Physiology and Pharmacology, 18 (4), 373-382

Winter 2015 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Ursolic acid induces myoglobin expression and skeletal muscle remodeling in mice

Nuredin Bakhtiari[1], Masoud Soulemani[2,3], Mohammad Javan[4], Roohullah Hemmati[5], Saman Hosseinkhani[1*]

1. Dept. of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Dept. of Stem Cell Biology, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
4. Dept. of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Dept. of Biotechnology, Faculty of Science and Modern Technology, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

Received: 3 Aug 2014 **Accepted: 4 Sept 2014**

Abstract

Introduction: Ursolic Acid (UA) is a lipophilic triterpenoid compound, found in large amounts in apple peel. Anabolic effects of UA on the skeletal muscle and the role of this tissue as a key regulator of systematic aging aroused this question in mind whether UA might amend skeletal muscle performances such as myoglobin expression and also whether it switches skeletal muscle fibers from glycolytic to oxidative.

Methods: In this study, 20 male C57BL/6 mice, aged 10 months, were used and divided to 2 groups. One group received UA (200 mg/kg) + corn oil as vehicle, and the other group was given only corn oil, intraperitoneally. Injection was done twice a day for 7 days, after which skeletal muscle was isolated and evaluated for myoglobin expression and fiber typing by western blotting and mATPase histochemistry techniques.

Results: UA caused myoglobin over-expression ($p<0/01$). It also changed anaerobic glycolytic muscle fibers into fast-oxidative (~ 30%) and slow-oxidative (4%) fibers.

Conclusion: It seems that UA mimics beneficial effects of exercise through up-regulation of myoglobin expression and switching of muscle fiber types into oxidative fibers. It may be proposed as a good candidate for treatment of skeletal muscle dysfunction.

Key words: Ursolic Acid, Myoglobin, Skeletal Muscle, Slow-oxidative, Fast-oxidative

* Corresponding author e-mail: Saman_h@modares.ac.ir
Available online at: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۸ (٤)، ۳۷۳ – ۳۸۲
زمستان ۱۳۹۳

فیزیولوژی و فارماکولوژی

اورسولیک اسید بیان میوگلوبین و تغییرات بافت ماهیچهٔ اسکلتی را در موش القاء می‌کند

نورالدین بختیاری[۱]، مسعود سلیمانی[۲،۳]، محمد جوان[۴]، روح‌الله همتی[۵]، سامان حسینخانی[۱*]

۱. گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲. گروه خون شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳. گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات فناوری سلول‌های بنیادی، تهران
۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۵. گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فنون پیشرفته، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی کرمان، کرمان

دریافت: ۱۲ مرداد ۹۳ پذیرش: ۱۳ شهریور ۹۳

چکیده

مقدمه: اورسولیک اسید یک ترکیب تری ترپنوئید و چربی دوست است که به فراوانی در پوست سیب یافت می‌شود. اثرات آنابولیک این ترکیب در بافت ماهیچه اسکلتی و همچنین نقش کلیدی این بافت در مطالعات سیستماتیک پیری، این سؤال را در ذهن ما به وجود آورد که آیا اورسولیک اسید ممکن است بر عملکرد بافت ماهیچه اسکلتی که شامل افزایش بیان میوگلوبین و تغییرات بافت ماهیچه اسکلتی از نوع غیرهوازی به هوازی اثر بگذارد.

روش ها: در این مطالعه از ۲۰ سر موش نر C57BL/6 ۱۰ ماهه استفاده شد که به ۲ گروه تقسیم شدند. به یک گروه از آنها اورسولیک اسید و روغن ذرت و به گروه بعدی فقط روغن ذرت به صورت داخل صفاقی در ۲ نوبت به مدت ۷ روز تزریق شد. سپس بعد از جداسازی بافت ماهیچه اسکلتی و استخراج پروتئین به ترتیب برای بررسی بیان میوگلوبین و تغییرات بافتی از تکنیک‌های وسترن بلات و اکتومیوزین mATPase هیستوشیمی استفاده شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که اورسولیک اسید به طور معناداری منجر به افزایش بیان میوگلوبین شد ($p<0/01$). بعلاوه، همچنین نشان داده شد که اورسولیک اسید با افزایش بیان میوگلوبین منجر به تغییر بافت ماهیچه اسکلتی از نوع غیر هوازی گلیکولیتیک به نوع هوازی تند انقباض (۳۰٪) و کند انقباض (۴٪) شد.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که اورسولیک اسید با افزایش بیان میوگلوبین و تغییرات بافت ماهیچه اسکلتی به سمت اکسیداتیو اثرات مثبت ورزش را تقلید می‌کند. همچنین می‌توان اورسولیک اسید را به عنوان یک کاندیدای خوب برای درمان بیماری‌های مرتبط با بافت ماهیچه اسکلتی پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: اورسولیک اسید، میوگلوبین، ماهیچه اسکلتی، کند اکسیداتیو، تند اکسیداتیو

مقدمه

ماهیچه اسکلتی نقش مهمی را در انجام حرکت، تنفس، حفظ موقعیت بدن، تولید گرما در هنگام تنش سرمایی و همچنین حفظ تعادل گلوکز بدن را بعهده دارد [۳]. در حدود ۸۰-۵۰ درصد گلوکز گردشی خون به وسیله بافت ماهیچه اسکلتی جذب می‌شود [۳]. به همین دلیل است که چندین مطالعه مروری برجسته از این بافت به عنوان موتور بیولوژی بدن یاد کرده‌اند [۱۸]. این بافت از یکسری الیاف ماهیچه‌ای تشکیل شده است که این الیاف با ایجاد انقباض در ماهیچه‌ها منجر به تولید نیرو می‌شوند [۲۲]. الیاف ماهیچهٔ اسکلتی را

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: Saman_h@modares.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

براساس تغییرات رنگی آنها به ۲ دسته تقسیم می کنند. الیاف ماهیچه ای نوع ۱ که دارای میزان بالایی از میوگلوبین، میتوکندری و رگ‌های خونی فراوانی هستند. همچنین این الیاف به دلیل اینکه برای تولید ATP از متابولیسم هوازی استفاده می کنند از قدرت تحمل زیادی برخوردار هستند و دیرتر دچار خستگی می شوند. الیاف ماهیچه ای نوع ۲ که خود به ۲ دسته تقسیم می‌شوند، نوع IIA و IIB. الیاف ماهیچه‌ای نوع IIA که از نوع اکسیداتیو/گلیکولیتیک می‌باشند که دارای میزان بالایی از میوگلوبین و میتوکندری هستند و اما الیاف ماهیچه ای نوع IIB دارای میوگلوبین و میتوکندری پایینی هستند و قدرت تحمل پایین تری دارند و زود نیز دچار خستگی می‌شوند [۶].

