

Research Paper

Effect of a Lower Limb Restless Period on Expression of *Mir-1* and *Mir-206* Neural Muscle Genes in Endurance Training Rats



Mahboubeh Sheikhan¹ , *Mohammad Reza Kordi² , Hamid Rajabi³

1. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kish Campus, University of Tehran, Kish, Iran.
2. Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.
3. Department of Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sports Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.



Citation: Sheikhan M, Kordi MR, Rajabi H. [Effect of a Lower Limb Restless Period on Expression of *Mir-1* and *Mir-206* Neural Muscle Genes in Endurance Training Rats (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS). 2020; 23(4): 570-579. <https://doi.org/10.32598/JAMS.23.4.5947.1>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.23.4.5947.1>



Article Info:

Received: 26 Jul 2019

Accepted: 10 Dec 2019

Available Online: 01 Oct 2020

Key words:

Muscular atrophy, MicroRNAs, *miR-1*, *miR-206*

ABSTRACT

Background and Aim Several microRNAs are involved in regulating muscle mass, which plays an essential role in hypertrophy and atrophy of skeletal muscle. The present study examined the expression of some genes as regulators of muscular atrophy following a period of inertia in rats.

Methods & Materials For this purpose, 18 male Sprague-Dawley rats were divided into three groups (Control, Exercise+inactivity, and Inactivity). The exercise+inactivity group run on the treadmill for 18 weeks and five times per week. The hindlimb of the animal was immobilized for seven days with the casting method. Soleus muscle was extracted and the expression of the genes was measured by the RT-PCR method. Univariate ANOVA and Tukey post hoc test was used to determine the differences ($\alpha=0.05$).

Ethical Considerations The Ethics Committee of the Tehran University of Medical Sciences Research approved this study (Code: IR.SUMS.REC.1396.S 463).

Results Results showed that immobilization in both Exercise+ inactivity and inactivity groups, compare to the control group, increased expression of *miR-1* genes ($P<0.10$), $FOXO3_a$ ($P<0.001$) and decreased expression of *miR-206* ($P<0.007$) and *IGF-1* ($P<0.001$). This difference was statistically significant.

Conclusion According to the results of this study, it can be said that changes in the expression of RNAs by chromatography cause changes in the expression of muscle regulating genes, and although endurance exercises have protective effects, they cannot prevent these changes.

Extended Abstract

1. Introduction

Muscle atrophy is caused by the aging, inactive lifestyle, suspension, and a variety of pathological conditions [1]. Exercise can cause hypertrophy by inhibiting atrophic factors such as FOXO by developing the AKT pathway [3]. FOXO is inhibited by AKT and PGC-

1 α and decreased expression of PGC-1 α has also been observed in inactivity [4]. Little information is known about the role of miRNAs and their effects in the sedentary period after a training period [11]. *miR-1* and *miR-206* because they play an important role in increasing and inhibiting and on the other hand *miR-1* is directly regulated by $FOXO3_a$ and inhibits *IGF-1* and in contrast *miR-206* through MyoD degradation was able to reduce $FOXO3_a$. The result is a lack of reduction in *IGF-1* and ultimately maintenance of protein synthesis in inactivity [13]. This study aimed to

* Corresponding Author:

Mohammad Reza Kordi, PhD.

Address: Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel: +98 (912) 3300076

E-mail: mrkordi@ut.ac.ir

Table 1. Mean±SD of weight and food intake of groups and results of statistical test of analysis of variance

Index	Mean±SD			One-way Analysis of Variance
	Control	Exercise + Inactivity	Inactivity	
Body weight (g)	363.6±14	341.4±14	337.6±08	----
Soleus muscle (mg)	220.6±11	231.2±9	189.2±12†	F=30.614 Sig:0.002
Soleus muscle / body weight (mg / kg)	638.8±34	690.8±35	500.2±35†	F=162.050 Sig:0.016
Food intake (g / daily)	23.8±3	30.6±3	14.4±5†	F=151.964 Sig:0.001

† Significant changes compared to the trained group;

‡ Significant changes compared to the sedentary group.

investigate the expression of *miR-1*, *miR-206*, *IGF-1*, and *FoxO3_a* genes following a short period of inactivity in trained and untrained rats.

2. Materials and Methods

The present study was fundamental and experimental. A total of 18 male Sprague-Dawley rats at the age of eight weeks with an average weight of 200±20 g were randomly divided into control groups (n=6) and endurance training groups (n=12). The rats in the endurance training group performed endurance training for 6 weeks and five days a week. Training started at 17.5 meters per minute for 15 minutes and reached 30 meters per minute for 60 minutes. The control group experienced walking on a treadmill at a speed of five meters per minute for 15 minutes [15]. The rats were anesthetized 48 hours after the last training session.

Both legs were then fixed at the hip, knee (in extension), and ankle (in plantar flexion) [16] for seven days. Immobilization of the lower extremities and the ability to freely consume water and food was confirmed by observation. In the end, all rats were anesthetized and soleus muscle was extracted and the expression of the desired genes was measured by the RT-PCR method and the ratio of the target gene to reference gene was calculated using CT-2 formula. To determine the differences, the one-way ANOVA method and Tukey post hoc test were used at a significant level ($\alpha \geq 0.05$).

3. Results

Soleus muscle weight The ratio of horseshoe muscle weight to body weight and food intake of the exercise group compared to the sedentary-exercise + sedentary group were statistically significant (Table 1).

