Iranian Journal of Breast Diseases. 2023; 15(4):51-68.

Original Article

Effects of Tunicamycin and N-acetylcysteine on Expression of Autophagy Markers and Cell Viability in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

Maryam Adelipour[1], Mahshid Naghashpour[2], Zeinab Eftekhar[3], Akbar Akbari[4], Abdolkarim Moazeni-roodi[5], Sahar Golabi[6*]

[1]Department of Clinical Biochemistry, Ahvaz Jundishapur University of Medical Science, Ahvaz, Iran
[2]Department of Nutrition, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran
[3]Qom University of Medical Sciences, Qom, Iran
[4]Department of Immunology, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran
[5]Department of Clinical Biochemistry, Iranshahr University of Medical Science, Iranshahr, Iran
[6]Department of Medical Physiology, School of Medicine, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

Receive: 2022/05/2
Accepted: 2022/10/17

***Corresponding Author:**
s.golabi@abadanums.ac.ir

Ethics Approval:
ABADANUMS.REC.1395.189

Abstract

Introduction: The worldwide incidence rate for cancer has been rising. However, the molecular mechanisms involved in tumor growth and metastasis are unclear. Autophagy is a cellular pathway that leads to cell death or survival depending on the specific condition of the tumor cells. The aim of this study was to evaluate the effects of activation or inhibition of the autophagy pathway using tunicamycin or N-acetylcysteine on cell viability in the MDA-MB-231 breast cancer cell line.

Materials and Methods: MDA-MB-231 cells were cultured in the presence of different doses of tunicamycin or N-acetylcysteine. Then, a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay was performed for the evaluation of tumor cell viability. Real-time PCR was carried out to evaluate the expression of the genes encoding for Becline-1 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) (as autophagy markers) in the MDA-MB-231 cell line. The LC3-II to LC3-I ratio and p62 were measured with western blotting.

Results: Tunicamycin significantly increased autophagy markers and inhibited cell viability in a time- and dose-dependent manner. A negative significant correlation was observed between the expression of autophagy markers and cell viability. However, N-acetylcysteine resulted in decreased autophagy and increased cell viability just at a concentration of 2mM.

Conclusion: Tunicamycin leads to activation of the autophagy pathway, resulting in a decrease in cell viability in breast cancer cells (MDA-MB-231); and N-acetylcysteine, at a low concentration, can inhibit autophagy and increase cell viability. Thus, the autophagy pathway can be considered a target **in cancer treatment.**

Keywords: Autophagy, Cell Viability, Tunicamycin, N-acetylcysteine, Cancer

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

Introduction

The worldwide incidence rate of cancer has been rising. However, the molecular mechanisms involved in tumor growth and metastasis are unclear [1]. Diagnosis and targeted therapy of cancer through the evaluation of intracellular molecular pathways have fascinated scientists in recent decades. Autophagy is a cellular pathway that may lead to cell death or survival depending on the specific condition of the tumor cells [2]. The aim of this study was to evaluate the correlation between activation or inhibition of the autophagy pathway using tunicamycin or N-acetylcysteine and cell viability in MDA-MB-231 breast cancer cells

Materials and Methods

This study was granted by Abadan University of Medical Sciences (Grant No. 96U-1165). Also, all procedures and methods were approved by the Ethic Committee of Abadan University of Medical Science (Ethics Code: ABADANUMS.REC.1395.189). MDA-MB-231 cells were cultured in the presence of different doses of tunicamycin (2, 5, and 10 mg/L) or N-acetylcysteine (2mM, 5mM, and 10mM) for 24 or 48 h. Then, a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay was performed for the evaluation of tumor cell viability. Real-time PCR was carried out for evaluation of the expression of genes encoding Becline-1 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) (as autophagy markers) and HPRT (as a housekeeping gene) in the MDA-MB-231 cell line. The LC3-II:LC3-I ratio and p62 were measured by western blotting. A one-way ANOVA followed by Tukey's test was used to compare gene expression between treated and untreated cells. The significance level was considered at 0.05.

Results

Tunicamycin inhibited cell viability in a time- and dose-dependent manner. While treatment with 2 and 5 mg/L of tunicamycin for 24 h had little effect, treatment with 10 mg/L for 24 h and 2, 5, and 10 mg/L of tunicamycin for 48 h significantly inhibited cell viability (42%, 89%, 93%, and 93%, respectively; $P < 0.05$) (Figures 1A and 1B). N-acetylcysteine had no significant effect on the viability of MDA-MB-231 cells at various concentrations for 24 h. Although treatment with 2mM of N-acetylcysteine for 48 h increased cell viability, treatment with 10nM or 20mM of N-acetylcysteine for 48 h decreased cell viability compared with the controls (30%, and 36% decrease; $P < 0.05$) (Figures 1C and 1D).