گزارش شده است که در افراد مسن به تدریج از قدرت بافت ماهیچه اسکلتی کاسته می‌شود و تغییرات این بافت بیشتر به سمت نوع IIB است [۵]. همچنین در مطالعات دیگر آمده است که در افراد دیابتی بافت ماهیچه اسکلتی ضعیف شده و قابلیت جذب گلوکز را ندارند [۱۷].

اورسولیک اسید یک ترکیب چربی دوست است که در پوست سیب، باسیل، قره قاط، نخل‌های پیر، نعناع بیابانی، رزماری، پونه کوهی، آویشن کرک آلود، درخت کویچ، آلو دیده می‌شود [۱۳]. اثرات بیولوژیکی این ترکیب شامل فعالیت ضد توموری [۱۴]، ضد التهاب [۱۹]، ضد دیابت [۱]، ضد–HIV [۱۰]، ضد مالاریا [۹]، ضد–باکتری [۲۹]، محافظت از کبد [۲۷]، ضد اکسیداتیو [۲۶] و بسیاری از فعالیت های دیگر که گزارش شده است . این ترکیب قادر به مهارسازی مسیر STAT (signal transducer and activator of transcription) در انواع سلول‌های سرطانی می باشد [۲۱]. مطالعات نشان داده است که اورسولیک اسید مانع تحلیل ماهیچه اسکلتی می‌شود [۱۲]. این گروه همچنین گزارش کردند که اورسولیک اسید باعث افزایش حجم و قدرت این بافت در حیوانات آزمایشگاهی می‌شود. اخیراً گزارش شده است که اورسولیک اسید از یک طرف باعث افزایش چربی قهوه‌ای و مصرف انرژی و از طرف دیگر موجب کاهش چاقی، بافت سفید چربی، عدم تحمل گلوکز و بیماری کبد چرب در موش‌های مدل آزمایشگاهی می شود [۱۱]. این گروه همچنین گزارش کردند که اورسولیک اسید از یک طرف با کاهش بیان ژن های مسئول تحلیل عضلانی (atrogin-1 و MuRF1) و از طرف دیگر با افزایش بیان ژن های مسیر آنابولیک (پروتئین کیناز B) در افزایش حجم بافت ماهیچهٔ اسکلتی نقش دارد [۱۱].

مطالعات برجسته صورت گرفته بر روی اورسولیک اسید در بافت ماهیچه اسکلتی این سؤال را در ذهن به وجود آورد که آیا اورسولیک اسید می‌تواند عملکرد بافت ماهیچهٔ اسکلتی را از طریق افزایش بیان میوگلوبین و همچنین تغییر در نوع بافت ماهیچه اسکلتی از نوع غیر هوازی به هوازی ایجاد کند که این خود بیانگر پیروی از اثرات مثبت ورزش می باشد.

مواد و روش ها

در این مطالعه از موش‌های نر ۱۰ ماهه C57BL/6 با میانگین تقریبی وزن ۲ ± ۳۰ که از انستیتو پاستور تهیه‌شده بودند، استفاده شد. این حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند. حیوانات برای عادت کردن به شرایط به مدت ۳ هفته قبل از شروع آزمایش، در محیط جدید نگهداری می شدند. همچنین، علاوه بر شرایط طراحی‌شده، حیوانات تحت یک شرایط غذایی استاندارد قرار داشتند (Harlan Teklad formula 7013). در این مطالعه از تعداد ۲۰ موش نر استفاده شد و آنها را به ۲ گروه طبقه بندی شدند. ۱۰ سر از موش ها اورسولیک اسید و روغن ذرت دریافت کردند و به ۱۰ سر دیگر فقط روغن ذرت که حلال اورسولیک اسید است، بصورت داخل صفاقی تزریق شد، لازم به ذکر است که همانطور که در مطالعهٔ گذشته بررسی شده بود روغن ذرت فقط بعنوان حلال اورسولیک اسید عمل می‌کند [۱۲]. اورسولیک اسید (Enzo Life Sciences) در روغن ذرت به عنوان حلال نسبت ۲۰ mg/ml آماده کرده و به هر حیوان ۲۰۰ mg/kg اورسولیک اسید به مدت ۷ روز و روزی ۲ نوبت تزریق می‌گردید [۱۲]، در این تحقیق تمام شرایطی که برای حیوانات تیمار با اورسولیک اسید مهیا شده بود برای حیوانات گروه کنترل نیز فراهم شده بود با این تفاوت که به حیوانات این گروه فقط روغن ذرت تزریق می شد. برای اندازه‌گیری گلوکز خون ناشتا، موش‌ها را برای مدت ۱۶ ساعت گرسنه نگه داشته می‌شدند و از رگ دمی حیوانات خون تهیه

می شد. سپس با کمک دستگاه Accucheck Aviva glucose meter گلوکز خون آن‌ها اندازه‌گیری می‌گردید. سپس برای اندازه‌گیری میزان میوگلوبین در بافت ماهیچه اسکلتی حیوان، بافت‌های ماهیچه‌ای مختلفی که شامل: Rectusfemoris، GluteusMaximus، Gastrocnemius و Tibialis Anterior بودند جداسازی و پس از استخراج پروتئین با تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعین نوع بافت ماهیچه اسکلتی ابتدا حیوانات وزن شدند و سپس با داروی کتامین/زالین بی‌هوش شده و پس از عمل تثبیت شدن بافت‌ها، بافت Rectus femoris را جدا کرده و سپس با کمک تکنیک mATPase هیستوشیمی هوازی و یا غیر هوازی بودن آنها تعیین می شد. در پایان قابل‌ذکر است که همه روش‌های آزمایشگاهی اعمال بر روی حیوانات (موش) توسط موسسه حمایت از حیوانات و کمیته مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، بیمارستان شریعتی، تهران، ایران به تصویب رسید.