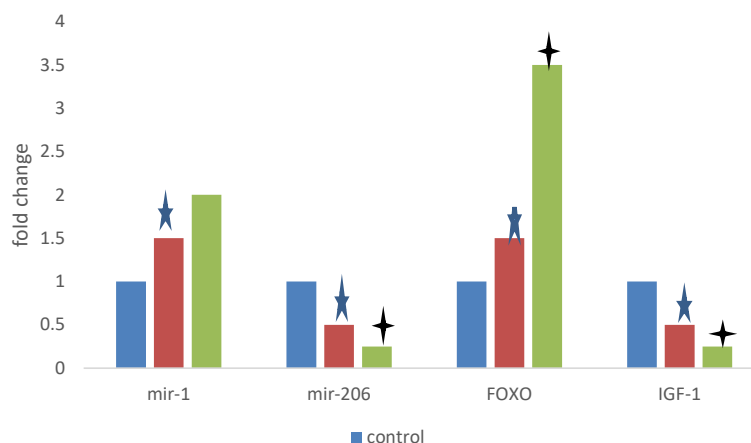


Figure 1. Changes in gene expression levels of groups and results of one-way analysis of variance with significant level ($\alpha \geq 0.05$)

* The sign indicates significant changes in the exercise+sedentary group compared to the control group;

+ The sign indicates significant changes in the sedentary group compared to the exercise+sedentary group.

Increased expression of *miR-1* ($P=0.012$), *FOXO3_a* ($P=0.001$) genes and decreased expression of *miR-206* ($P=0.007$) and *IGF-1* ($P=0.003$) in the exercise+inactivity group and the inactivity group compared to the control group, these differences were statistically significant. Also, the in-group results showed a non-significant increase in *miR-1* gene expression ($P=0.068$) in the inactive group compared to the exercise+inactivity group, but an increase in *FOXO3_a* ($P=0.004$) in the inactive group compared to the exercise + group. Inactivity was significant. Also, the inactive group showed a significant decrease in the expression of *miR-206* ($P=0.030$) and *IGF-1* ($P=0.002$) genes compared to the exercise + inactivity group (Figure 1).

4. Discussion and Conclusion

The most important findings of this study were the increase in the expression of atrophy stimulus genes (*miR-1* and *FOXO3_a*) and the decrease in the expression of muscle hypertrophy stimulus genes (*miR-206* and *IGF-1*) in the exercise+inactivity group and the inactivity group compared to the control group, which confirms the principle of training reversibility. Endurance exercise activities with increased aerobic performance and development of antioxidant capacity create favorable conditions for hypertrophy.

By decreasing reactive oxygen species and increasing PGC-1 α expression, the *FOXO3_a*-associated atrophy signal pathways associated with *miR-1* are reduced. Exercise appears to increase *IGF-1*, which is associated with *miR-206*. With inactivity, the first thing that happens in the muscles is a decrease in aerobic power, which has been shown to decrease PGC-1 α expression. This reduction reduces the intracellular content of muscle, especially intracellular water, which in turn reduces antioxidant defenses, and ultimately allows atrophic pathways to grow due to the absence of hypertrophic agents.

Despite the protective effects of exercise activities against atrophy due to inactivity, the effect of complete inactivity will be greater due to high levels of fitness. This process is achieved by reducing the stimulants of hypertrophy and increasing the inhibitory factors by reducing the antioxidant defense and will play a very important role in the development of growth hormones. In addition, very important cellular markers called *miR-206* are reduced, which causes the atrophy process to continue. In spite of the importance of preventing this regressive process and reducing ideal bodily function, there is still no clear way to deal with this inactive condition and the need for further studies and training (nutrition training) and nutritional interventions (polyphenols such as quercetin and curcumin) is felt.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This paper ethically approved by the research ethics committee of Tehran University of Medical Sciences (Code: IR.SUMS.REC.2017.S444).

Funding

The paper was extracted from the PhD. dissertation of the first author, the Department of Sports Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Kish Campus, University of Tehran.

Authors' contributions

All authors contributed in preparing this article.

Conflicts of interest

The authors declared no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank dr. Mohammad Reza Kordi and dr. Hamid Rajabi.

اثر یک دوره بی‌حرکی اندام تحتانی بر بیان ژن‌های *mir-1* و *mir-206* عضله نعلی رت‌های تمرین کرده‌استقامتی

محبوبه شیخان^۱، *محمد رضا کردی^۲، حمید رجبی^۳

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران پردیس کیش، کیش، ایران.
۲. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: microRNAsهای متعددی در تنظیم توده عضلانی دخیل هستند که در هایپرتروفی و آتروفی عضلات اسکلتی نقشی اساسی را ایفا می‌کنند. پژوهش حاضر بیان برخی از ژن‌ها را به عنوان تنظیم‌گرهای آتروفی عضلانی در پی یک دوره کوتاه بی‌حرکی در رت‌های تمرین کرده‌استقامتی مورد بررسی قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها: به همین منظور هجده سر رت نر اسپراک داوولی به سه گروه (کنترل، تمرین + بی‌حرکی و بی‌حرکی) تقسیم شدند. رت‌های گروه تمرین طی شش هفته و هر هفته پنج جلسه روی تردمیل دویدند. اندام تحتانی حیوانات برای هفت روز با روش قالب‌گیری بی‌تحرك شد. عضله نعلی استخراج و میزان بیان ژن‌های موردنظر به روش RT-PCR اندازه‌گیری شد. جهت تعیین تفاوت‌ها از روش آنووا یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری ($\alpha \leq 0.05$) استفاده شد.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1396.S463 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد، در گروه ورزش + بی‌حرکی و گروه بی‌حرکی نسبت به گروه کنترل، شاهد افزایش بیان ژن‌های *miR-1* ($P=0.010$)، $FOXO_3$ ($P=0.001$) و کاهش بیان *miR-206* ($P=0.007$) و *IGF-1* ($P=0.001$) بودیم که این اختلافات از لحاظ آماری معنادار بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، می‌توان عنوان کرد که احتمالاً تغییرات بیان میکروRNAها در شرایط بی‌حرکی موجب تغییر بیان ژن‌های تنظیم‌گر توده عضلانی می‌شود. تمرینات استقامتی اثر محافظتی دارند، اما موجب پیشگیری از این تغییرات نمی‌شوند.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۴ مرداد ۹۸

تاریخ پذیرش: ۱۹ آذر ۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ مهر ۱۳۹۹

کلیدواژه‌ها:

آتروفی عضلانی، میکرو RNAs، *miR-1*، *miR-206*

مقدمه

دارد. IGF-1 از طریق مسیر AKT-mTOR نقش مهمی در سنتز ژن‌ها و پروتئین‌های عضلات اسکلتی ایفا می‌کند [۱]. زمانی که مسیر AKT غیرفعال شود، منجر به آتروفی عضلانی از طریق فعال شدن فاکتوری به نام FOXO می‌شود [۲].