Tunicamycin significantly increased autophagy markers in a time- and dose-dependent manner (Figure 2); however, N-acetylcysteine decreased autophagy and increased cell viability only at a concentration of 2mM (Figure 3). There was a negative significant correlation between the expression of autophagy markers and cell viability.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

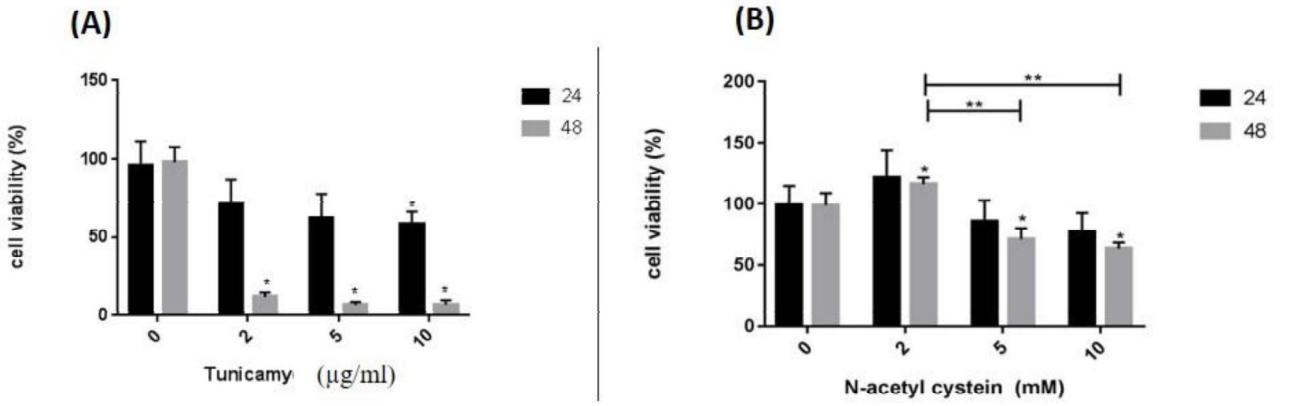


Figure 1: The effect of tunicamycin or N-acetylcysteine on cell viability using the MTT assay

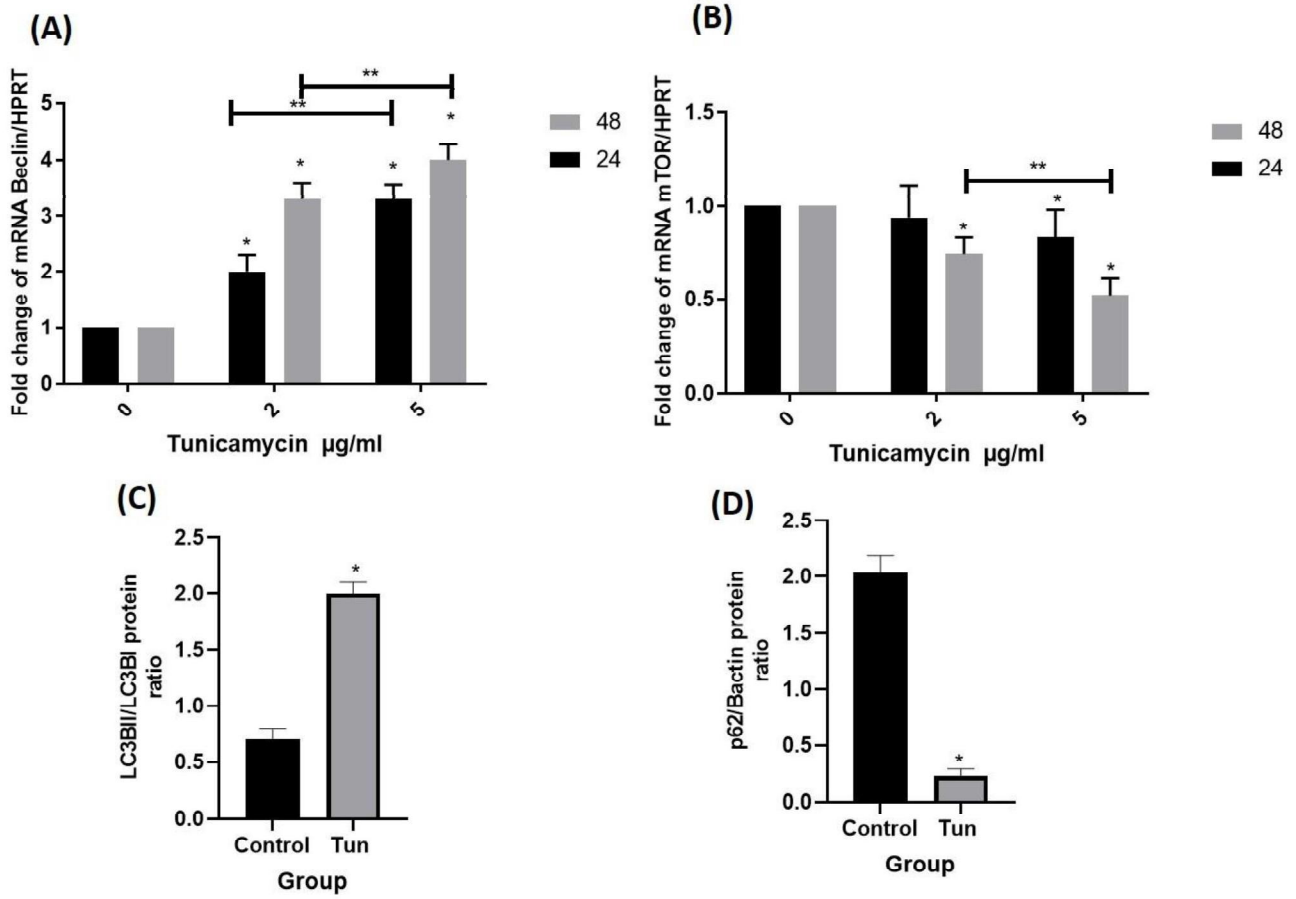


Figure 2: The effect of tunicamycin on autophagy markers in MDA-MB-231 cells

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]