پرفیوزاسیون و تثبیت بافت‌ها: مواد تثبیت کننده شامل پارافورمالدئید ۴٪ در PBS، ۵٪. گلوتارآلدئید و هپارین ۲٪. در PBS. در این روش ابتدا حیوانات با کتامین (۷۵ mg/ml) و زایلازین (۵ mg/ml) بی‌هوش می‌شدند. تقریباً بعد از ۱۰ دقیقه و اطمینان از بی هوشی کامل حیوان به آرامی جداره سینه آنها باز می شد، پس از نمایان شدن قلب محلول‌های فیکساسیون بالا به همراه هپارین توسط سوزنی به بطن چپ حیوان وارد می شد و سپس از طریق دهلیز سمت راست که قبلاً شکافته شده بود بعد از اینکه با عمل پمپ زنی قلب به سرتاسر بدن منتشر می شد خارج می گردید. در زمان پر فیوز کردن رنگ نمونه از سرخی به بی‌رنگی و پس از آن به زردی می‌رود و نمونه‌ها سخت تر می‌شوند. معمولاً زمان پر فیوز کردن بین ۴۵-۲۰ دقیقه طول می‌کشید.

تعیین نوع بافت ماهیچه اسکلتی با کمک آزمون myofibrillar actomyosine histochemistry ATPase:

برای تعیین نوع بافت ماهیچه اسکلتی (اکسیداتیو یا گلیکولیتیک) ابتدا محلول‌های زیر تهیه می شد. ۱) ۳ سی‌سی اسید استیک غلیظ در ۲۵۰ سی‌سی آب مقطر، ۲) ۳/۲۴ گرم سدیم استات در ۲۰۰ سی‌سی آب مقطر، ۳) ۴/۱۲۵ گرم ورونال سدیم در ۲۰۰ آب مقطر و ۴) ۲/۶۵ گرم کلسیم کلراید در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر. بعد از تهیه محلول‌ها ۳ استوک محلولی با pH های مختلف تهیه می‌کردیم. ۱) محلول استوک با pH (۴/۳۵) [۱۳۰cc] استوک ۱ + ۷۰۰ cc استوک۲]، ۲) محلول استوک با pH (۴/۶۳) [۱۰۰cc استوک ۱ + ۱۰۰ cc استوک ۲]، ۳) محلول استوک با pH (۱۰/۲) [۴۰۰cc استوک ۳ + ۲۰ cc استوک ۴ + ۴۰ cc آب مقطر] و، ۴) (pH) ۱۰/۲ + ATP [۴۲۰cc آب مقطر + ۶۰ cc استوک ۴ + ۱۲۰ cc استوک ۳] به ازای هر ۲۰ cc این محلول ۰/۰۳ گرم پودر ATP اضافه می‌کردیم. بعد از تهیه این محلول‌ها برای رنگ‌آمیزی بافت به این شیوه عمل می‌کردیم. ۱) به مدت ۱۰ دقیقه نمونه‌ها را در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ در محلول استوک با pH (۱۰/۲) انکوبه می‌کردیم، ۲) شستشو با آب مقطر، ۳) به مدت نیم ساعت نمونه‌ها را در محلول استوک (pH) ۱۰/۲ + ATP در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ انکوبه می‌شد، ۴) شستشو با آب مقطر، ۵) به مدت ۵ دقیقه انکوبه در $COCl_2$ (۲٪)، ۶) شستشو با آب مقطر، ۷) قرار دادن نمونه‌ها در سولفیت آمونیوم به مدت چند ثانیه [۱۰ cc سولفیت آمونیوم + ۹۰ cc آب مقطر] و، ۸) آبگیری در الکل با غلظت‌های نزولی [۴].

سنجش میزان میوگلوبین با استفاده از تکنیک وسترن بلات: در انتهای پروتکل آزمایش حیوانات قربانی می‌شدند و عضلات Rectus femoris، Gluteus Maximus، Gastrocnemius و Tibialis Anterior جدا می‌گردید و پس از تقسیم آنها به قطعات سریعاً در فریزر (۸۰ $^{\circ}C$ -) نگهداری می‌شدند. برای انجام وسترن بلات و هموژنیزه نمودن بافت‌ها، حدود ۵۰ میلی‌گرم از عضله مورد نظر درون میکروویال‌های مخصوص که حاوی یک گرید فلزی است منتقل می‌شد و سپس ۱ میلی لیتر بافر لیز کننده RIPA (Tris–HCL 50 mM, pH 7/4; NP-40 1%; Na-deoxycholate 0.25%; NaCl 150 mM; ethylenediaminetetraacetic acid 1 mM) که حاوی کوکتل مهارکننده پروتئازی (سیگما R1321) بود اضافه می‌شد و به مدت ۵ دقیقه درون دستگاه همگن ساز (T25 Basic tissue homogenizer, Germany) گذاشته می‌شد تا کاملاً بافت‌ها هموژنیزه و لیز شوند. سپس بعد از تعیین غلظت پروتئین‌ها با روش رنگ سنجی *BCA*

