

FGF23 تحریک شده با ورزش کارایی ورزش را توسط کنترل تولید اضافی گونه‌های

فعال اکسیژن و افزایش عملکرد میتوکندریایی در عضله اسکلتی ارتقا می‌دهد

چکیده

هدف: ورزش بدنی، بسیاری از تغییرات سازشی را در عضله اسکلتی و کل بدن القا می‌کند و خصوصیات متابولیک را بهبود می‌دهد. فاکتور رشد فیبروبلاستی 23 (FGF23) یک عضو بی مانند از خانواده‌ی FGF است که به عنوان یک هورمون تنظیم کننده‌ی متابولیسم فسفات، تجمع کلسیم و عملکردهای کلیوی عمل می‌کند. نقش FGF23 در ورزش و عضله اسکلتی هنوز به مقدار زیادی ناشناخته است.

مواد و روش‌ها: موش C57BL/6J روی یک تردمیل ورزش داده شد. سطوح FGF23 سرم موش؛ بیان mRNA FGF23 در اندام‌های مختلف از جمله کبد، قلب، بافت عضله اسکلتی و تیروئید، و بیان mRNA کلوتو رسپتور FGF23 به ترتیب با استفاده از تست جذب ایمنی متصل به آنزیم، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ریل تایم و رنگ آمیزی ایمنی، بعد از یک تلاش منفرد از ورزش حاد (شدید) (60 دقیقه‌ای)، ورزش کامل، و ورزش طولانی مزمن (60 دقیقه هر روز به مدت یک هفته) آزمایش شد. موش C57BL/6J با FGF23 نوترکیب (100 میلی گرم / کیلوگرم دوبار در روز) یا کنترل حامل (سالین) به مدت 3 روز تزریق شد و سپس کارایی ورزش، گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)، تولید H2O2 و بیومارکرهای عملکرد میتوکندریایی در عضله (بیان ژن سیرتوئین 1، PPAR- α ، PGC-1 α و فاکتور رونویسی میتوکندریایی A (TFAM) و فعالیت سنتز سترات) تست شد.

نتایج: این اشکال از ورزش، ورزش حاد (شدید)، ورزش کامل، و ورزش مزمن، سطوح FGF23 سرم را افزایش داده بود. به هر حال، فقط ورزش مزمن mRNA FGF23 و بیان پروتئین در عضله اسکلتی را دچار فراتنظیمی کرده بود. بیان mRNA FGF23 در قلب، کبد، و تیروئید تحت تاثیر قرار نگرفته بود. پروتئین FGF23 اساساً در سیتوپلاسم در بافت عضله اسکلتی مستقر شده بود و لوکالیزاسیون FGF23 توسط ورزش تغییر نکرده بود. تیمار FGF23 برون زاد به طور معنی داری زمان خستگی را گسترش داده بود و تولید H2O2 و ROS القا شده با ورزش

را کاهش داده بود. تیمار FGF23 سطح PPAR- δ mRNA و فعالیت سیترات سنتاز را افزایش داده بود، اما بیان mRNA سیرتوئین 1، PGC-1 α و TFAM در عضله اسکلتی را تحت تاثیر قرار نداده بود.

نتیجه گیری: این نتایج نشان می‌دهند که FGF23 تحریک شده با ورزش، کارایی ورزش را توسط کنترل تولید ROS اضافی و افزایش عملکرد میتوکندریایی در عضله اسکلتی افزایش می‌دهد که نشان دهنده‌ی یک نقش کاملا جدید از FGF23 در عضله اسکلتی می‌باشد.

کلمات کلیدی: FGF23، ورزش، عضله اسکلتی، PPAR- δ ، عملکرد میتوکندریایی.

لیست اختصارات

DCFH، 2 و 7 - دی کلروفلورسین - دی استات

FGF، فاکتور رشد فیبروبلاستی

PGC-1 α ، فعال کننده‌ی همزمان 1 آلفا رسپتور γ فعال شده با تکثیرکننده‌ی پروکسی زوم

ROS، گونه‌های اکسیژن فعال

TFAM، فاکتور رونویسی میتوکندریایی A

1. مقدمه

در طی 30 سال اخیر، ترکیب سبک زندگی بی تحرک، و در دسترس بودن بیش از حد غذا منجر به افزایش قابل توجه در شیوع چاقی و افزایش نرخ دیابت ملیتوس نوع 2 شده است. ورزش بدن یکی از موثرترین استراتژی‌های درمانی برای بیماری‌های متابولیک می‌باشد (1). ورزش بسیاری از تغییرات فیزیولوژیک را القا می‌کند، از جمله، بهبود وضعیت متابولیک، افزایش حساسیت به انسولین، کاهش ریسک بیماری قلبی عروقی (5-2). به هر حال، ورزش بدنی ممکن است گونه‌های اکسیژن فعال اضافی (ROS) را در عضله اسکلتی القا کند، که ممکن است منجر به آسیب عضلانی شود (6). بنابراین درک سازواری‌های واکنشی کل بدن و درون عضلاتی القا شده با ورزش برای کاهش اثرات ناخواسته‌ی ورزش سودمند می‌باشد و آن ممکن است به توسعه‌ی روش‌های جدید و موثرتر برای مبارزه با بیماری‌های متابولیک و قلبی عروقی کمک کند.