[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

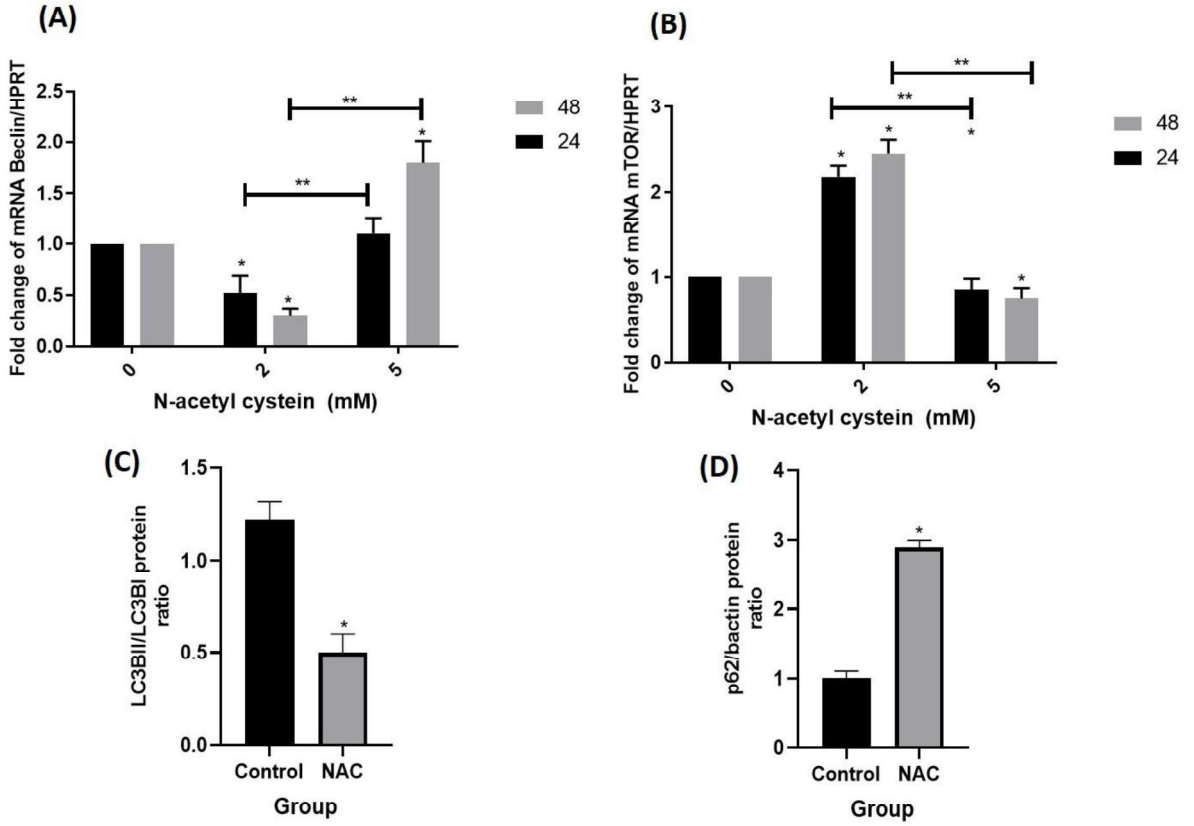


Figure 3: The effect of N-acetylcysteine on autophagy markers in MDA-MB-231 cells

Discussion

Our data showed that tunicamycin had an inhibitory effect on the viability of MDA-MB-231 cells in a time- and dose-dependent manner. Moreover, N-acetylcysteine led to greater proliferation of the cells at low concentration (2mM) over a longer time (48 h). In addition, the expression of autophagy markers was examined in MDA-MB-231 cells in the presence of tunicamycin as an autophagy inducer and N-acetylcysteine as an autophagy inhibitor. Data indicated up-regulation of Becline-1 and downregulation of mTOR in the cells treated with tunicamycin in a time- and dose-dependent manner, which means autophagy was activated in the cells. Moreover, an increase in the LC3-II:LC3-I ratio and a decrease in p62 were shown in MDA-MB-231 cells treated with 2 µg/ml of tunicamycin for 48 h. In this regard, Yu et al. indicated that tunicamycin can promote autophagy and apoptosis and inhibit chemoresistance in lung cancer cell lines [3]. Therefore, tunicamycin led to cell death, upregulation of autophagy-inducing factors, and downregulation of the autophagy inhibitory factor. Evaluation of autophagy markers expression in MDA-MB-231 cells in the presence of N-acetylcysteine (2mM) as an autophagy inhibitor showed downregulation in the Becline-1 gene and upregulation in the mTOR gene in a time-dependent manner. Plus, a decrease in the LC3-II:LC3-I ratio and an increase in p62 were shown in MDA-MB-231 cells treated with 2mM of N-acetylcysteine for 48 h. Mubashshir et al. reported similar results about the effect of N-acetylcysteine on the

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

autophagy pathway in cancer cells. They showed that N-acetylcysteine can inhibit mitochondrial autophagy and results in a decrease in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [4]. These data showed that a low concentration of N-acetylcysteine could result in cell survival and upregulation of autophagy inhibitory factors. Then, N-acetylcysteine would decrease the autophagy process, which is the reason for cell survival.