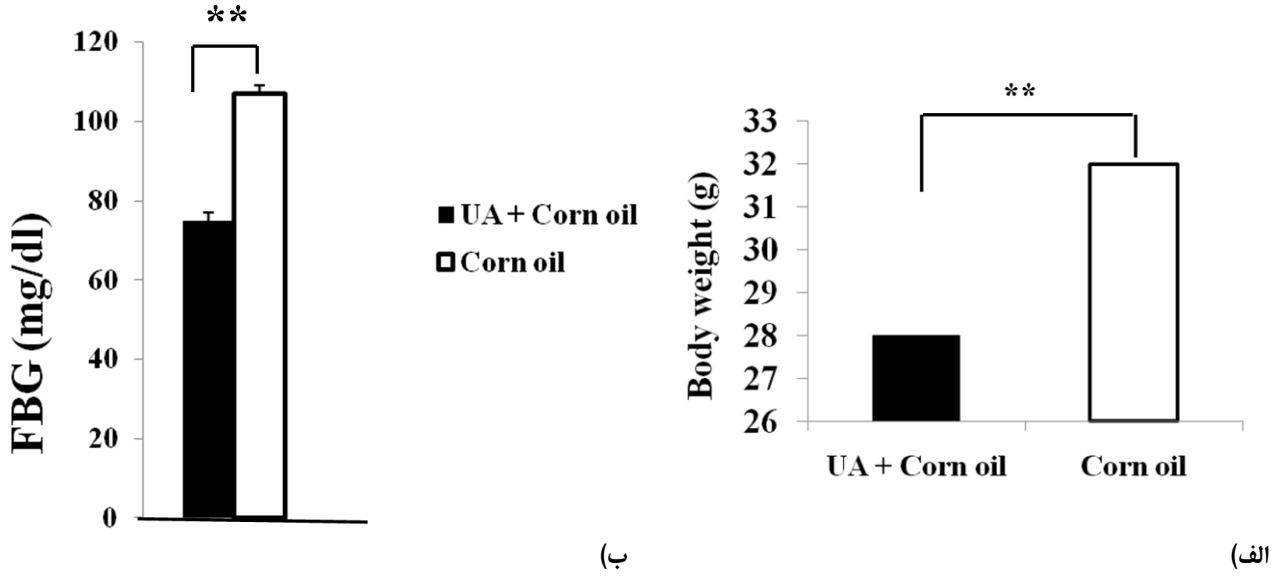
(*bicinchoninic acid assay*) ۱۰۰µg از پروتئین‌های استخراج‌شده از بافت‌های ذکرشده حیوانات گروه‌های کنترل و تحت تیمار با اورسولیک اسید بر روی ژل ۱۰٪ پلی آکریل آمید ران می‌شد. پس از جدا سازی پروتئین‌ها، ژل روی کاغذ PVDF انتقال داده می‌شد. سپس توسط آنتی‌بادی اولیه پلی کلونال ضد میوگلوبین (Sc-25607, Santa Cruz) موشی لکه‌گذاری می‌گردید. در نهایت، باندهای ایجاد شده توسط تکنیک کمولومینسانس با استفاده از آنتی بادی ثانویه متصل به HRP (Sc-J2811, Santa Cruz) تشخیص داده می‌شد و توسط دوربین charge-coupled device (CCD) عکس گرفته می‌شد و با استفاده از نرم‌افزار TotalLab تصویر گرفته می‌شد و دانسیتهٔ باندها اندازه گیری می‌گردید. همچنین برای نرمالایز کردن از بیان ژن بتا اکتین (۴۲ کیلودالتون) به عنوان Housekeeping gene در این مطالعه استفاده شد.

آنالیز آماری: آنالیز آماری داده‌ها بوسیلهٔ نرم‌افزار SPSS سری ۱۳ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. آزمون independent paired t-test (unpaired) برای بررسی اختلاف میانگین بین دو گروه به‌کار برده شد. هر آزمایش حداقل ۳ بار انجام شد و داده‌های مربوط به میزان وزن بدن، گلوکز خون و بیان میوگلوبین به صورت Mean±SEM ارائه شدند و حداقل سطح معنی داری P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته ها

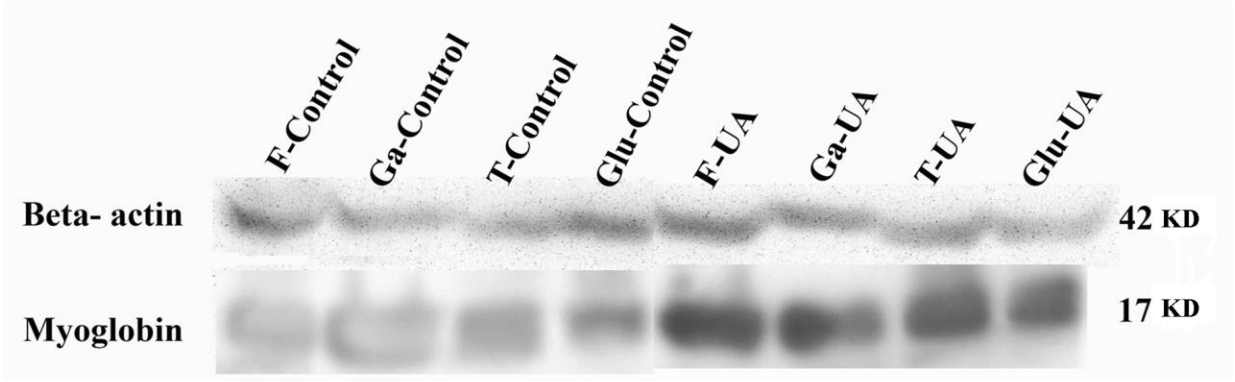
به منظور مطالعه فاکتورهای اولیه متأثر از اورسولیک اسید، نتایج نشان دادند که بعد از تزریق اورسولیک اسید قند خون و وزن بدن حیوانات در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت (P< ۰/۰۱). همان طور که شکل‌های ۱- الف و ب نشان داده شده است در فقدان اورسولیک اسید، وزن بدن و گلوکز خون ناشتای گروه کنترل به ترتیب ۰,۷±۳۲ گرم و۲±۱۰۷ mg/dl می‌باشد. درحالی‌که، در گروه تیمار شده با اورسولیک اسید، وزن بدن و گلوکز خون ناشتا به ترتیب به ۰.۴ ± ۲۸ گرم و ۲±۷۵ mg/dl کاهش می یابد.