فاکتورهای رشد فیبروبلاستی (FGFs) یک خانواده‌ی بزرگ از فاکتورهای ترشح شده‌ی حاوی حداقل 23 عضو می‌باشند که برخی از آنها در ایزوفرم‌های مختلفی وجود دارند. آنها از نظر ساختاری با هم مرتبط هستند و

توسط تمایل بالا برای هپارین مشخص می‌شوند (7). FGFs ها یک نقش مهم را در تنظیم متابولیسم و عملکرد اندوکرینی بازی می‌کنند (8-10). FGF23 به عنوان یک عضوی از خانواده‌ی FGF شناسایی شده بود. FGF23 یک عضو بی مانند از خانواده‌ی FGF می‌باشد چون آن به عنوان یک هورمون عمل می‌کند که از استخوان مشتق می‌شود (11). FGF23 فسفر، غلظت کلسیم سرم، و عملکردهای کلیوی را تنظیم می‌کند در حالی که بیشتر اعضا دیگر خانواده‌ی FGF به نظر می‌رسد که عملکردهای مختلف سلولی را در سطح موضعی تنظیم کنند (11). ژن ناک اوت FGF23 در موش، یک ویژگی شبه پیری را القا می‌کند از جمله کوتاه‌تر کردن طول عمر، تاخیر رشد، هیپوگنادیسم، اختلال شناختی، از دست دادن شنوایی، کلسیمی شدن عروق، و هایپرتروفی قلبی (11). به علاوه، مشخص شده است که FGF23، در کنار نقش خودش در هومئوستازی فسفات و بیولوژی استخوان، یک بیومارکر بالقوه در بیماری‌های قلبی عروقی و کلیوی می‌باشد. سطح خونی بالای FGF23 با بیماری‌های مزمن کلیوی (12) و بیماری سرخرگ کرونر (13) مرتبط می‌باشد. به علاوه، FGF23 جذب یون سدیم توبول دیستال کلیوی را افزایش می‌دهد و منجر به افزایش حجم می‌شود (14)، و متضمن برخی فعالیت‌های متابولیک لپتین می‌باشد (15). با این وجود، نقش FGF23 در عضله اسکلتی به ندرت مورد بررسی قرار گرفته است، با این حال مطالعات قبلی بیان FGF23 در بافت عضلانی اسکلتی را نشان داده‌اند (16).

بنابراین، ما استدلال کردیم که FGF23 ممکن است یک نقش مهم را در عضله اسکلتی بازی کند. در مطالعه‌ی حاضر، ما اثرات 3 شکل از ورزش بدنی روی غلظت‌های سرمی FGF23 و بیان FGF23 در عضله اسکلتی در موش را مورد بررسی قرار دادیم. به علاوه، ما اثرات تیمار FGF23 روی تحمل ورزش، تولید ROS/H₂O₂ درون عضلانی، و چندین مارکر مرتبط با عملکرد میتوکندریایی (از جمله، سیرتوئین 1، رسپتور فعال شده با تکثیر کننده‌ی پروکسی زوم δ -(PPAR)، هم فعال کننده‌ی 1 آلفا رسپتور γ فعال شده با تکثیر کننده‌ی پروکسی زوم (PGC-1 α))، فاکتور رونویسی میتوکندریایی A (TFAM)، و فعالیت سیترات سنتاز را در موش ارزیابی کردیم.

2. مواد و روش‌ها

2.1. حیوانات

موش C57BL/6J از مرکز حیوانات دانشگاه خودمان خریداری شد. آن‌ها در یک دستگاه حیوانات نگه داری شدند و مطابق با دستورالعمل‌های موسساتی برای رفاه حیوانات مراقبت شدند. همه‌ی آزمایش‌ها روی موش توسط کمیته‌ی سازمانی استفاده و مراقبت از حیوانات دانشگاه تونگجی تایید شدند.

2.2. ورزش بدنی

ورزش بدنی روی تردمیل با سرعت 5 m/min به مدت 10 دقیقه انجام شد و سپس 5 تا 5 تا ماکزیمم سرعت 20m/min افزایش داده شد. 3 شکل از ورزش (حاد (شدید) کامل و مزمن متوسط)، به کار برده شد. برای یک تلاش منفرد از ورزش حاد (شدید)، ورزش تردمیل به مدت 60 دقیقه طول کشید. برای ورزش جامع، ورزش تردمیل تا زمانی که خستگی در موش مشاهده شده بود ادامه پیدا کرد. خستگی به صورت ناتوانی حیوان برای باقی ماندن روی تردمیل با وجود تحریک مکانیکی تعریف شده بود. زمان خستگی ثبت شد و یک شاخص از کارایی تحمل ورزش در نظر گرفته شد. برای ورزش مزمن متوسط، موش به مدت 1 هفته ورزش داده شد (60 دقیقه در هر روز).

2.3. نمونه برداری بافت و خون

قبل و بعد از ورزش (یک هفته)، موش به مدت 8 ساعت گرسنگی داده می‌شد و سپس با سدیم پنتوباریتال بی هوش می‌شد (40 mg/kg i.p). خون آن‌ها (0.5 میلی لیتر) گرفته می‌شد و بافت‌های عضلات اسکلتی (گاستروکنمیوس و گلوئئوس ماکزیموس) به دقت جداسازی شدند و با سالین بافر فسفات (PBS) 3 بار شستشو شدند تا خون حذف شود. نمونه‌های جداشده در 80- درجه سانتی گراد برای آزمایش بعدی فریز شدند.

2.4. تعیین پارامتر خون

سنجش گلوکز سرم با استفاده از گلوکومتر Ames one touch (لایف اسکن، جانسون و جانسون، نیو برونسویک، NJ) انجام شد. گلیسرول سرم با استفاده از کیت تست کلریمتری تعیین شد (کیمن، کیمیکال کیمن (Ann Arbor. MI)). انسولین سرم با استفاده از یک تست جذب ایمنی متصل به آنزیم (ELISA) (مرکودیا، آپسالا، سوئد) سنجش شد به طوری که یک واکنش متقاطع قابل چشم پوشی با پپتید C کمتر از 0.01٪، حساسیت کمتر از 6pmol/l داشت. غلظت FGF23 سرم با استفاده از کیت FGF23 ELISA (میلی پور، بدفورد، MA) مطابق با دستورالعمل‌های سازنده تعیین شد. تراکم نوری در 450 نانومتر برای تعیین منحنی استاندارد خوانده شد.