فعالیت‌های ورزشی از طریق تحریک ترشح هورمون رشد، AMPK، تحریک گیرنده‌های انسولینی^۱ و بالانس مثبت انرژی، به‌ویژه آمینواسیدها می‌توانند موجب افزایش عوامل تحریکی مسیر AKT شوند و هایپرتروفی را از طریق مهار عوامل آتروفی از جمله FOXO را فعال کنند [۳]. در واقع فعالیت‌های هوازی با سازگاری‌های مطلوب سلولی موجب یک اثر محافظتی در برابر

آتروفی عضلانی در شرایطی مثل پیری، عدم استفاده از اندام، تعلیق و انواعی از شرایط پاتولوژیک ایجاد می‌شود. در همه این وضعیت‌ها فعالیت‌های انقباضی و در نتیجه فشار مکانیکی و کشش داخل و خارج سلولی میوفیبرها کم می‌شود. بی‌وزنی عضلات از طریق تعلیق اندام، یک مدل عدم استفاده از عضله است که باعث آتروفی قابل توجه عضله اسکلتی می‌شود [۱]. تغییرات سبب عضله اثر خالص تغییرات در میزان سنتز و تجزیه پروتئین است و فاکتور رشد شبه‌انسولینی IGF-1 به عنوان یک عامل کلیدی هر دو فرایند را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به همین ترتیب تغییرات در سیگنالینگ آن تأثیر قوی بر اندازه عضلات

1. Insulin Receptors (IRS)

* نویسنده مسئول:

دکتر محمد رضا کردی

نشانی: تهران، دانشگاه تهران، دانشکده تربیت بدنی، گروه فیزیولوژی ورزشی.

تلفن: ۳۳۰۰۰۷۶ (۹۱۲) ۹۸+

پست الکترونیکی: mrkordi@ut.ac.ir



خاص، *miR-1* و *miR-206* به دلیل اینکه نقش مهمی در افزایش مهار IGF-1 دارند و از طرفی *miR-1* به طور مستقیم توسط *FOXO3* تنظیم و موجب مهار IGF-1 می‌شود. در مقابل *miR-206* از طریق تخریب MyoD می‌تواند *FOXO3* را کاهش دهد و مهار فاکتور *FOXO3* می‌تواند موجب کاهش *miR-1* و افزایش *miR-206* شود که نتیجه آن عدم کاهش IGF-1 و در نهایت حفظ سنتز پروتئین و حفظ توده عضلانی در دوران بی‌تحركی می‌شود [۱۳]. در مدل سابتوکاینی تجزیه عضلانی (TWEAK) مشخص شد که بیان *miR-1*، *miR-23*، *miR-133a*، *miR-133b* و *miR-206* در سلول‌های C2C12 کاهش می‌یابد، اما در عضلات اسکلتی موش‌ها فقط بیان *miR-133a*، *miR-1* و *miR-133b* کاهش یافت [۱۴].

آن و همکاران عنوان کردند یازده روز بی‌جاژیکی موجب کاهش معنادار *miR-206* شد. این در حالی بود که *miR-133a* و *miR-1* به افزایشی داشتند [۱۵]. به نظر می‌رسد فعالیت‌های ورزشی هوازی با سازگاری‌های مطلوب به‌ویژه در افزایش عوامل رشدی و توسعه وضعیت هایپرتروفی و انتی‌اکسیدانی موجب یک اثر محافظتی بر دستگاه‌های بدن، به‌ویژه عضلات اسکلتی شوند که در زمان عدم تحرک در یک مدت‌زمان مشخص نسبت به اندامی که فعالیت و سازگاری خاصی نداشته است توانایی حفظ توده خود و شرایط مطلوب را بیشتر داشته باشد و مسیرهای آتروفی در آن اندام دیرتر آغاز شود. هرچند با وجود سازوکارهای پیچیده مربوط به آتروفی عضلانی در اثر بی‌تحركی اندام‌ها و نقش بارز عوامل مهارتی تحریکی این فرایند یعنی *FOXO3* و IGF-1 نیازمند تغییرات عوامل مهمی چون miRNAs به‌ویژه *miR-1* و *miR-206* در دوران بی‌تحركی پس از سازگاری ورزشی بررسی شود. همچنین باید بدانیم ارتباط این عوامل با دو فاکتور مهم تأثیرگذار آتروفی به چه نحوی است؛ از این رو در این پژوهش هدف، بررسی بیان ژن‌های *miR-1*، *miR-206*، IGF-1 و *FOXO3* به عنوان تنظیم‌گرهای آتروفی عضلانی به دنبال یک دوره بی‌تحركی کوتاه در رت‌های تمرین‌کرده و تمرین‌نکرده بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع بنیادی و به روش تجربی بود. تعداد هجده رت نر نژاد اسپراگ داوولی در سن هشت‌هفتگی با میانگین وزنی 20 ± 20 گرم از مرکز آزمایشگاه حیوانات دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند و به آزمایشگاه حیوانات منتقل و در شرایط دمایی 23 ± 3 درجه سانتی‌گراد تحت چرخه خواب و بیداری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و رطوبت ۴۰ تا ۶۰ درصد و درجه حرارت 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (مجوز کد اخلاقی به شماره IR.SUMS.REC.1396.S444). رت‌ها به طور تصادفی به دو گروه کنترل ($n=6$) و گروه تمرین استقامتی ($n=12$) تقسیم شدند. رت‌های گروه تمرین استقامتی به مدت