سپس به منظور بررسی عملکرد بافت ماهیچه اسکلتی موش، بیان میوگلوبین در الیاف ماهیچه‌ای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که میزان بیان میوگلوبین در حیوانات تحت تیمار با اورسولیک اسید نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشته است (شکل ۲ الف-ب) P<0.001. نتایج همچنین نشان دادند که میزان

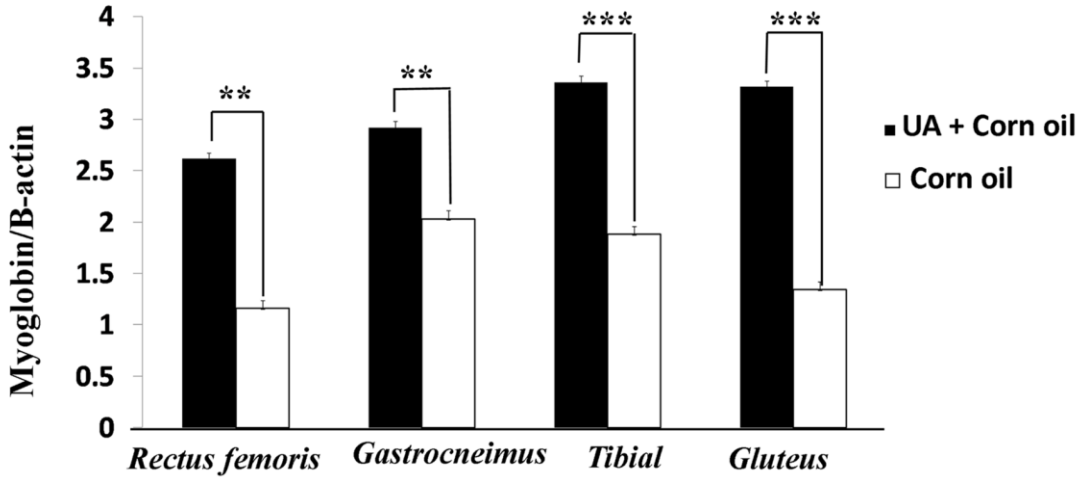


شکل ۱ الف و ب- اثر اورسولیک اسید برمیانگین وزن بدن (الف) و گلوکز خون ناشتا (ب) وزن و گلوکز خون ناشتا. به موش‌های نر C57BL/6 ده ماهه دو نوبت در روز به مدت ۷ روز اورسولیک اسید (۲۰۰ mg/kg) + روغن ذرت (گروه اورسولیک اسید) و روغن ذرت (گروه کنترل) بصورت صفاقی تزریق شد. معنادار بودن داده‌ها با آزمون Independent paired t- test (unpaired) مشخص شد، تمام داده‌ها بصورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. p<0.01** در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

الف)



ب)



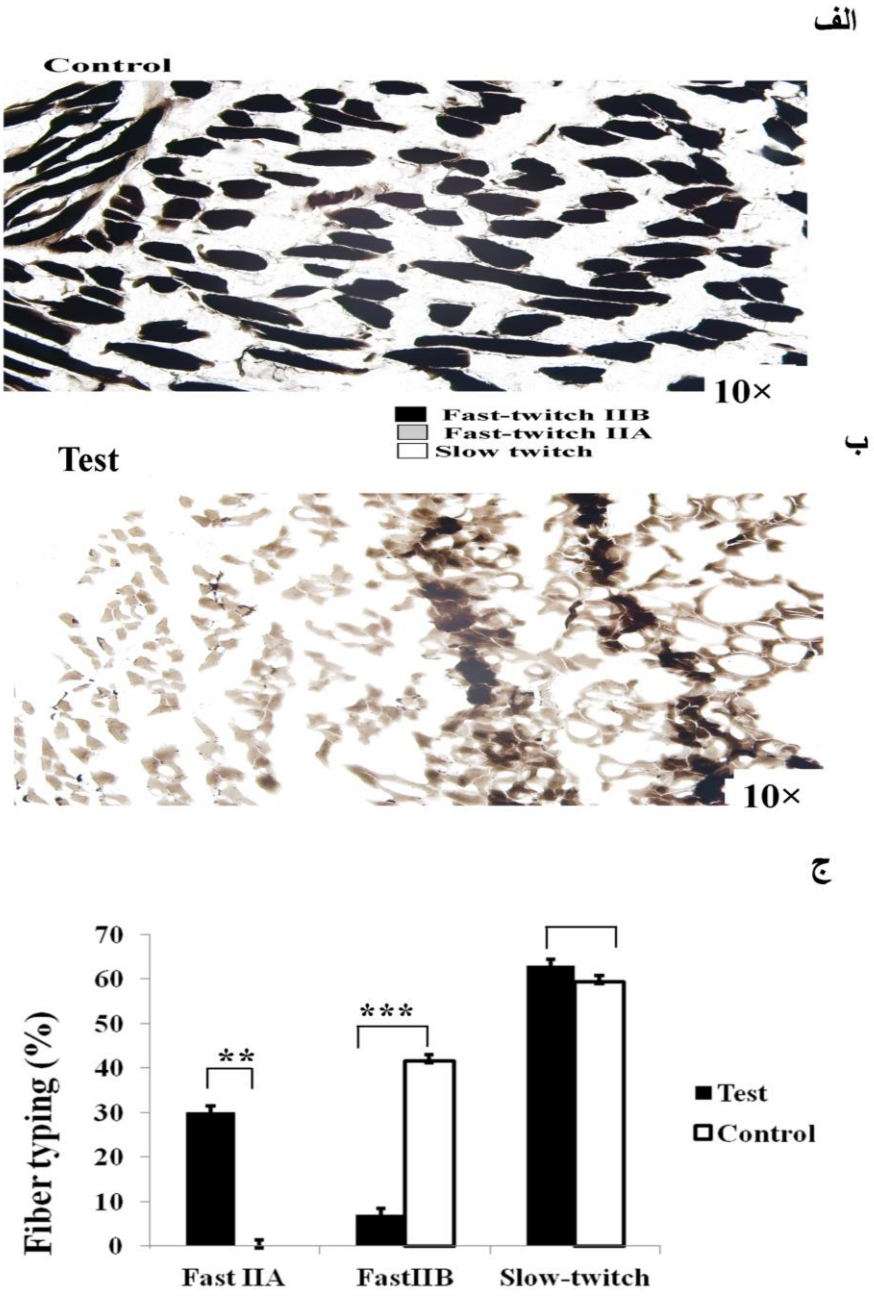
شکل ۲ الف و ب) اثر اورسولیک اسید بر بیان میوگلوبین در بافت ماهیچه اسکلتی موش. (الف–ب) به موش‌های نر C57BL/6 ده ماهه دو نوبت در روز به مدت ۷ روز اورسولیک اسید (۲۰۰ mg/kg) + روغن ذرت (گروه اورسولیک اسید) و روغن ذرت (گروه کنترل) بصورت صفاقی تزریق شد. معنادار بودن داده ها با آزمون Independent paired t- test (unpaired) مشخص شد، تمام داده‌ها بصورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. p<.001** و p<0.001*** در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد.