2.5. تیمار FGF23

برای تیمار FGF23، FGF23 نو ترکیب (100mg/kg/day، FGF23، علوم نوووپروتئین، شورت هیلز، NJ) و کنترل حامل (سالین) به صورت درون صفاقی دو بار در روز به موش C57BL/6J برای 3 روز داده شد. حیوانات اجازه تمرین در طی تیمار FGF23 نداشتند. 3 روز بعد، دو گروه از موش‌ها، در معرض ورزش تردمیل برای ارزیابی بازده تحمل خودشان قرار گرفتند و سپس برای نمونه برداری به منظور ارزیابی تولید ROS درون عضلانی بی هوش شدند. در یک مجموعه‌ی دیگر از آزمایش‌ها برای ارزیابی اثر درمان FGF23 روی سیرتوئین 1، PPAR- α ، PGC-1 α ، و بیان ژن، به موش به مدت 3 روز FGF23 داده شد و سپس برای نمونه برداری از بافت ورزش داده نشده، بی هوش شد.

2.6. PCR ریل تایم

PCR کمی ریل تایم همانطوری که قبلاً توصیف شده بود، اجرا شد (17،18). RNA کل برای RT-PCR کمی ریل تایم از بافت‌های فریز شده با استفاده از معرف RNAiso جداسازی شد (تاکارا، توکیو، ژاپن) و به صورت cDNA دورشته‌ای رونوشت برداری معکوس شد. پرایمرهایی برای FGF23، سیرتوئین 1، PPAR- δ ، PGC-1 α ، TFAM و بتا اکتین در جدول 1 فهرست شده است. تعیین مقدار mRNA با استفاده از ABI Prism 7500 (بیوسیستم‌های کاربردی) با کیت RT-PCR PrimScript انجام شد (تاکارا، توکیو، ژاپن) (19). اختصاصیت تست‌های PCR کمی ریل تایم توسط آنالیز نقاط ذوب و ژل الکتروفورز ارزیابی شد. مقادیر نسبی FGF23 با استفاده از روش ΔCT محاسبه شد (20). بتا اکتین به عنوان یک ژن housekeeping برای PCR ریل تایم مورد استفاده قرار گرفته بود.

2.7. ایمونوشیمی

ایمونوشیمی در بافت عضلانی همانطوری که قبلاً توصیف شده بود اجرا شد (21،22). بافت عضله اسکلتی فریز شده به بخش‌هایی برش خورد (6 میکرومتر). بخش‌های فریز شده با بافر حاوی پارافرمالدهید 4٪ و 0.1٪ تریتون X-100 در دمای اتاق به مدت 20 دقیقه تثبیت شدند و سپس توسط 4٪ سرم نرمال بزنی بلاک شد، سپس با انکوباسیون با آنتی بادی اولیه در مقابل FGF23 (sc-50291، بیوتکنولوژی سانتا کروز، سانتا کروز CA) در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت دنبال شد و با آنتی بادی ثانویه کانژوگه شده‌ی 488 الکسا

فلور انکوبه شد. DAPI برای رنگ آمیزی هسته‌ها مورد استفاده قرار گرفت (23). تراکم فلوروسنس با میکروسکوپی کنفوکال FV1000 الیمپوس سنجش شد و با نرم افزار FV1000 آنالیز شد (الیمپوس ژاپن).

2.8. رنگ آمیزی ایمنی

آنالیزهای رنگ آمیزی ایمنی همانطوری که قبلا توصیف شده بود اجرا شد (24،25). بافت‌ها یا سلول‌ها با بافر RIPA با مهارکننده‌های پروتئاز لیز شد (PMSF، 2mmol/l؛ لوپیتین 50μg/ml؛ پپ استاتین A، 5μg/ml؛ و دی تیو تریتول (DTT، 2mmol/l) و مهارکننده‌ی فسفاتاز کوکتیل 2 (سیگما)). بعداز تعیین غلظت پروتئین با استفاده از کیت تست پروتئین BCA بهبود یافته (موسسه بیوتکنولوژی بیوتیم، هایمن چین)، یک نمونه‌ی تقریباً 30 میکروگرمی بارگیری شد و در معرض SDS-PAGE 10٪ قرار داده شد و به درون غشاهای PVDF در 100 وات به مدت 1 ساعت انتقال داده شد. بعداز بلاک شدن در بافر بلاک کننده ی 5٪ (w/v) شیر بدون چربی و 0.1٪ (v/v) توپین 20 در PBS به مدت 4 ساعت، غشا با آنتی بادی اولیه‌ی اختصاصی انکوبه شد (FGF23، رقت 1:500؛ بتا اکتین، رقت 1:2000) و سه مرتبه با PBST شسته شد (هر بار 5 دقیقه). سپس، غشا با آنتی‌بادی‌های ثانویه‌ی کانژوگه شده با HRP پروکسیداز ریشه خردل انکوبه شد. تعیین مقدار بلات‌ها با استفاده از سیستم نرم افزار کوآنتیتی وان انجام شد (آزمایشگاه‌های بایو راد). هر آزمایش حداقل 3 مرتبه تکرار شد. بتا اکتین به عنوان یک کنترل بارگیری مورد استفاده قرار گرفت.

2.9. تولید ROS

2،7 – دی کلرو فلورسین (DCFH) به عنوان یک پروب فلورسنت برای سنجش ROS مطابق با روشی که قبلا توصیف شده بود با برخی اصلاحات مورد استفاده قرار گرفت (26). حدود 1 میلی گرم پروتئین هموژنات عضله به 50 میکرولیتر اتانول (1.25 میلی مولار) با 5 میکرومولار دی استات DCFH افزوده شد و سپس در 37 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه انکوبه شد تا اجازه دهد که DCFH دی استات از غشا عبور کند و توسط استراز برش بخورد. طول موج تحریک 488 نانومتر و نشر در 530 نانومتر ثبت شد تا سطح ROS بر اساس منحنی استاندارد توسط یک گروهی از غلظت‌های DCF مشخص، محاسبه شود. سطح H₂O₂ با استفاده از کیت تست پروکسید هیدروژن (ابکم، کمبریج MA) مطابق با دستورالعمل سازنده ارزیابی شد. در حضور پروکسیداز ریشه

خردل، پروب OxiRed با H₂O₂ واکنش داده شد تا یک محصول دارای رنگ را تولید کند (لاندا ماکریم=570 نانومتر) (27).