Conclusion

Tunicamycin leads to activation of the autophagy pathway, which can decrease the viability of breast cancer cell lines (MDA-MB-231), and N-acetylcysteine, at a low concentration, can lead to autophagy inhibition and an increase in cell viability. So, the autophagy pathway can be considered a target in cancer therapy.

Reffrences

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
   doi: 10.3322/caac.21492.
2. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 2009;43:67-93.
   doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
3. Yu XS, Du J, Fan YJ, Liu FJ, Cao LL, Liang N, et al. Activation of endoplasmic reticulum stress promotes autophagy and apoptosis and reverses chemoresistance of human small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Oncotarget. 2016;7(47):76827-39.
   doi: 10.18632/oncotarget.12718.
4. Ali M, Tabassum H, Alam MM, Parvez S. N-acetyl-L-cysteine ameliorates mitochondrial dysfunction in ischemia/reperfusion injury via attenuating Drp-1 mediated mitochondrial autophagy. Life Sci. 2022;293:120338.
   doi: 10.1016/j.lfs.2022.120338.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]

[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

فصلنامه بیماری های پستان ایران
۱۴۰۱؛ ۱۵(٤): ٥١-٦٨

مقاله پژوهشی

اثر تونیکامایسین و N– استیل سیستئین بر بقای سلول‌های سرطان پستان رده‌ی MDA-MB-231 و میزان بیان نشانگرهای مسیر اتوفاژی

مریم عادلی‌پور[۱]، مهشـــید نقاش پور[۲]، زینب افتخار[۳]، اکبر اکبری[۴]، عبدالکریم مؤذنی- رودی[۵]، سحر گلابی[*]

[۱]گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
[۲]گروه تغذیه؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران
[۳] دانشگاه علوم پزشکی قم، قم، ایران
[۴]گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران
[۵]گروه بیوشیمی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی ایرانشهر، ایرانشهر، ایران
[۶]گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۰۲/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۳۰

[*] نویسنده مسئول:
s.golabi@abadanums.ac.ir

چکیده

مقدمه: شیمی درمانی برای درمان سرطان پستان عوارض زیادی بر بافت کبد دارد. هدف تحقیق حاضر بررسی تأثیر تمرین هوازی وکورکومین بر شاخص‌های فشار اکسیداتیو کبد موش‌های سرطانی تحت درمان با دوکسوروبیسین بود.

روش بررسی: تحقیق حاضر از نوع بنیادی و تجربی می‌باشد. ۳۶ موش ماده Balb/c به وزن ۲ ±۲۰ گرم به‌صورت تصادفی به شش گروه سالم، بیمار، بیمار و تیمار (دکسوروبیسین)، بیمار و تیمار و تمرین، بیمار و تیمار و مکمل و بیمار و تیمار و مکمل و تمرین هوازی تقسیم شدند. جهت القای سرطان، رده سلولی T1 ۴ از انستیتو پاستور ایران گرفته شد. دوکسوروبیسین به‌صورت داخل صفاقی روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ تزریق شد و کورکومین به حیوانات خورانده شد. تمرین هوازی شامل ۳۰ دقیقه دویدن با شدت ۶۰-۴۰ درصد بیشینه سرعت، پنج روز در هفته به مدت ۶ هفته بود. تمرینات در هفته اول با سرعت ۱۴ متر در دقیقه و درنهایت به ۱۸متر در دقیقه رسید. برای بررسی اثر متقابل تمرین و مکمل، بر بیان ژن‌های مورد بررسی، از آنالیز واریانس دوطرفه استفاده گردید.

یافته‌ها: اثر متقابل کورکومین و تمرین هوازی بر بیان ژن GSH (P =۰/۰۵۴)، SOD (P =۰/۱۴۵)، CAT (P =۱/۰۰۰) و MDA (P =۰/۰۸۷) ازنظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که احتمالاً تمرین هوازی به همراه کورکومین اثرات محافظتی بر کبد در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از دارو نداشته باشد هر چند که در این زمینه نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