بیان میوگلوبین در بافت‌های Rectus femoris، Gluteus Maximus، Gastrocnemius و Tibialis Anterior در گروه اورسولیک اسید به ترتیب میزان ۲/۵، ۱/۳، ۱/۷و ۲/۶ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است.

افزایش بیان میوگلوبین در بافت‌های اکسیداتیو این سؤال را در ذهن به وجود آورد که اورسولیک اسید بافت ماهیچه‌ای را بیشتر به کدام سمت هدایت می‌کند، بافت اکسیداتیو تند انقباط IIA یا اکسیداتیو کند انقباظ. همان طور که در شکل ۳ الف–ج نشان داده شده است، یافته‌ها به این نکته اشاره دارند که اورسولیک اسید به طور غیر متحملی بافت ماهیچه اسکلتی غیر هوازی IIB را بیشتر به سمت IIA (۳۰٪) انتقال می‌دهد. بعلاوه، تغییر بافت ماهیچه IIB به سمت کند انقباض (۴٪) نیز صورت گرفت.

بحث

دانسته‌های موجود در ارتباط با مکانیسم‌های سیگنالی اورسولیک اسید در تغییرات بافت ماهیچه اسکلتی، هنوز به اندازه کافی قانع‌کننده نیست که از این ترکیب به عنوان یک داروی عمومی در درمان بسیاری از اختلالات عضلانی استفاده شود. بافت ماهیچه اسکلتی قابلیت انعطاف‌پذیری بالایی در برابر ظرفیت‌های عمل‌گرایی دارد [۲۰]. بنابراین، سازش یافتن به شرایط بیوشیمیایی و فیزیولوژی در بافت ماهیچه اسکلتی از جمله افزایش تعداد میتوکندری، رگ زایی و تغییر نوع بافت



شکل ۳ الف–ج. اثر اورسولیک اسید بر روی تغییر نوع بافت ماهیچه اسکلتی موش. (الف–ج) به موش‌های نر C57BL/6 ده ماهه دو نوبت در روز به مدت ۷ روز اورسولیک اسید (۲۰۰ mg/kg) + روغن ذرت (گروه اورسولیک اسید) و روغن ذرت (گروه کنترل) بصورت صفاقی تزریق شد. معنادار بودن داده‌ها با آزمون Independent paired t-test (unpaired) مشخص شد، تمام داده ها بصورت Mean ± SEM نمایش داده شده است. $p<0/01$** و $p<0/001$***در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. برش‌های ۸ µm از بافت Rectus femoris بوسیلهٔ روش mATPase هیستوشیمی در pH ۹،۵ رنگ آمیزی شد. (الف) کنترل، (ب) تست و (ج) کمی کردن داده‌ها با شمارش الیاف‌ها در مقیاس ۱۰۰ µm و سپس آنالیز داده ها با نرم افزار imagej. الیاف های نوع IIB به رنگ سیاه، الیاف‌های نوع IIA به رنگ خاکستری و الیاف‌های نوع I یا کند انقباض به رنگ سفید مشاهده می‌شود.

ماهیچه‌ای منجر به افزایش فعالیت انقباضی این بافت می‌شود. سازگاری به این شرایط شروعی برای بهتر کردن عملکرد فیزیکی و دیگر مزیت‌های سلامتی است. از این رو، در این تحقیق بر مبنای مطالعات گذشته در ارتباط با اثرات آنابولیک اورسولیک اسید بر روی بافت ماهیچه اسکلتی [۱۱]، کنجکاو شدیم بدانیم که آیا اورسولیک اسید می‌تواند عملکرد بافت ماهیچه اسکلتی را نیز تغییر دهد و شرایطی شبیه ماهیچه‌های پرورش‌یافته توسط ورزش را ایجاد نماید. به این منظور، بعد از تیمار موش‌ها با اورسولیک اسید نتایج نشان داد که اورسولیک اسید باعث افزایش بیان میوگلوبین شد (شکل ۲ الف–ب).