2.10. فعالیت سیترات سنتاز

فعالیت سیترات سنتاز با استفاده از یک کیت تجاری خریداری شده از ابکم تعیین شد (کمبریج UK) همانطوری که قبلاً توصیف شده بود (28،29). نمونه‌های فریز شده ماهیچه‌ی اسکلتی ذوب شد و با بافر استخراج کیت هموژن شد. سپس، تست‌هایی مطابق با دستورالعمل کارخانه اجرا شد. در نهایت، جذب در OD=412 nm سنجش شد تا فعالیت CS را محاسبه کند.

2.11. آنالیز آماری

داده‌ها به صورت میانگین \pm SEM بیان شدند. تفاوت‌ها توسط تست student دو دنباله‌ای یا آنالیز واریانس (ANOVA) ارزیابی شد، و توسط تست پست هوک توکی دنبال شد. معنی داری آماری در $p < 0.05$ تنظیم شده بود.

3. نتایج

3.1. ورزش حاد (شدید)، سطوح FGF23 را در موش افزایش می‌دهد

به منظور مطالعه‌ی اثر ورزش روی سطوح سیستمیک FGF23، ما 8 موش C57BL/6 با ورزش حاد (شدید) کوتاه مدت را وارد رقابت کردیم، که روی یک تردمیل به مدت 60 دقیقه در حال دویدن بودند. پارامترهای پلاسمایی موش قبل و بعد از ورزش تردمیل آنالیز شد. سطوح گلوکز سرم بعد از ورزش به طور معنی داری پایین‌تر از آن قبل از ورزش بود (شکل 1A). بنابراین، سطوح انسولین سرم نیز بعد از ورزش کاهش پیدا کرده بود (شکل 1B). در مقابل، سطوح گلیسرول سرم در موش بعد از ورزش در مقایسه با قبل از ورزش بالاتر بود (شکل 1C). جالب‌تر اینکه، ما مشاهده کردیم که سطوح FGF23 سرم به طور معنی داری در موش ورزش داده شده در مقایسه با موش قبل از ورزش افزایش یافته بود (شکل 1D). بیان FGF23 mRNA در کبد، قلب، ماهیچه‌ی اسکلتی و تیروئید تغییر نکرده بود. بیان RNA کلوتو رسپتور FGF23 در ماهیچه‌ی اسکلتی نیز توسط ورزش حاد (شدید) تحت تاثیر قرار گرفته بود.

3.2. بیان ژن FGF23 در عضله‌ی اسکلتی توسط ورزش مزمن دچار فراتنظیمی می‌شود

ما سپس اثر ورزش مزمن متوسط و شدید (کامل) روی بیان FGF23 و سطوح سرمی را مورد مطالعه قرار دادیم. هم ورزش مزمن متوسط و هم شدید (کامل) سطوح FGF23 سرم را افزایش داده بود (شکل 2A و 2D). ورزش مزمن FGF23 mRNA را فقط در عضله‌ی اسکلتی افزایش داده بود (شکل 2E). در مقابل، ورزش کامل در تنظیم بیان FGF23 در هر اندام شکست خورده بود (شکل 2B). از این رو، بیان کلوتو رسپتور FGF23 در عضله‌ی اسکلتی توسط ورزش مزمن افزایش پیدا کرده بود (شکل 2F) اما توسط ورزش جامع افزایش پیدا نکرده بود (شکل 2C).

3.3. اثر ورزش روی لوکالیزاسیون و سطح پروتئین FGF23 در ماهیچه‌ی اسکلتی

اخیرا، هیچ اطلاعاتی در مورد الگوی بیان FGF23 در عضله اسکلتی وجود ندارد. بنابراین، ما بعدا بیان و لوکالیزاسیون FGF23 در گاستروکنمیوس را با استفاده از ایمونوهیستوشیمی و رنگ آمیزی ایمنی مورد شناسایی قرار دادیم. ما فهمیدیم که پروتئین FGF23 اساسا در سیتوپلاسم در بافت عضله‌ی اسکلتی مستقر می‌شود و لوکالیزاسیون FGF23 توسط ورزش تغییر نکرده بود (شکل 3A، پنل چپ). تراکم نوری پروتئین FGF23 در عضله‌ی اسکلتی موش ورزش کرده بالاتر از قبل ورزش بود (شکل 3A، پنل راست). ما سپس اثرات ورزش بدنی روی بیان پروتئین FGF23 در گاستروکنمیوس و گلوٹئوس ماکسیموس مورد مطالعه قرار دادیم. آنالیز رنگ آمیزی ایمنی تایید کرد که سطوح پروتئین FGF23 در گاستروکنمیوس و گلوٹئوس ماکسیموس به طور معنی داری در موش ورزش کرده افزایش پیدا کرده بود (شکل 3B).

3.4. FGF23 تحمل ورزش را ارتقا می‌دهد

به منظور کشف نقش FGF23 فراتنظیمی شده در ورزش، ما موش را با FGF23 نوترکیب یا سالین (کنترل) به مدت 3 روز متوالی تیمار کردیم سپس آن‌ها را در معرض ورزش تردمیل قرار دادیم. هیچ تغییر معنی داری در وزن بدن بین موش‌های تیمار شده با حامل و تیمار شده با FGF23 وجود نداشت (داده‌ها نشان نداده شده است). پایه‌ی انجام ورزش قبل از تیمار، بین این دو گروه از موش‌ها قابل مقایسه بود (شکل 4A). به هر حال، تیمار FGF23 به طور معنی داری زمان خستگی را طولانی کرده بود (شکل 4B). این نتیجه نشان می‌دهد که FGF23 تحمل ورزش را افزایش می‌دهد.