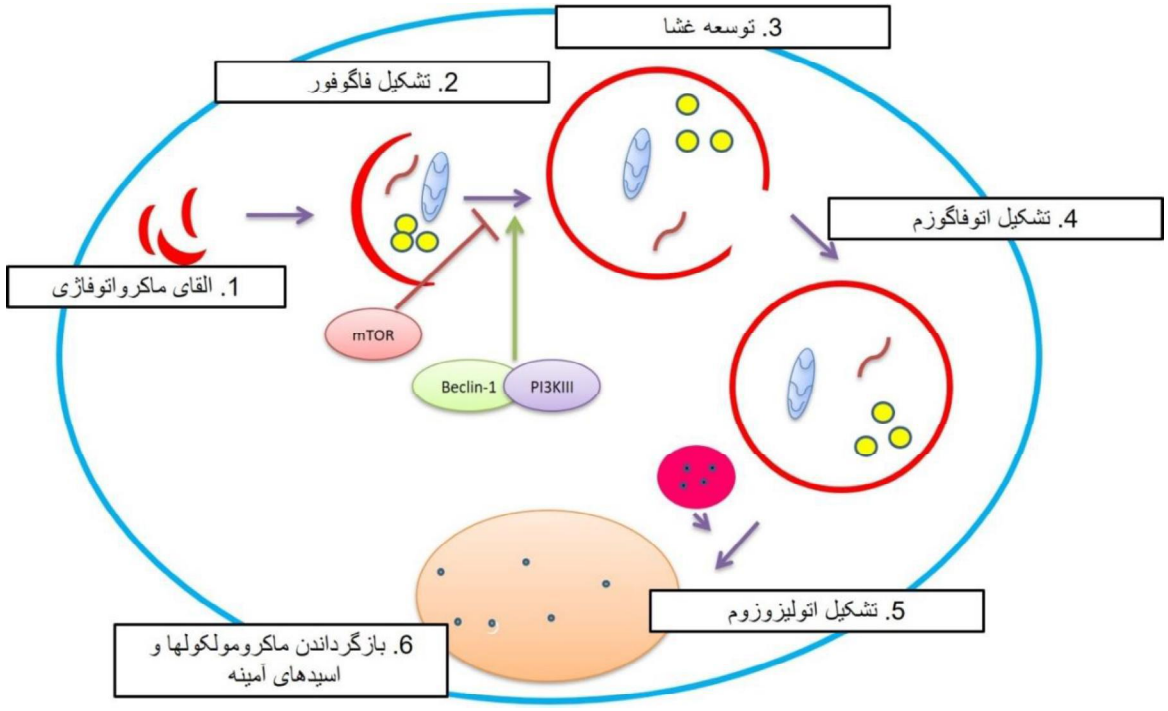
واژه‌های کلیدی: تمرین هوازی، کورکومین، شاخص‌های فشار اکسیداتیو، سرطان پستان، دوکسوروبیسین

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین موضوعات مطالعات در حوزه پزشکی است به دلیل اینکه علت اصلی مرگ قبل از سن ۷۰ سالگی در اکثر کشورها است. شیوع سرطان و مرگ‌ومیر در دهه‌های گذشته افزایش داشته است و این در حالی است که دلایل آن‌ها واضح و روشن نیست (۱). سرطان پستان اولین رتبه‌ی شیوع را در میان زنان داراست و علت اصلی مرگ در اثر سرطان است. سرطان پستان یک بیماری هتروژن با ویژگی‌های بیولوژیک متفاوت است که حداقل به ۱۷ نوع خاص ازنظر بافت‌شناسی طبقه‌بندی می‌شود (۲).

در سال‌های اخیر، دانشمندان علاقه زیادی به تشخیص و هدف درمانی سرطان از طریق ارزیابی مسیرهای ملکولی داخل سلولی نشان داده‌اند. اتوفاژی یک مکانیسم فیزیولوژیک سلول است که در تجزیه اندامک‌ها و پروتئین‌های آسیب‌دیده سلولی نقش دارد و آن‌ها را به واسطه‌های متابولیسم تبدیل می‌کند. در طول این فرآیند چندمرحله‌ای، سیتوزول و اندامک‌ها با وزیکول‌هایی با غشای دولایه (فاگوفور) احاطه می‌شوند که با لیزوزوم ادغام می‌شود (اتولیزوزوم) که در آنجا سرانجام ماکرومولکول‌ها تجزیه شده و عناصر حاصل از آن‌ها دوباره مورد استفاده قرار می‌گیرد (شکل ۱) (۳-۷). نقش اتوفاژی در تومورزائی در سال‌های اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است. اتوفاژی به‌عنوان یک تیغ دولبه بسته به شرایط سلول می‌تواند باعث مرگ سلول شود و یا از آن محافظت کند (۷-۱۰). ملکول‌هایی که در آبشار اتوفاژی نقش دارند می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای اتوفاژی استفاده شوند. برای مثال، Beclin1 که یک ژن سرکوبگر تومور وابسته به اتوفاژی است، یک عنصر مهم اتوفاژی درگیر در تشکیل و شروع اتوفاژی در پستانداران است (۱۱). پروتئین زنجیر سبک وابسته به میکروتوبول۳ (LC3) عنوان یک شاخص مقدار تشکیل اتوفاگوزوم درنظر گرفته می‌شود.



شکل ۱: مسیر اتوفاژی در سلول‌های پستانداران. نمایش نقش mTOR و Becline در مراحل اصلی مسیر اتوفاژی به طور ساده

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

طی اتوفاژی پروتئین LC3 توسط Atg4 تبدیل به LC3I می‌شود که با فساتیدیل اتانول آمین ترکیب می‌شود و به LC3II تبدیل می‌شود، اگرچه وزن ملکولی LC3II بیشتر از LC3I است، در SDS-PAGE به خاطر هیدروفوبیسیتی بالای آن سریع‌تر حرکت می‌کند. پروتئین p62 (که همچنین SQSTM1 یا sequestome1 نامیده می‌شود). طی اتوفاگوزوم به‌طور مستقیم به LC3 متصل می‌شود و در اتولیزوزوم تجزیه می‌شود، بنابراین سطح بیان پروتئین p62 به‌طور معکوس با فعال شدن اتوفاژی ارتباط دارد. مسیر اتوفاژی با چندین تعدیل‌کننده، تنظیم می‌شود. mTOR به‌عنوان یک تنظیم‌کننده مهاری، نقش مهمی در تنظیم مسیر اتوفاژی نقش دارد. بنابراین افزایش بیان Beclin 1 یا کاهش بیان mTOR و کاهش سطح پروتئین p62 می‌تواند بیانگر فعالیت اتوفاژی باشد و برعکس (۱۲-۱۵).