آتروفی می‌شود و از طرف دیگر مسیرهای هایپرتروفی را توسعه می‌دهد تا نسبت سنتز به تجزیه پروتئین را افزایش دهد، زیرا نشان داده شده است که تمرینات هوازی می‌توانند موجب افزایش اندازه عضلات از طریق مهار مسیرهای آتروفی شود. شواهد به‌روشنی نشان می‌دهند که FOXO توسط دو فاکتور AKT و PGC-1 α مهار می‌شود و کاهش بیان PGC-1 α نیز در دوره عدم استفاده عضلانی روشن شده است [۴]. در تحقیقی تعلیق پای عقبی رت‌ها (HLS) برای یک تا دو هفته باعث تغییر سطح بیان ژن IGF-1 در ماهیچه gastrocnemius، soleus و plantaris نشد [۵]. در مقابل یک تا دو هفته پس از HLS، سطح بیان ژن IGF-1 در عضلات یادشده کاهش یافته بود [۶].

مطالعه دیگری نشان داد HLS در جوندگان همراه با کاهش سطح پروتئین IGF-1، برای حداقل چهارده روز باعث کاهش سطح Akt فسفریله و یا کاهش غلظت پروتئین IRS-1 در ماهیچه‌های Soleus و Gastrocnemius شده است و این نشان داده است که HLS زمانی که با کاهش سیگنالینگ IGF-1/P13K/Akt همراه شده باشد، محرک قوی برای آتروفی است [۷]. علاوه بر کاهش سطح پروتئین IGF-1، توضیح کاهش فسفوریلاسیون Akt و آتروفی عضلانی در هنگام تعلیق می‌تواند به دلیل افزایش بیان ligase ubiquitin cbl-b باشد که منجر به افزایش کمپلکس‌های یوبیکوئیتینه‌شده از IRS-1 شود [۸]. به طور خلاصه، سیگنالینگ Akt /P13K /IGF-1 در هنگام تعلیق عضلات مختلف جوندگان کاهش می‌یابد، در حالی که بیان ژن IGF-1 فقط در روزهای اول HLS کاهش می‌یابد، سازوکارهای زیاد و عوامل متعددی در چرخه پروتئین‌ها دخیل هستند [۹].

یک فاکتور نسبتاً جدید از این عوامل متعدد (microRNA-*mir-1* ها هستند [۱۰]. miRNAs مولکول‌های رمزنگاری‌نشده کوچکی (۱۸-۲۵ نوکلئوتیدی) هستند که از نظر تکاملی محافظت شده هستند. این مولکول‌ها، بیان ژن را پس از رونویسی از طریق مهار ترجمه mRNA یا القای تجزیه آن کنترل می‌کنند و این کار را از طریق اتصال به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای mRNAs انجام می‌دهند [۱۱]. در شرایط بی‌تحركی، عضلات اسکلتی را می‌توان مهم‌ترین بافتی دانست که دستخوش تغییرات قرار می‌گیرند؛ به طوری که تنها با هفت روز افزایش بار کاری بیان عضله Pre *miR-206*، Pre *miR-1-2* و Pre *miR-133a* افزایش داشت، اما بیان *miR-1* و *miR-133a* کاهش ۵۰ درصدی داشت [۱۲]. اگرچه تغییرات miRNAs در بسیاری از شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک بررسی شده است اما اطلاعات بسیار اندکی از تغییرات و تأثیرات آن‌ها در دوره بی‌تحركی بعد از یک دوره تمرین استقامتی در دست است. همچنین مشخص شده است هفت روز معلق‌سازی اندام تحتانی موجب کاهش بیان *miR-107*، *miR-208b*، *miR-221* و *miR-499* در عضله نعلی رت‌ها می‌شود [۱۱]. بیان *miR-1* توسط *FOXO3* تنظیم می‌شود و موجب مهار سنتز پروتئین IGF-1 می‌شود [۱۲]. به طور

جدول ۱. طرح پروتکل تمرین هوازی تداومی

سرد کردن	بدنه اصلی تمرین					گرم کردن	مراحل تمرین / مؤلفه تمرین
۵ دقیقه	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۵	زمان تمرین (دقیقه)
	۳۰	۲۷/۵	۲۵	۲۲/۵	۲۰	۱۷/۵	سرعت (متر بر دقیقه)



و بر اساس پروتکل سنتز cDNA موجود در کیت انجام شد. با اضافه کردن RNase inhibitor جهت از بین بردن آلودگی، سنتز cDNA در دستگاه ترموسایکر (Cleaver Scientific Ltd, Warwickshire, United Kingdom) انجام شد. به منظور اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌های مربوطه از روش PCR Real Time-PCR (qRT-PCR) با کمک آنزیم RealQ Plus 2x Master Mix Green Ampliqon A/S Sten- huggervej Denmark، ساخت کشور دانمارک و با استفاده از دستگاه applied Bio systems Step One™ ساخت کشور آمریکا (Foster city celiforniae) صورت گرفت. مخلوط واکنش بر اساس پروتکل پیشنهادی بدین صورت آماده شد. ۲ میکرولیتر از cDNA الگو، ۱۰ میکرو لیتر مسترمیکس، 10X PCR Buffer ۶/۸ میکرولیتر، ۱ میکرو لیتر از هر دو پرایمر Forward و Reverse و ۰/۴ میکرولیتر از Tag DNA Polymerase برای به دست آوردن بهترین دما آنالینگ مورد استفاده قرار گرفت و آب که حجم نهایی واکنش به ۲۵ میکرولیتر رسید.