3.5. FGF23 در مقابل تولید H2O2 و ROS القا شده با ورزش در عضله اسکلتی محافظت می کند

سپس ما اثر تیمار FGF23 روی تولید ROS و H2O2 در عضله اسکلتی در موش ورزش کامل داده شده را مورد ارزیابی قرار دادیم. ما فهمیدیم که سطح ROS در بافت عضله اسکلتی (گاستروکنمیوس) گرفته شده از موش تیمار شده با FGF23 به طور معنی داری پایین تر از آن در عضله اسکلتی گرفته شده از موش کنترل بود (شکل 5A). به علاوه، محتوای H2O2 در عضله اسکلتی گرفته شده از موش تیمار شده با FGF23 پایین تر از عضلات اسکلتی گرفته شده از موش کنترل بود (شکل 5B).

3.6. افزایش عملکرد میتوکندریایی ممکن است به فعالیت ارگوژنیک FGF23 در ورزش کمک کند.

به منظور کشف مکانیسم های مولکولی برای کارایی FGF23 در ورزش، ما عملکرد میتوکندریایی در عضله اسکلتی در موش کنترل یا تیمار شده با FGF23 بدون تمرین فیزیکی را سنجیدیم. در گاستروکنمیوس و گلوٹئوس ماکزیموس، ما مشاهده کردیم که سطوح PPAR- δ mRNA توسط تیمار FGF23 افزایش پیدا کرده بود (شکل 6B و 6E). به هر حال، هیچ تغییری از سیرتوئین 1 (شکل 6A و 6D) و PGC-1 α (شکل 6C و 6F) در سطوح mRNA مشاهده نشده بود. تیمار با FGF23 به طور معنی داری فعالیت سترات سنتاز را در گاستروکنمیوس (شکل 7A) و گلوٹئوس ماکسیموس (شکل 7B) افزایش داده بود. به هر حال، سطوح TFAM mRNA در گاستروکنمیوس (شکل 7C) و گلوٹئوس ماکسیموس (شکل 7D) را تغییر نداده بود.

4. بحث

ما اثرات ورزش روی سطوح FGF23 در موش را مورد بررسی قرار دادیم و یافته های زیر را به دست آوردیم: اول، هم ورزش حاد (شدید) و هم ورزش مزمن می تواند سطوح FGF23 در گردش خون را افزایش دهد در حالی که فقط ورزش مزمن، بیان FGF23 mRNA در عضله اسکلتی را دچار فراتنظیمی می کند. دوم، تیمار FGF23 در موش، به طور معنی داری کارایی ورزش را بهبود داده بود. سوم، FGF23 عملکرد میتوکندریایی را در ماهیچه اسکلتی بهبود داده بود. همه ی این نتایج نشان دهنده نقش مهم FGF23 ماهیچه در ورزش هستند. داده های قبلی نشان داده اند که FGF23 یک هورمون است که در وهله اول توسط استئوسیت هایی که متابولیسم فسفات و ویتامین D را تنظیم می کنند آزاد می شود (30). مطالعات انجام شده روی اثر بالقوه ی FGF23 در ماهیچه اسکلتی نادر است. اولین مطالعه روی FGF23 از آنالیز PCR رونویسی معکوس نیمه کمی

برای نشان دادن اینکه FGF23 mRNA اساساً در قلب، کبد، و تیروئید بیان می‌شود استفاده کرده بود در حالی که بیان FGF23 در عضله اسکلتی ضعیف بود (31). آنالیز ساترن بلات این نتایج را تایید کرده است (32). به هر حال، یک بررسی بعدی با استفاده از PCR کمی ریل تایم برای شناسایی بیان FGF23 mRNA به این نتیجه دست یافت که رتبه‌ی بیان FGF23 در بافت‌های موش نرمال بدین ترتیب بود استخوان < تیموس < مغز < قلب < عضله اسکلتی < طحال < پوست < ریه < بیضه‌ها، و سطوح تقریباً غیر قابل تشخیصی در کبد و کلیه‌ها وجود داشت (16). در این مطالعه، آنالیزهای ایمونوهیستوشیمی و رنگ آمیزی ایمنی نشان دادند که پروتئین FGF23 در واقع در بافت عضله اسکلتی بیان شده بود. این باید یادآوری شود که کلوتو، که رسپتور / کوفاکتور FGF23 می‌باشد و برای سیگنالینگ FGF23 ضروری است، به مقدار زیادی در عضله اسکلتی بیان می‌شود (33،34). بنابراین، این نتایج از نقش مهم FGF23 در بیولوژی عضله اسکلتی حمایت می‌کنند. به علاوه، افزایش FGF23 بعد از ورزش، احتمال اینکه FGF23 یک میوکین القا شده با ورزش باشد را افزایش داده بود. اخیراً، میوکین‌های جدید، مانند آیرسین (41-35) و درمسیدین (42) توجهات زیادی را به خود جلب کرده‌اند که به دلیل نقش مهم آن‌ها در تنظیم متابولیسم و اندوکرینولوژی می‌باشد.