میوگلوبین یک همو‌پروتئین سیتوپلاسمی است که در ماهیچه‌های قرمز به فراوانی یافت می‌شود [۱۶]. بعلاوه، گزارش شده است که در ماهیچه‌های اسکلتی انسان و حیوانات پستاندار کوچک که در ارتفاعات بالا زندگی می‌کنند، مقدار میوگلوبین بالا می‌باشد. این درحالی‌که است که غلظت این پروتئین در ماهیچه‌های بدون فعالیت و در حیوانات بسیار جوان کم است [۲۸]. جالب‌توجه اینکه، گزارش شده است که شرایط کمبود اکسیژن تنها زمانی منجر به افزایش بیان بالای میوگلوبین می‌شود که به دنبال انقباض بافت ماهیچه اسکلتی در اثر ورزش کردن و یا تحریکات مکرر عصبی همراه باشد [۲۸]. بعلاوه، بهتر است یادآوری شود که تنظیم بیان میوگلوبین بوسیلهٔ سیگنال‌های کلسیمی درون سلولی اتفاق می‌افتد، که آزاد شدن کلسیم منجر به فعال شدن مسیرهای سیگنالی کالسینورین می‌شود [۲۵]. این فاکتور همراه با فاکتورهای رونویسی دیگر همانند MEF2 (myocyte enhancer factor-2)، NFAT (Nuclear factor of activated T-cells)، SP1 (Specific protein1) و یک کمک فعال‌کننده یعنی (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) PGC-1α باعث تنظیم بیان میوگلوبین می‌شود [۲۵]. به بیان دیگر قابل‌ذکر است که میوگلوبین در پایین‌دست این فاکتورهای رونویسی است و بیان میوگلوبین مستلزم بیان فاکتورهای ذکرشده است که نقش مهمی در عملکرد بافت ماهیچه اسکلتی دارند. از طرف دیگر مطالعات گذشته نشان داده‌اند که در موش‌های ترانس ژنیک که بیان کالسینورین در بافت ماهیچه اسکلتی را بالابرده‌اند، منجر به افزایش بیان میوگلوبین و به دنبال آن افزایش سوخت و ساز چربی‌ها شده است [۱۵، ۲۴]. نتایج نشان داد که بعد از تیمار موش‌ها با اورسولیک اسید وزن موش‌ها نسبت به گروه کنترل کاهش یافت، به نظر می‌رسد که افزایش بیان میوگلوبین شرایط را برای اکسیداسیون بافت چربی مهیا کرده است و مصرف چربی‌ها را به قندها اولویت داده است. همچنین یافته‌های ما نشان داد که اورسولیک اسید منجر به کاهش گلوکز خون ناشتا می‌شود. در حمایت از این یافته، لازم است ذکر شود که بیان میوگلوبین مستلزم بیان فاکتورهای رونویسی ذکرشده در بالا بالأخص PGC-1α است. این کمک فعال‌کننده باعث افزایش بیان گلوکز ترانسپورتر ۴ و انتقال این ناقل گلوکز به سمت غشای پلاسمایی و در پی آن کاهش قند خون می‌شود [۲۳].

از آنجایی که یک ارتباط نقشه‌ای بین اکسیداسیون/فسفریلاسیون، میتوکندری، میوگلوبین، ماهیچه‌های قرمز و تنفس هوازی وجود دارد [۱۸]. این یافته‌های موجود، این سؤال را در ذهن به وجود آورد که آیا اورسولیک اسید بافت‌ها را بیشتر به سمت تند انقباض IIA از نوع گلیکولیتیک/هوازی می‌برد یا کند انقباض. به راستی که درصد بالایی از مویرگ‌های خونی، میوگلوبین، میتوکندری در ماهیچه‌های قرمز که هم از نوع بافت کند و تند انقباض است، وجود دارد. به طور چشمگیری یافته‌های این مطالعه نشان داند که اورسولیک اسید اساساً بافت‌ها را به سمت تند انقباض IIA سوق می‌دهد. اخیراً، گزارش شده است که PGC-1α که عامل تنظیمی کلیدی در بیان میوگلوبین است، نقش مهمی را در جهت تشکیل الیاف‌های نوع IIA و I دارد [۲، ۷]. لازم است که توجه شود، تغییرات بافت ماهیچه اسکلتی آن را قادر می‌سازد که در شرایط کمبود مصرف گلوکز به سمت اکسیداسیون چربی‌ها تمایل پیدا کند [۸]. به نظر می‌رسد که اورسولیک اسید با افزایش بیان میوگلوبین و تغییرات بافت ماهیچه اسکلتی به سمت الیاف نوع IIA و I شرایط ماهیچه‌های اسکلتی انقباض یافته‌ای را تقلید می‌کند که در ارتفاعات تحت شرایط کمبود اکسیژن منقبض‌شده‌اند. از این رو اورسولیک اسید می‌تواند نقش ورزش در شرایط کمبود اکسیژن در ارتفاعات را بازی کند. با توجه به نقش اورسولیک اسید در جهت بهبود عملکرد بافت ماهیچه اسکلتی می‌تواند به عنوان گزینه مناسب در بهبود بخشیدن بیماری‌های مرتبط با بافت ماهیچه اسکلتی همانند تحلیل عضله اسکلتی (SMA, Spinal Muscle Atrophy) مفید واقع شود.

سپاسگزاری

در این‌جا خود را متعهد می‌دانم که کمال سپاس را به افراد مشغول در مرکز تحقیقات بن یاخته هدیه نمایم. همچنین از حمایت‌های مالی مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم دانشگاه تهران در انجام این پروژه قدردانی می‌نمایم.

References

[1] Aly HF, Ebrahim ME, Metawaa HM, Hosni E A-m A, Ebrahim FM, In vitro and in vivo evaluation of the antidiabetic effect of different extracts of nepeta cataria in streptozotocin induced diabetic rats. ***J Am Sci*** 6 (2010) 364-386.

[2] Anderson RM, Barger JL, Edwards MG, Braun KH, O'Connor CE, Prolla TA, Weindruch R, Dynamic regulation of pgc-1α localization and turnover implicates mitochondrial adaptation in calorie restriction and the stress response. ***Aging cell*** 7 (2008) 101-111.

