscle mass. Gene therapy, 15(15), 1126-1130 .

11- McPherron, A. C., & Lee, S.-J. (2002). Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. The Journal of clinical investigation, 109(5), 595-601