افزایش مصرف اکسیژن در بافت عضله اسکلتی در طی ورزش موجب ایجاد ROS فراوان در میتوکندری‌ها شده بود (43). اگرچه بافت‌های اولیه‌ی مسئول برای تولید ROS در طی ورزش کاملاً شناخته شده نیست، اما شواهد نشان می‌دهند که NADPH اکسیداز، فرایندهای وابسته به PLA2، و زانتین اکسیداز به تولید ROS القا شده با انقباض در عضله در فیبرهای در حال انقباض عضله اسکلتی کمک می‌کنند (43). تولید ROS همچنین یک القا کننده‌ی مهم خستگی عضلانی در طی ورزش شدید و طولانی مدت می‌باشد. مطالعات پیشین نقش آنتی اکسیدان‌ها در پیش‌گیری از خستگی عضلانی در طی ورزش مقاومتی در انسان‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند (43). به هر حال، این ایده هنوز بحث برانگیز است چون یک سطح بهینه از تحریک میانجی‌گری شده با ROS به نظر می‌رسد که برای پاسخ سیگنالینگ نرمال به ورزش دو سرعتی در انسان‌ها ضروری باشد (44). لومباردی و همکارانش نشان دادند که FGF23 50٪ بعد از یک دویدن 3 هفته‌ای افزایش پیدا کرده بود؛ به هر حال، آن‌ها هیچ نقش بیولوژیک از FGF23 در عضله اسکلتی را مورد بررسی قرار ندادند (45). نتایج ما روی سطوح سرمی FGF23 بعد از ورزش به وضوح موازی با داده‌های آن‌ها می‌باشد. فلپس و همکارانش همچنین نشان دادند که

تحمل دویدن به طور قابل توجهی در موش ناک اوت کلوتو کاهش پیدا کرده بود (33). از آنجایی که کلوتو رسپتور FGF23 می‌باشد، یافته‌های ما به وضوح از این ایده که محور FGF23 - کلوتو در عضله اسکلتی یک نقش سودمند را در ورزش بازی می‌کند، حمایت کرد.

عملکرد میتوکندریایی در عضله اسکلتی یک نقش مهم در بیولوژی مرتبط با ورزش دارد (46-48). سیرتوئین 1، PPAR- δ و PGC-1 α ، 3 تنظیم کننده‌ی رونویسی ارشد متابولیسم اکسیداتیو و عملکرد میتوکندریایی هستند (49-52). آن‌ها بعد از ورزش حاد (شدید) فعال می‌شوند و به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های مولکولی متضمن اثرات سودمند القا شده توسط ورزش بدنی باشند (49-51). در مطالعه‌ی ما، ما تنها یک افزایش بیان mRNA PPAR- δ و نه بیان mRNA سیرتوئین 1 یا PGC-1 α ، را در عضله اسکلتی موش تیمار شده با FGF23 مشاهده کردیم. نارکار و همکارانش نشان دادند که فعال شدن یا بیان بیش از حد فاکتور رونویسی PPAR- α در عضله منجر به یک افزایش در بیوژنز میتوکندریایی می‌شود (51). به علاوه، فعال شدن PPAR- δ به نظر می‌رسد که تحمل دویدن را افزایش دهد و در مقابل چاقی القا شده با رژیم غذایی و دیابت نوع 2 محافظت کند (51). جالب تر اینکه، آگونیست PPAR- δ یک پاسخ ورزش را توسط افزایش پاسخ‌های تنظیم ژن در عضله اسکلتی انسان تقلید می‌کند (53). بنابراین، فعال شدن مسیر PPAR- δ توسط FGF23 ممکن است به عملکرد FGF23 روی تحمل ورزش کمک کند. به علاوه، افزایش فعالیت سیترات سنتاز توسط FGF23 نیز ممکن است به فعالیت ارگوژنیک FGF23 روی ماهیچه‌ی اسکلتی کمک کند. یک افزایش در فعالیت سیترات سنتاز یک شاخص معمول برای تایید اثر ورزش می‌باشد (54). به علاوه، چندین یافته‌ی اخیر همچنین نشان داده‌اند که عملکرد میتوکندریایی فعال در مغز ممکن است اثرات سودمند ورزش را میانجی‌گری کند (55، 56). به هر حال، به نظر می‌رسد که این مشاهده هنوز قابل بحث باشد (57). به علاوه، اگرچه افزایش فعالیت سیترات سنتاز همواره شاخصی از بیوژنز میتوکندریایی در نظر گرفته می‌شود (54)، اما لارسن و همکارانش گزارش کردند که فعالیت سیترات سنتاز لزوماً رخ نمی‌دهد که به دلیل بیوژنز میتوکندریایی جدید می‌باشد (58). از آنجایی که ما همچنین فهمیدیم که سطوح TFAM mRNA، که یک شاخص خوبی از تغییر در تعداد کپی DNA میتوکندریایی می‌باشد، به طور معنی داری توسط FGF23 در عضله اسکلتی تغییر نکرده بود، بهتر است نتیجه بگیریم که

FGF23 کارایی ورزش را از طریق افزایش عملکرد میتوکندریایی بهبود می‌دهد. با این وجود، اثرات FGF23 روی ساختار و بیوژنز میتوکندریایی هنوز سوال برانگیز است.

چندین محدودیت در کار ما وجود دارد. اول، ما اثرات FGF23 روی سیستم انتقال اکسیژن را سنجش نکردیم، که ممکن است موجب افزایش در بازده تحمل شود (59). تعیین متابولیک یا VO2 یا لاکتات در طی ورزش زیر حد ماکزیمم ممکن است اطلاعات بیشتری را در مورد عملکرد بیولوژیک FGF23 فراهم کند. دوم، در معرض قرارگیری حاد کاردیومیست‌های اولیه با FGF23 منجر به افزایش Ca^{2+} درون سلولی شده بود (60) که پیشنهاد می‌کند که FGF23 ممکن است تحمل ورزش را توسط افزایش حجم در گردش افزایش دهد و اثرات مثبت روی خروجی قلبی و پری لود را دنبال کند. سوم، رهاسازی مستقیم FGF23 از بستر عروقی عضلانی تعیین نشده است. بنابراین، اینکه آیا FGF23 از ماهیچه‌ی اسکلتی در طی ورزش رها می‌شود یا نه هنوز یک سوال بی‌پاسخ می‌باشد.

در نتیجه، ما نشان دادیم که ورزش بدنی، غلظت خونی FGF23 و بیان FGF23 در ماهیچه‌ی اسکلتی را افزایش می‌دهد. مکمل FGF23 برون زاد کارایی تحمل در ورزش بدنی را توسط کنترل تولید ROS اضافی بهبود می‌دهد و عملکرد میتوکندریایی را افزایش می‌دهد. این نتایج پیشنهاد کننده‌ی یک نقش مهم از FGF23 در بیولوژی عضلانی و کارایی ورزش می‌باشد.