برنامه زمانی گرمایی دستگاه طبق این مراحل انجام شد: پروتکل دمایی به صورت دنا تورا سیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه متوالی به صورت دنا تورا سیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. در مرحله آخر ضمن بررسی نمودار ذوب، محصولات توسط الکتروفورز در سطح ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer-BLAST (NCBI) طراحی شدند (جدول شماره ۲). همچنین از ژن Beta 2 Microglobulin (*B2M*) به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه چرخه آستانه (CT) انجام شد. منحنی تکثیر هر واکنش PCR با منحنی تکثیر ژن مرجع *B2M* مربوطه نرمالیزه شد. در این مطالعه، اختلاف CT به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش و نمونه‌های کنترل محاسبه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع محاسبه شد. از آب به عنوان کنترل منفی واکنش PCR در هر دور از واکنش PCR برای هر ژن استفاده شد.

مخلوط واکنش بر اساس پروتکل پیشنهادی آماده شد که برنامه زمانی گرمایی دستگاه طبق این مراحل انجام شد. مرحله

شش هفته و پنج روز در هفته، تمرین استقامتی انجام دادند. ابتدا، پیش از تمرینات اصلی حیوانات به منظور آشناسازی یک هفته و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه و با سرعت ۵ تا ۱۵ متر بر دقیقه دویدند. تمرین اصلی بعد از دو روز استراحت با سرعت ۱۷/۵ متر بر دقیقه برای ۱۵ دقیقه شروع شد و به ۳۰ متر بر دقیقه در ۶۰ دقیقه رسید (جدول شماره ۱). برای افزایش شدت تمرین به صورت تناوبی یک هفته سرعت افزایش پیدا می‌کرد و یک هفته زمان تمرین افزایش پیدا کرد تا میزان اصل اضافه‌بار با توجه به پروتکل تمرینی در طول دوره شش هفته حفظ شود. در این مدت گروه کنترل پیاده‌روی روی تردمیل را با سرعت ۵ متر بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه تجربه کردند [۱۵]. برای بی‌تحرك سازی اندام تحتانی ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، رت‌ها با ترکیبی از کتامین / زایلازین بی‌هوش شدند. سپس هر دو پا با استفاده از چسب ضد حساسیت و لوکوپلاست از مفاصل ران، زانو (در حالت اکستنشن) و مچ پا (در حالت پلانتر فلکشن) [۱۶] برای هفت روز فیکس شدند. بی‌حرکت شدن اندام تحتانی و توانایی مصرف آزادانه آب و غذا با مشاهده تأیید شد.

در پایان تمامی رت‌ها بی‌هوش شدند و عضله نعلی استخراج و در سرم فیزیولوژیک مورد شست‌وشو قرار گرفت و سپس بلافاصله برای سنجش‌های بعدی در دمای منهای ۸۰ درجه فریز شد و برای آزمایش‌های سلولی و مولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. بافت‌ها با استفاده از یک میلی‌مول محلول تریزول (Invitrogen) لیز شده و با دستگاه همگن‌کننده بافت کاملاً هموزن شده و در مرحله بعد، جداسازی از فاز آبی به کمک ۰/۲۵ میلی‌لیتر نیتروژن انجام پذیرفت. استخراج RNA با ۵۰ میلی‌گرم بافت که با استفاده از RNX - Plus لیز شده بود، توسط کیت شرکت یکتا تجهیز آزما ساخت ایران (تهران) (YT9065) و بر اساس دستورالعمل کیت انجام گرفت. برای جدا سازی RNA از کلروفورم و ایزوپروپانول و شست‌وشوی آن از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. جهت از بین بردن آلودگی‌های DNA از RNase-DNase-free استفاده شد.

کل نمونه‌ها با دستگاه پیکودراپ (picodrop limited, Hinx-) جهت اندازه‌گیری RNA و سنجش غلظت در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۳۰/۲۸۰ مورد سنجش قرار گرفتند. سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis، شرکت فریمنتاز آمریکا (Waltham, Massachusetts, USA) به شماره K1622

جدول ۲. پرایمرهای Real-time PCR استفاده شده در مطالعه

Genes	Primer Sequences
Mir-1	Forward: 5'- ATGAAAAGGTTGAGACTTTTCA -3' Reverse: 5'- GCAAAGTGGCAGAACAATG -3'
Mir-206	Forward: 5'- CCCAACAAGCTCTGCCTG -3' Reverse: 5'- GGGAGCATAGTTGACCTGAAAC -3'
IGF-1	Forward: 5'- CTCTAACATCTCCCATCTCTC -3' Reverse: 5'- TTCAAGAAGTCACATAGGCAG -3'
FOXO ₃	Forward: 5'- TTCGCAAGGACCCAATGA -3' Reverse: 5'- TCCAAGCTCCATTGAACAT -3'
B2m	Forward: 5'- CGTGCTTGCCATTGAGAAA -3' Reverse: 5'-ATATACATCGGTCTCGGTGG -3'