از آنجایی که استرس اکسیداتیو به‌عنوان القاکننده‌ی اولیه‌ی اتوفاژی گزارش شده است، عوامل آنتی‌اکسیدانت مثل N-استیل سیستئین می‌توانند به‌عنوان یک مهارکننده اتوفاژی استفاده شوند (۳، ۱۶-۱۸). همچنین تونیکامایسین، استرس شبکه اندوپلاسمی را فعال می‌کند که یک القاکننده‌ی بالقوه‌ی اتوفاژی است (۱۹، ۲۰). در مطالعه‌ی حاضر، اثر تونیکامایسین (القاکننده‌ی اتوفاژی) و N-استیل سیستئین (مهارکننده‌ی اتوفاژی) روی میزان زنده ماندن سلول‌های سرطان پستان رده‌ی MDA-MB-231 در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت بررسی شد. به‌علاوه، نقش اتوفاژی در زنده ماندن سلول در حضور تونیکامایسین و N-استیل سیستئین با اندازه‌گیری بیان ژن‌های mTOR و Beclin و پروتئین‌های p62 و LC3 به‌عنوان نشانگرهای اتوفاژی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

معرف‌ها و مواد شیمیایی

محیط کشت DMEM[1] RPMI[2]، سرم جنین گاوی (FBS[3])، بافر فسفات از شرکت Gibco آمریکا تهیه شد. آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسن و همچنین تریپسین-EDTA از شرکت Bio-Idea ایران تهیه شد.N - استیل سیستئین و تونیکامایسین از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شدند و در آب مقطر حل شدند تا غلظت‌های ۵۰۰ میلی مولار و ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به ترتیب به دست آید. محلول‌های MTT و DMSO نیز از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شدند. کیت استخراج RNA و کیت سنتز cDNA از شرکت Gene All کره جنوبی خریداری شدند. مستر میکس Real-Time PCR از شرکت امپلیکون دانمارک تهیه شد.

کشت سلول

رده‌ی سلول سرطانی پستان (MDA-MB-231) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. در مطالعه‌ی حاضر سلول‌ها در محیط RPMI غنی‌شده با FBS ۱۰٪ و استرپتومایسین ۱٪ کشت داده شدند. محیط کشت، دو بار در هفته با محیط تازه تعویض شد و سلول‌ها پاساژ داده شدند تا به یکنواختی ۸۰٪ برسند. همه‌ی سلول‌ها در یک هوای مرطوب حاوی ۵٪ دی‌اکسید کربن در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد داده شدند.

بررسی زنده ماندن سلول

زنده ماندن سلول‌ها توسط MTT بررسی شد. به‌طور خلاصه، سلول‌های MDA-MB-231 در پلیت‌های کشت سلول ۱۲ چاهکی در محیط کشت RPMI غنی شده با FBS ۲٪ کشت داده شدند (۳۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک). غلظت‌های مختلف تونیکامایسین (۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (µg/ml)) و همچنین N-استیل سیستئین (۲، ۵ و ۱۰ میلی مولار (mM)) به چاهک‌های مربوطه اضافه شد. آزمایش‌ها در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شدند. برای انجام، محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد و ۲۰ میکرولیتر MTT به‌طور مستقیم به هر چاهک اضافه

[1]Dulbecco's- modified Eagle's Medium
[2]Roswell Park Memorial Institute medium
[3]fetal bovine serum

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51] [2023-01-28]

شد به‌طوری‌که غلظت نهایی آن ۲ میلی‌گرم در دسی لیتر بود. سلول‌ها ۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از آن، محیط حاوی MTT حذف شد، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO برای حل شدن بلورهای فورمازون به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. درنهایت، با استفاده از دستگاه الیزاریدر جذب در ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان زنده ماندن به‌صورت درصد نسبت به سلول‌های کنترل بیان شد. آزمایش‌ها با سه نمونه‌ی سلولی مجزا و به‌صورت سه بار تکرار انجام شدند.