مشارکت محققین

D.J.L. آزمایش‌ها را اجرا کرد، آزمایش‌های را طراحی کرد، داده‌ها را تفسیر کرد، و پیش نویس را نوشت. H.F. آزمایش‌ها را اجرا کرد، T.Z. و M.N. در مورد مطالعه بحث کردند و داده‌ها را تفسیر کردند. F.M.S. ایده‌ی مطالعه را ارائه کرد، آزمایش‌ها را طراحی کرد و دست نویس را نوشت و ویرایش کرد.

سرمایه گذاری

این کار توسط گرنت موسسه‌ی مرکز ملی چین (No. 81300081 to D.J.L. and 81370558 to F.M.S.)، موسسه‌ی علوم طبیعی شانگهای (No. 13ZR1459300 to D.J.L.) و سرمایه‌های پژوهشی بنیادی برای مراکز دانشگاهی دانشگاه تونگجی (No 15011219097 to D.J.L.) حمایت شده است.

زیر نویس اشکال

شکل 1. اثرات یک دور ورزش حاد (شدید) (60 دقیقه‌ای) روی سطوح گلوکز، انسولین، گلیسرول و FGF23 سرم، بیان FGF23 mRNA در کبد، قلب، عضله اسکلتی و تیروئید و بیان mRNA کلوتو رسپتور FGF23 در عضله. (A-D) سطوح گلوکز سرم، انسولین، گلیسرول و FGF23 بعد از ورزش حاد (شدید). (E) بیان mRNA FGF23 در کبد، قلب، عضله اسکلتی و تیروئید. (F) بیان mRNA کلوتو FGF23 در عضله. $P < 0.05$ * در مقابل pre-Ex. N=8 در هر گروه. Pre-Ex، پیش از ورزش؛ Post Ex، بعد از ورزش. NS، معنی دار نیست.

شکل 2

اثرات یک دور منفرد از ورزش کامل و ورزش مزمن متوسط یک هفته‌ای روی غلظت FGF23 سرم، بیان mRNA FGF23 در کبد، قلب، عضله اسکلتی و تیروئید و بیان mRNA کلوتو رسپتور FGF23 در عضله. (A-C) غلظت FGF23 سرم (A)، بیان FGF23 RNA در کبد، قلب، عضله اسکلتی و تیروئید (B)، و بیان mRNA کلوتو در عضله (D)، بیان FGF23 RNA در کبد، قلب، عضله اسکلتی و تیروئید (E)، و بیان mRNA کلوتو در عضله (F) بعد از ورزش مزمن متوسط یک هفته‌ای. $p < 0.05$ * در مقابل پیش از ورزش. N=8 در هر گروه. Pre-Ex پیش از ورزش؛ Post - Ex بعد از ورزش؛ NS، معنی دار نیست.

شکل 3

توزیع تغییر نیافته و افزایش بیان FGF23 در بافت‌های عضله اسکلتی بعد از ورزش برای یک هفته (A) ایمونوهیستوشیمی توزیع FGF23 در بافت‌های عضلاتی اسکلتی قبل و بعد از ورزش را نشان داد. $P < 0.05$ * در مقابل پیش از ورزش. N=8 در هر گروه. (B) مقایسه‌ی سطح پروتئین FGF23 در گاستروکنمیوس و گلوئوس ماکسیموس قبل و بعد از ورزش توسط رنگ آمیزی ایمنی. $P < 0.05$ * در مقابل پیش از ورزش. N=8 در هر گروه.

شکل 4. اثرات تیمار FGF23 روی تحمل ورزش در موش. مقایسه‌ی زمان خستگی در ورزش تردمیل قبل (A) و بعداز تیمار FGF23 (B) در دو گروه از موش‌ها. $p < 0.05$ * در مقابل کنترل. NS معنی دار نیست. N=8 در هر گروه.

شکل 5. اثرات تیمار FGF23 روی تولید ROS و H₂O₂ القا شده با ورزش در عضله‌ی اسکلتی. سطوح ROS (A) و H₂O₂ (B) درون عضلانی قبل و بعداز ورزش تعیین شد. $p < 0.05$ * در مقابل کنترل. Pre-Ex پیش از ورزش؛ Post-Ex، بعداز ورزش. N=8 در هر گروه.

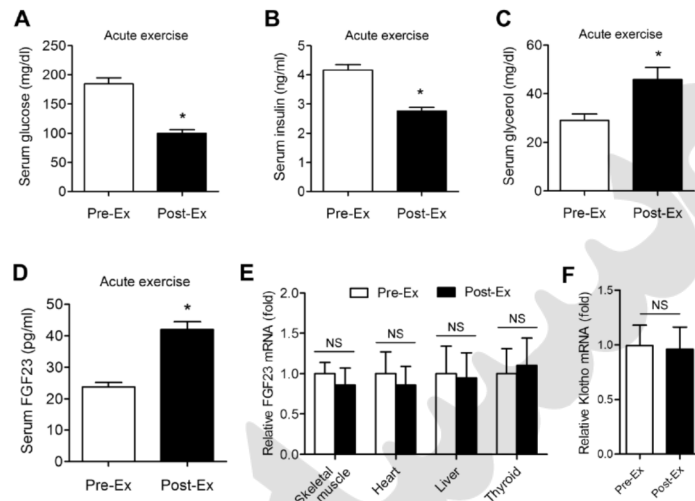
شکل 6. اثرات تیمار FGF23 روی سطوح mRNA سیرتوئین 1، PPAR- δ و PGC-1 α در عضله‌ی اسکلتی در موش. بافت‌های عضله‌ی اسکلتی گرفته شده از موشی که تیمار FGF23 را به مدت 3 روز یا حامل (کنترل) را دریافت کرده بود، جداسازی شد و برای جداسازی cDNA برای تست، PCR ریل تایم مورد استفاده قرار گرفت. (A-C) مقایسه‌ی سطوح mRNA سیرتوئین 1، PPAR- δ و PGC-1 α در گاستروکنمیوس بین موش کنترل و تیمار شده با FGF23. $P < 0.05$ * در مقابل کنترل. N=4 در هر گروه. (D-F) مقایسه‌ی سطوح mRNA سیرتوئین 1، PPAR- δ و PGC-1 α در گلوئتوس ماکسیموس بین موش تیمار شده با FGF23 و کنترل. $P < 0.05$ * در مقابل کنترل. N=4 در هر گروه.