[3] Bouzakri K, Koistinen HA, Zierath JR, Molecular mechanisms of skeletal muscle insulin resistance in type 2 diabetes. ***Curr Diabetes Rev*** 1 (2005) 167-174.

[4] Brooke MH, Kaiser KK, Muscle fiber types: How many and what kind? ***Arch Neurol*** 23 (1970) 369-379.

[5] Carlson B M, Denervation and the aging of skeletal muscle. ***Basic Appl Myol*** 14 (2004) 135-139.

[6] Choi Y, Kim B, Muscle fiber characteristics, myofibrillar protein isoforms, and meat quality. ***Livest Sci*** 122 (2009) 105-118.

[7] Cohn S, Vartsky D, Yasumura S, Sawitsky A, Zanzi I, Vaswani A, Ellis K, Compartmental body composition based on total-body nitrogen, potassium, and calcium. ***Am J Physiol*** 239 (1980) 24-30.

[8] Gerhart-Hines Z, Rodgers J T, Bare O, Lerin C, Kim S H, Mostoslavsky R, Alt F W, Wu Z, Puigserver P, Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through sirt1/pgc-1alpha. ***EMBO J*** 26 (2007) 1913-1923.

[9] Gupta A, Sheth N R, Pandey S, Shah D R, Yadav J S, Determination of ursolic acid in fractionated leaf extracts of ocimum gratissimum linn and in developed herbal hepatoprotective tablet by hptlc. ***J Phcog*** 5 (2013) 156-162.

[10] Han B, Peng Z, Anti-hiv triterpenoid components. ***JCPR*** 6 (2014) 438-443.

[11] Kunkel S D, Elmore C J, Bongers K S, Ebert S M, Fox D K, Dyle M C, Bullard S A, Adams C M, Ursolic acid increases skeletal muscle and brown fat and decreases diet-induced obesity, glucose intolerance and fatty liver disease. ***PLoS One*** 7 (2012) e39332.

[12] Kunkel S D, Suneja M, Ebert S M, Bongers K S, Fox D K, Malmberg S E, Alipour F, Shields R K,Adams C M, mRNA expression signatures of human skeletal muscle atrophy identify a natural compound that increases muscle mass. ***Cell Metab*** 13 (2011) 627-638.

[13] Liu J, Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. ***J Ethnopharmacol*** 100 (2005) 92-4.

[14] Meng Y, Liu D, Bai Z, Cai L, Ai H, synthesis and anti-tumor activity of ursolic acid derivatives. ***APS*** 46 (2011) 556-560.

[15] Naya F J, Mercer B, Shelton J, Richardson J A, Williams R S, Olson E N, Stimulation of slow skeletal muscle fiber gene expression by calcineurin in vivo. ***J Biol Chem*** 275 (2000) 4545-4548.

[16] Nayar H, Adaptation to high altitude. ***Defence Science Journal*** 34 (2014) 329-43.

[17] Oberbach A, Bossenz Y, Lehmann S, Niebauer J, Adams V, Paschke R, Schön M R, Blüher M, Punkt K, Altered fiber distribution and fiber-specific glycolytic and oxidative enzyme activity in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. ***Diabetes Care*** 29 (2006) 895-900.

[18] Olson E N, Williams R S, Calcineurin signaling and muscle remodeling. ***Cell*** 101 (2000) 689-692.

[19] Pádua T A, de Abreu B S, Costa T E, Nakamura M J, Valente L M, das Graças Henriques M, Siani A C, Rosas E C , Anti-inflammatory effects of methyl ursolate obtained from a chemically derived crude extract of apple peels: Potential use in rheumatoid arthritis. ***Arch Pharm Res*** (2014) 1487-95.

[20] Patel A M, Skeletal muscle fibre plasticity in response to selected environmental and physiological stimuli. ***Histol Histopathol*** 24 (2009) 611-629.

[21] Pathak A K, Bhutani M, Nair A S, Ahn K S, Chakraborty A, Kadara H, Guha S, Sethi G, Aggarwal B B, Ursolic acid inhibits stat3 activation pathway leading to suppression of proliferation and chemosensitization of human multiple myeloma cells. ***Mol Cancer Res*** 5 (2007) 943-955.

[22] Rochlin K, Yu S, Roy S, Baylies M K, Myoblast fusion: When it takes more to make one. ***Dev Biol*** 341 (2010) 66-83.

[23] Rutter G A, Da Silva Xavier G, Leclerc I, Roles of 5'-amp-activated protein kinase (ampk) in mammalian glucose homoeostasis. ***Biochem J*** 375 (2003) 1-16.

[24] Ryder J W, Bassel-Duby R, Olson E N, Zierath J R,

Skeletal muscle reprogramming by activation of calcineurin improves insulin action on metabolic pathways. ***J Biol Chem*** 278 (2003) 44298-44304.

[25] Schaeffer P J, Wende A R, Magee C J, Neilson J R, Leone T C, Chen F, Kelly D P, Calcineurin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase activate distinct metabolic gene regulatory programs in cardiac muscle. ***J Biol Chem*** 279 (2004) 39593-39603.

[26] Tsai S J, Yin M C, Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in pc12 cells. ***J Food Sci*** 73 (2008) 174-178.

[27] Vidya S, Krishna V, Manjunatha B, Mankani K, Ahmed M, Singh S J, Evaluation of hepatoprotective activity of clerodendrum serratum. ***Indian J Exp Biol*** 45 (2007) 538-42.

[28] Wittenberg B A, Both hypoxia and work are required to enhance expression of myoglobin in skeletal muscle. Focus on hypoxia reprograms calcium signaling and regulates myoglobin expression. ***Am J Physiol Cell Physiol*** 296 (2009) 390-392.

[29] Wolska K I, Grudniak A M, Fiecek B, Kraczkiewicz-Dowjat A, Kurek A, Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. ***Cent EurJ Biol*** 5 (2010) 543-553.