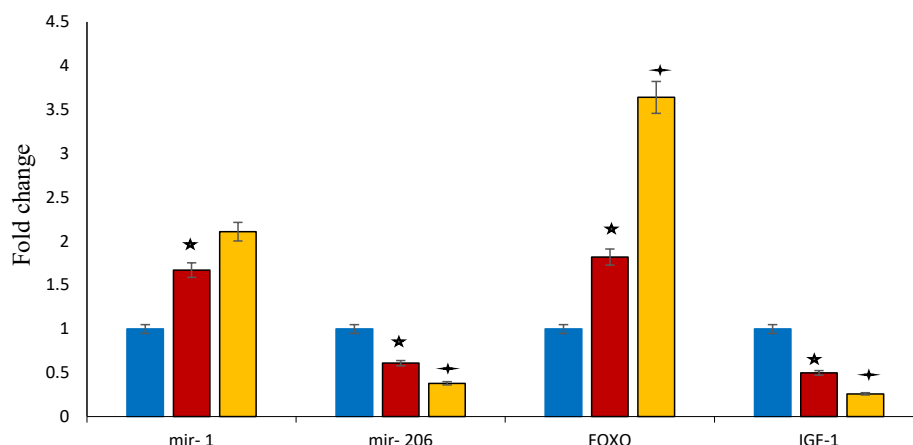


آزمایش و نمونه‌های کنترل محاسبه و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت ژن هدف به ژن مرجع اندازه‌گیری شد. اطلاعات مورد نیاز پس از جمع‌آوری، توسط نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ و کلیه نتایج به صورت میناگین و انحراف معیار بیان و در سطح معنی‌داری ($\alpha \leq 0.05$) پردازش و سپس تحلیل شدند. جهت بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگوروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه تفاوت بین گروه‌ها نیز آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (آنووا) و آزمون تعقیبی توکی مورد استفاده قرار گرفت.

اول که منجر به واسرشته شدن^۲ مولکول‌های cDNA شد به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برای ۴۰ چرخه متوالی بود و در مرحله آخر ضمن بررسی نمودار ذوب، محصولات توسط الکتروفورز در سطح ژل آگارز مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس مقایسه چرخه آستانه (CT) انجام شد. منحنی تکثیر هر واکنش PCR با منحنی تکثیر ژن مرجع $\beta 2M$ مربوطه نرمالیز شد.

در این مطالعه، اختلاف CT به دست آمده از نمونه‌های مورد

2. Denaturation



تصویر ۱. تغییرات سطح بیان ژن گروه‌ها و نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه با سطح معنی‌داری ($\alpha \leq 0.05$)

* نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار گروه تمرین + بی‌تحرك نسبت به گروه کنترل است؛
+ نشان‌دهنده تغییرات معنی‌دار گروه بی‌تحرك نسبت به گروه تمرین + بی‌تحرك است.



جدول ۳. میانگین و انحراف استاندارد وزن و غذای دریافتی گروه‌ها و نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه

شاخص	میانگین ± انحراف معیار		
	کنترل	تمرین	بی‌تحرک
وزن بدن (گرم)	۳۶۳/۶ ± ۱۴	۳۴۱/۴ ± ۱۴	۳۳۷/۶ ± ۰.۸
وزن عضله نعلی (میلی‌گرم)	۲۲۰/۶ ± ۱۱	۲۳۱/۲ ± ۹	۱۸۹/۲ ± ۱۳*
نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن (میلی‌گرم / کیلوگرم)	۶۳۸/۸ ± ۳۴	۶۹۰/۸ ± ۳۵	۵۰۰/۲ ± ۳۵*
غذای دریافتی (گرم / روزانه)	۲۳/۸ ± ۳	۳۰/۶ ± ۳	۱۴/۴ ± ۵*



* تغییرات معنی‌دار نسبت به گروه تمرین.

یافته‌ها

وزن عضله نعلی، نسبت وزن عضله نعلی به وزن بدن و تغذیه دریافتی گروه تمرین نسبت به گروه بی‌تحرک و گروه تمرین + بی‌تحرک از لحاظ آماری معنادار بودند (جدول شماره ۳).

بیان نسبی ژن‌های مورد بررسی در تصویر شماره ۱ ارائه شده است. نتایج آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی نشان داد که گروه تمرین + بی‌تحرکی و گروه بی‌تحرک نسبت به گروه کنترل موجب افزایش بیان ژن‌های *miR-1* ($P=0.012$) و *FOXO3* ($P=0.001$) و از طرفی موجب کاهش بیان *miR-206* ($P=0.007$) و *IGF-1* ($P=0.003$) شد که این اختلافات از لحاظ آماری معنادار بود. همچنین نتایج درون‌گروهی نشان داد که گروه بی‌تحرک نسبت به گروه تمرین + بی‌تحرکی موجب افزایش بیان ژن‌های *miR-1* ($P=0.068$) شد که از لحاظ آماری غیر معنادار بود، اما افزایش *FOXO3* ($P=0.004$) نسبت به گروه تمرین + بی‌تحرکی معنادار بود. همچنین بی‌فعالیتی گروه بی‌تحرک موجب کاهش بیان *miR-206* ($P=0.030$) و *IGF-1* ($P=0.002$) نسبت به گروه تمرین + بی‌تحرکی شد که این اختلافات از لحاظ آماری معنادار بود.

بحث

مهم‌ترین یافته پژوهش حاضر افزایش بیان ژن‌های تحریک‌کننده آتروفی (*miR-1* و *FOXO3*) و کاهش بیان ژن‌های تحریک‌کننده هایپروتروفی عضلانی (*miR-206* و *IGF-1*) در هر دو گروه تمرین همراه با بی‌تحرکی و گروه بی‌تحرک نسبت به گروه کنترل پس از دوره بی‌تحرکی بود. این نتایج به طور کلی تأییدکننده اصل بازگشت‌پذیری تمرینی است؛ به گونه‌ای که پس از پایان جلسات تمرینی و تنها با گذشت یک هفته از تمرین و بی‌تحرکی، سازگاری‌های به‌دست‌آمده شروع به کاهش کردند و این کاهش به طور خاص با حرکت اندام‌ها ارتباط داشت (برخلاف شیوه قطع عصب و سالمندی). آن و همکاران عنوان کردند یازده

روز بی‌جاذبگی موجب کاهش معنادار *miR-206* شد، این در حالی بود که *miR-1* و *miR-133a* روند رو به افزایشی داشتند [۱۴]. این یافته‌ها در راستای یافته‌های بودین و همکاران بود که نشان دادند کاهش *miR-206* موجب افزایش خانواده XOB-F (xobFAM یا atrogen-1) می‌شود که منجر به آتروفی می‌شوند [۱۷]. این یافته‌ها توسط چندین مطالعه دیگر مانند مطالعه گلس و همکاران (۲۰۰۵)، لگر و همکاران (۲۰۰۶)، دوکت و همکاران (۲۰۰۷) و لگر و همکاران (۲۰۰۸) نیز تأیید شده است [۱۸-۲۱]. اینک *miR-206* به‌طور مستقیم یا غیر مستقیم تأثیر در مهار آتروفی دارد، مشخص نیست؛ اما *miRNA* توسط *MyoD* تنظیم می‌شود [۲۲]؛ پروتئینی که توسط *atrogen-1* و *MAFbox* تجزیه می‌شود [۲۳]. البته یکی از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم سنجش بیان ژن‌های *MyoD* و *MAFbox* است.