شکل 7. اثرات تیمار FGF23 روی عملکرد میتوکندریایی در عضله‌ی اسکلتی موش. (A-B) اثرات تیمار FGF23 روی فعالیت سیترات سنتاز در گاستروکنمیوس و گلوئتوس ماکسیموس. (C-D) اثرات تیمار FGF23 روی بیان TFAM mRNA در گاستروکنمیوس و گلوئتوس ماکسیموس. $p < 0.05$ * در مقابل کنترل. N=6 در هر گروه.

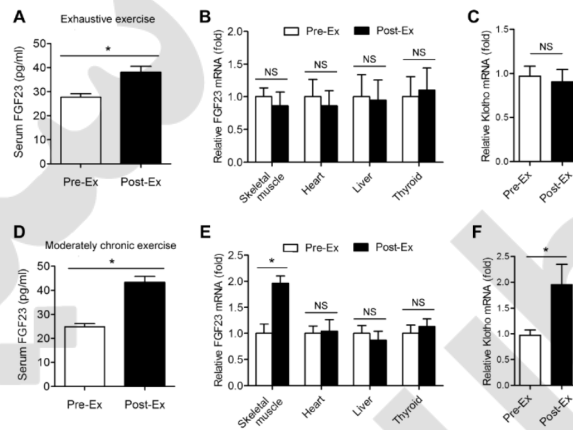
جدول 1. پرایمرهایی برای آنالیز ریل تایم PCR.

Gene	Forward	Reverse
FGF23	TGGGCACTGCTAGAGCCTAT	CTTCGAGTCATGGCTCCTGT
sirtuin 1	AAAATGCTGGCCTAATAGACTTG	GCACCGTGGAATATGTAACGA
PPAR- δ	GTTTGCTGTCAAGTTCAATGCG	ACTGGCTGTCAGGGTGGTTG
PGC-1 α	TGTTCCCGATCACCATATTCC	GTATTCATCCCTCTTGAGCCTTT
TFAM	AACCTTTGACACTCAGTTCATTTTCT	CAAGGCTCAAAGGTCAACAGA
β -actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTT

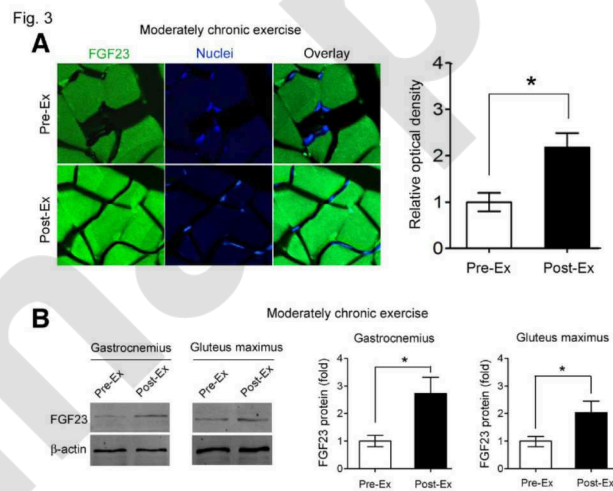
شکل 1.



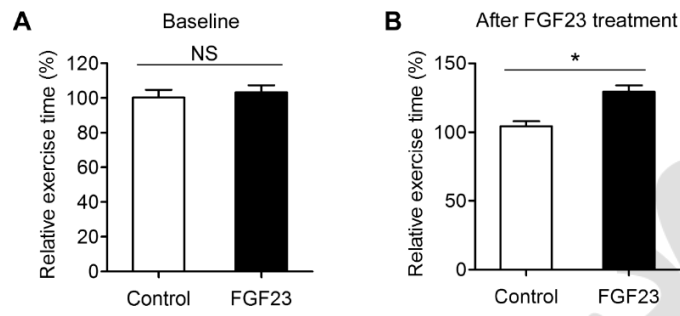
شکل 2.



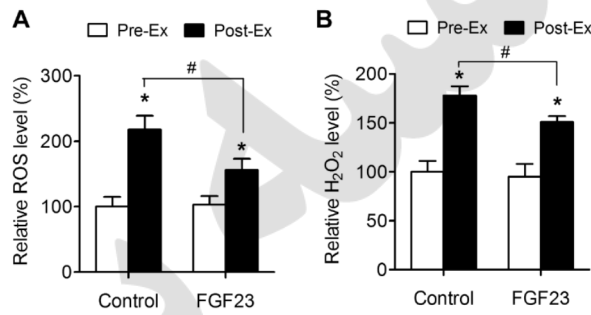
شکل 3.



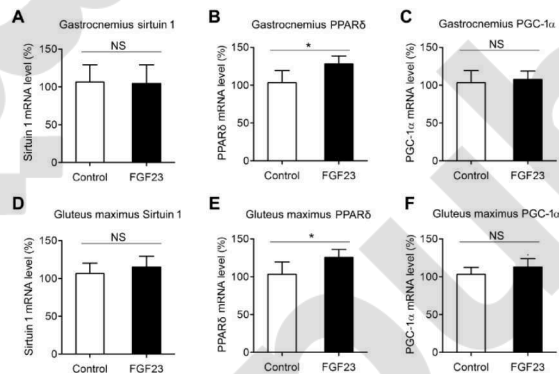
شکل 4.



شکل 5



شکل 6



شکل 7