بیان mTOR و Beclin در سلول‌ها

بیان mTOR و Beclin به‌عنوان نشانگرهای اتوفاژی در سلول‌های MDA-MB-231 که در معرض N–استیل سیستئین و تونیکامایسین قرار گرفته بودند، بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت سنجش شد. mRNA اختصاصی ژن‌ها در سلول‌ها با استفاده از Real-Time PCR در دستگاه Light-Cycler شرکت Roche آمریکا اندازه‌گیری شد. برای این منظور، RNA کل از هر چاهک با استفاده از کیت استخراج RNA (کیت Grnr All، کره جنوبی) بر اساس روش کار سازنده کیت استخراج شد. سپس با استفاده از کیت سنتز cDNA (کیت Solis BioDyne، Estonia) و براساس روش کار سازنده‌ی کیت cDNA سنتز شد. پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های mTOR، Beclin و HPRT (به‌عنوان کنترل داخلی) با استفاده از نرم‌افزار CLC طراحی شد که توالی آن‌ها در جدول ۱ نشان داده‌شده است. ابتدا غلظت پرایمرها و دمای اتصال پرایمر بهینه شدند و سپس با غلظت و دمای بهینه واکنش تزاید ژنی در میکروتیوب‌های 0.2 میکرولیتری در دستگاه Real-Time PCR انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر از cDNA رقیق شده، ۵ پیکومول از هر پرایمر، ۵ میکرولیتر مسترمیکس PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر بود. برنامه زمانی PCR برای این آزمایش به‌صورت زیر بود: مرحله ابتدایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله تزاید شامل ۴۰ سیکل و هر سیکل شامل ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتیگراد، و مرحله نهایی ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه. برای رسم منحنی ذوب، از برنامه دمایی ۶۰ تا ۹۰ درجه سانتیگراد و خوانش به ازای هر یک دقیقه استفاده شد. تغییرات ژن‌های Beclin و mTOR در سلول‌ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Delta Ct} = \text{Ct gene} - \text{Ct HPRT}$$

$$\text{Delta Delta Ct} = \Delta\text{Ct treated} - \Delta\text{Ct control}$$

$$\text{RQ} = \text{Relative Quantitation} = 2^{-(\Delta\text{CT treated} - \Delta\text{CT control})}$$

همه واکنش‌های PCR در سه نمونه (n=3) مجزا و به صورت ۳ بار تکرار انجام شدند و تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به ژن HPRT به‌عنوان کنترل گزارش شد.

بیان پروتئین‌های LC3 و p62 در سلول‌ها

بیان پروتئین‌های LC3 و p62 به‌عنوان نشانگرهای اتوفاژی در سلول‌های MDA-MB-231 که در معرض N–استیل سیستئین (۲ میلی مولار) و تونیکامایسین (۲ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرارگرفته بودند، بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از تکنیک وسترن بلات سنجش شد. برای این منظور، با استفاده از بافر RIPA پروتئین‌ها از سلول‌ها استخراج شد. بعد از تعیین غلظت پروتئین، مقدار مشابهی از پروتئین با بافر نمونه رقیق شد و بخشی از نمونه‌ی رقیق شده بر روی ژل‌های SDS-PAGE بارگذاری شد و اجرا شد. هر نمونه در یک چاهک بارگذاری شد. در مرحله بعد، پروتئین‌ها با استفاده از دستگاه miniPROTEAN II (Bio-Rad) به غشا ImmobilonP PVDF membrane (Millipore, Bed ford, MA) منتقل شدند. بعد از اینکه سایت‌های اتصال غیراختصاصی روی غشاء توسط انکوباسیون در بلاکینگ بافر مسدود شدند، آنتی‌بادی اولیه با رقت ۱ در ۳۰۰۰ برعلیه LC3 (ab51520, abcam, USA) و یا رقت ۱ در ۱۰۰۰ از آنتی‌بادی اولیه برعلیه p62 (88588, cell signaling, USA) اضافه شد. سپس، غشاها با استفاده از Tris Buffered Saline with Tween (TBST) سه بار شستشو داده شدند. در مرحله‌ی بعد غشاها با آنتی‌بادی ثانویه انکوبه شدند. سپس غشاها سه بار با بافر TBST شسته شدند. سپس باندهای پروتئینی با

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

استفاده از کیت ECL نمایان شدند. سپس، غشاها با بافر استریپینگ و آنتی‌بادی اولیه بتا-اکتین به‌عنوان یک پروتئین کنترل انکوبه شدند. در پایان باندها با استفاده از نرم‌افزار Image J به مقادیر عدد جهت مقایسه تبدیل شدند.

آنالیز آماری

در این مطالعه، اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز شدند. آزمون آماری Kolmogorov-Smirnov test برای بررسی توزیع داده‌ها استفاده شد. سپس از آزمون آماری One Way ANOVA و به دنبال آن آزمون Tukey's برای مقایسه میزان زنده ماندن سلول‌ها و همچنین بیان ژن‌ها در سلول‌های تیمارشده و تیمار نشده با غلظت‌های مختلف تونیکامایسین و N-استیل سیستئین در زمان‌های مختلف استفاده شد. از آزمون Student's t-test برای مقایسه میزان بیان پروتئین بین سلول‌های تیمار شده و تیمار نشده استفاده شد. آزمون پیرسون برای ارزیابی ارتباط بین زنده ماندن سلول و بیان ژن استفاده شد. سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

تصویب اخلاقی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی آبادان (Grant No. 95U-1165) انجام شده و توسط کمیته‌ی اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی آبادان مورد بررسی قرار گرفته و به تأیید رسیده است (کد اخلاق: ABADANUMS.REC.1395.189).