فعالیت‌های ورزشی از نوع استقامتی با افزایش عملکرد هوازی و توسعه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجب ایجاد شرایط مطلوب برای هایپروتروفی می‌شود. درواقع با کاهش مقادیر گونه‌های فعال اکسیژنی و افزایش بیان *PGC-1α*، مسیرهای سیگنالی آتروفی مرتبط با *FOXO3* که با *miR-1* در ارتباط هستند، کاهش می‌یابند و علاوه بر آن به نظر می‌رسد فعالیت‌های ورزشی از هر نوعی باعث افزایش *IGF-1* شوند که مرتبط با *miR-206* است [۸]. این ویژگی‌ها در اثر فعالیت ورزشی موجب یک اثر محافظتی روی عضلات و سایر قسمت‌های بدن در مواقع استراحتی می‌شود و توان بدنی برای مقابله با شرایط پاتولوژیک را توسعه و بهبود می‌دهد.

با ایجاد بی‌تحرکی اولین اتفاقی که در عضلات می‌افتد کاهش توان هوازی است که با کاهش بیان *PGC-1α* به‌خوبی نشان داده شده است. این کاهش به‌مرور موجب کاهش محتوای درون‌سلولی عضله به‌ویژه آب درون‌سلولی می‌شود که به نوبه خود باعث کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود و درنهایت مسیرهای محرک آتروفی به دلیل نبود عوامل هایپروتروفی اجازه رشد می‌یابند. از علل اصلی کاهش *miR-206* و سایر عوامل محرک رشدی عضله در گروه

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با کد اخلاق IR.SUMS.REC.1396.S444 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید.

حامی مالی

این مقاله مستخرج از رساله دکتری نویسنده اول، در گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه تهران پردیس کیش است.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجالت پزشکی را دارا بودند و همگی به یک اندازه در نگارش اثر سهم داشتند.

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند هیچ‌گونه تضاد منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از استادان بزرگوار، جناب آقای دکتر محمدرضا کردی و دکتر حمید رجبی که در انجام این مطالعه یاری‌رسان بودند، تقدیر کنند.

تمرین به همراه بی‌تحریکی نسبت به گروه کنترل را می‌توان سطح بالاتر اندازه تارهای عضلانی پس از پایان دوره سازگاری ورزشی دانست؛ زیرا مشخص شده است هرچه میزان هایپرتروفی در ابتدای بی‌تحریکی بیشتر باشد مقدار از دست دادن توده عضلانی در ابتدا بیشتر خواهد بود. این کاهش در دوره بی‌تحریکی کاملاً مرتبط با عدم حرکت و فشارهای درونی و بیرونی است و احتمالاً مرتبط با کاهش سیگنالینگ IGF1-PI3K-AKT است. البته تأثیر سازگاری تمرینات مقاومتی بر ژن‌های مورد سنجش احتمالاً اطلاعات مفیدی در دوره بی‌تحریکی ایجاد می‌کند، زیرا کاهش اندازه تارهای عضلانی در دوره سالمندی و در زمان‌های قطع اعصاب با این فرایند بی‌تحریکی متفاوت است و کاهش معنی‌داری در کاهش سیگنالینگ IGF1-PI3K-AKT دیده می‌شود. نشان داده شده است که فعالیت‌های هوازی می‌توانند با تحریک بیان PGC-1 α موجب اثرات هایپروتروفی در عضلات ناآماده و تمرین‌نکرده شوند که اثر آنها از طریق مهار عوامل آتروفی صورت می‌گیرد که نسبت سنتز پروتئین به تجزیه پروتئین را افزایش می‌دهند. به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر مشابه با سایر پژوهش‌ها تمرین ورزشی موجب افزایش *mir-206* شده است که در دوره بی‌تحریکی افت شدید نسبت به گروه کنترل را نشان داده است. با وجود این، سنجش مقدار هایپرتروفی در عضله نعلی نسبت به وزن بدن نشان می‌دهد که در نهایت مقدار هایپرتروفی در گروه ورزش به همراه افزایش غذای دریافتی بیشتر نسبت به گروه بی‌تحریکی و گروه کنترل بیشتر بوده است و اگر مارکرهای آتروفی عضلانی بیشتر در گروه ورزش و بی‌تحریکی دیده می‌شود دلیل یکسانی ندارند و در واقع گروه بی‌تحریکی را می‌توان به دلیل روند توسعه‌ای آتروفی بدون اثرات محافظت‌شده ورزشی دانست، ولی از دلایل افزایش مارکرهای آتروفی در گروه ورزش و بی‌تحریکی می‌توان به سطح بالاتر عضلانی پس از دوره ورزشی و افت بیشتر دانست.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد با وجود اثرات محافظت‌کنندگی ناشی از فعالیت‌های ورزشی در مقابل آتروفی ناشی از عدم تحرک، به دلیل سطوح بالای توانایی و آمادگی، میزان اثرگذاری بی‌تحریکی کامل بیشتر خواهد بود و از طریق کاهش عوامل تحریکی هایپرتروفی و افزایش عوامل مهاری از طریق کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌دست‌آمده و برداشتن نقش هورمون‌های بسیار مهم رشدی این فرایند ایجاد خواهد شد و حتی یکی از نشانگرهای بسیار مهم سلولی به نام *mir-206* نیز کاهش می‌یابد و موجب ادامه روند آتروفی می‌شود. با وجود اهمیت جلوگیری از این فرایند پس‌رونده و کاهنده عملکرد ایده‌آل بدنی، هنوز راه روشنی برای مقابله با این شرایط بی‌تحریکی یافت نشده است و نیاز به مطالعات بیشتر و ایجاد مداخلات تمرینی (تمرین مقاومتی) و تغذیه‌ای (پلی‌فنول‌های همچون کوئرستین و کورکومین) است.

References

- [1] Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Violette L, et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*. 1995; 80(1):155-65. [DOI:10.1016/0092-8674(95)90460-3]
- [2] Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(10):1974-84. [DOI:10.1016/j.biocel.2005.04.018] [PMID]
- [3] Baar K, Wende AR, Jones TE, Marison M, Nolte LA, Chen M, et al. Adaptations of skeletal muscle to exercise: Rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J*. 2002; 16(14):1879-86. [DOI:10.1096/fj.02-0367com] [PMID]
- [4] Sandri M, Lin J, Handschin C, Yang W, Arany ZP, Lecker SH, et al. PGC-1 α protects skeletal muscle from atrophy by suppressing FoxO3 action and atrophy-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(44):16260-5. [DOI:10.1073/pnas.0607795103] [PMID] [PMCID]
- [5] Kyriakos A, Feeback DL, Layne CS, Martinez DA, Clarke MSF. Mechanical stimulation of the plantar foot surface attenuates soleus muscle atrophy induced by hindlimb unloading in rats. *J Appl Physiol*. 2005; 99(2):739-46. [DOI:10.1152/jappphysiol.00771.2004] [PMID]
- [6] Layne C. The Department of Health and Human Performance. [Phd. dissertation] Houston: College of Education-University of Houston; 2002-2003. <https://uh.edu/class/hhp/docs/annual-reports/Annualreport03.pdf>
- [7] Fitts RH, Riley DR, Widrick JJ. Physiology of a microgravity environment invited review: Microgravity and skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 2000; 89(2):823-39. [DOI:10.1152/jappl.2000.89.2.823] [PMID]
- [8] Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*. 2005; 280(4):2847-56. [DOI:10.1074/jbc.M411346200] [PMID]
- [9] Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, et al. Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol*. 2009; 29(17):4798-811. [DOI:10.1128/MCB.01347-08] [PMID] [PMCID]
- [10] McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2007; 102(1):306-13. [DOI:10.1152/jappphysiol.00932.2006] [PMID]
- [11] McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE. Evidence of MyomiR network regulation of β -myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics*. 2009; 39(3):219-26. [DOI:10.1152/physiolgenomics.00042.2009] [PMID] [PMCID]
- [12] Yang W, Chendrimada TP, Wang Q, Higuchi M, Seeburg PH, Shiekhattar R, et al. Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nat Struct Mol Biol*. 2006; 13(1):13-21. [DOI:10.1038/nsmb1041] [PMID] [PMCID]
- [13] Güller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: Their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol*. 2010; 588(Pt 21):4075-87. [DOI:10.1113/jphysiol.2010.194175] [PMID] [PMCID]
- [14] Panguluri SK, Bhatnagar S, Kumar A, McCarthy JJ, Srivastava AK, Cooper NG, et al. Genomic profiling of messenger RNAs and microRNAs reveals potential mechanisms of TWEAK-induced skeletal muscle wasting in mice. *PLoS One*. 2010; 5(1):e8760. [DOI:10.1371/journal.pone.0008760] [PMID] [PMCID]
- [15] Allen DL, Bandstra ER, Harrison BC, Thorng S, Stodieck LS, Kostenuik PJ, et al. Effects of spaceflight on murine skeletal muscle gene expression. *J Appl Physiol*. 2009; 106(2):582-95. [DOI:10.1152/jappphysiol.90780.2008] [PMID] [PMCID]
- [16] Kang C, Chung E, Diffie G, Ji LL. Exercise training attenuates aging-associated mitochondrial dysfunction in rat skeletal muscle: Role of PGC-1 α . *Exp Gerontol*. 2013; 48(11):1343-50. [DOI:10.1016/j.exger.2013.08.004] [PMID]
- [17] Frimel TN, Kapadia F, Gaidosh GS, Li Y, Walter GA, Vandenborne K. A model of muscle atrophy using cast immobilization in mice. *Muscle Nerve*. 2005; 32(5):672-4. [DOI:10.1002/mus.20399] [PMID]
- [18] Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 2001; 294(5547):1704-8. [DOI:10.1126/science.1065874] [PMID]
- [19] Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(10):1974-84. [DOI:10.1016/j.biocel.2005.04.018] [PMID]
- [20] Léger B, Cartoni R, Praz M, Lamon S, Dériaz O, Crettenand A, et al. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and Foxo1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *J Physiol*. 2006; 576(Pt 3):923-33. [DOI:10.1113/jphysiol.2006.116715] [PMID] [PMCID]
- [21] Doucet M, Russell AP, Léger B, Debigaré R, Joannisse DR, Caron M-A, et al. Muscle atrophy and hypertrophy signaling in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176(3):261-9. [DOI:10.1164/rccm.200605-7040C] [PMID]
- [22] Léger B, Derave W, De Bock K, Hespel P, Russell AP. Human sarcopenia reveals an increase in SOCS-3 and myostatin and a reduced efficiency of Akt phosphorylation. *Rejuvenation Res*. 2008; 11(1):163-175B. [DOI:10.1089/rej.2007.0588] [PMID]
- [23] Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet*. 2006; 38(2):228-33. [DOI:10.1038/ng1725] [PMID] [PMCID]