نتایج

اثر تونیکامایسین بر زنده ماندن سلول‌های رده MDA-MB-231:

اثر تونیکامایسین روی زنده ماندن سلول با استفاده روش MTT تعیین شد. تونیکامایسین زنده ماندن سلول را به‌صورت وابسته به زمان و وابسته به غلظت مهار می‌کند. درحالی که تیمار با ۲ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تونیکامایسین برای ۲۴ ساعت اثر کمی داشت، درمان با ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت و تیمار با غلظت‌های ۲، ۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تونیکامایسین برای ۴۸ ساعت اثر زنده ماندن سلول را به‌طور معناداری کاهش داد (۴۲٪، ۸۹٪، ٪، و ۹۳٪ مهار به ترتیب، $P<0.05$) (شکل ۲-الف).

اثر N-استیل سیستئین بر زنده ماندن رده سلولی MDA-MB-231

بررسی MTT نشان داد که N استیل سیستئین هیچ اثر معناداری روی زنده ماندن رده سلولی MDA-MB-231 در غلظت‌های متفاوت برای ۲۴ ساعت ندارد. درحالی که تیمار با غلظت ۲ میلی مولار N استیل سیستئین برای ۴۸ ساعت زنده ماندن سلول را در مقایسه با کنترل مربوطه افزایش می‌دهد، غلظت ۵ و ۱۰ میلی مولار N استیل سیتئین برای ۴۸ ساعت زنده ماندن سلول را در مقایسه با نمونه کنترل کاهش می‌دهد (۳۰٪ و ۳۶٪ کاهش، $P<0.05$) (شکل ۲-ب).

اثر تونیکامایسین بر روی بیان مارکرهای اتوفاژی MDA-MB-231

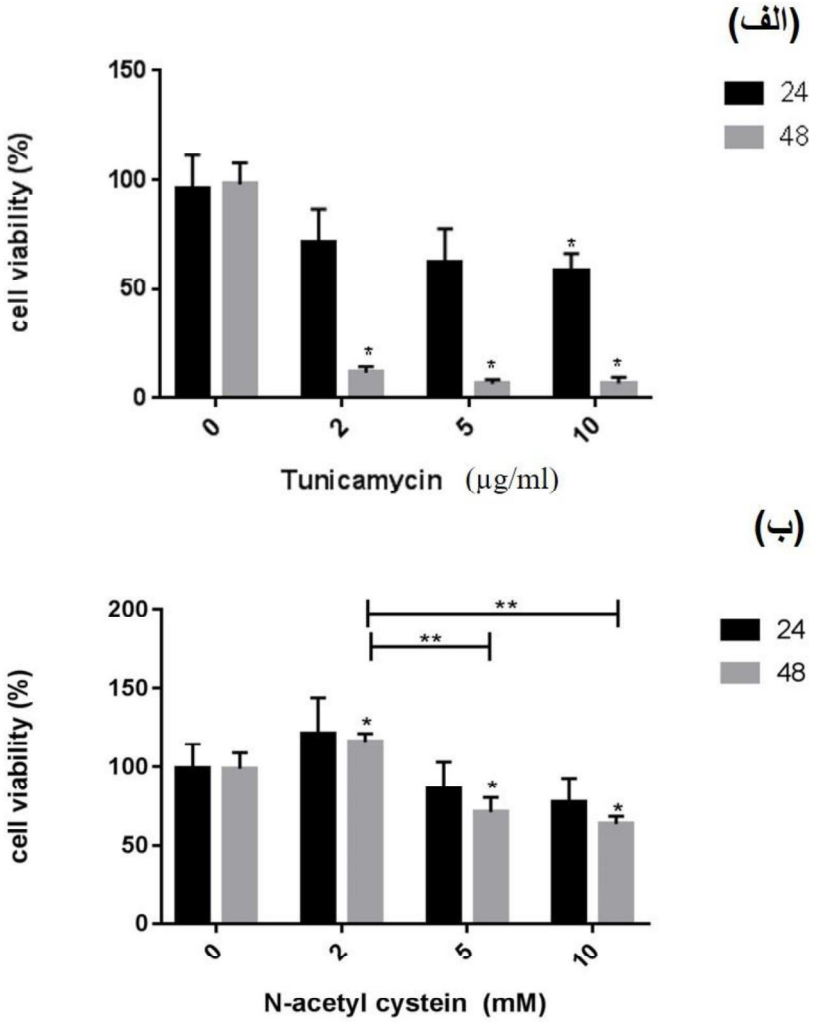
بیان ژن‌های mTOR و Beclin 1 با استفاده از روش Real-time PCR به‌عنوان مارکرهای اتوفاژی اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان دادند که بیان Beclin 1 در سلول‌ها در حضور تونیکامایسین به‌طور معناداری به‌صورت وابسته به زمان و غلظت افزایش می‌یابد. تغییر بیان نسبت Beclin 1/HPRT در رده سلولی MDA-MB-231 تیمار شده با ۲ یا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تونیکامایسین در زمان ۲۴ ساعت، ۲ و ۳,۳ برابر نسبت به نمونه کنترل مربوطه بود ($p<0.05$) (شکل ۳-الف). به‌علاوه، تغییر بیان نسبت Beclin 1/HPRT در رده سلولی MDA-MB-231 تیمار شده با ۲ یا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از تونیکامایسین در زمان ۴۸ ساعت، ۳,۳ و ۴ برابر نسبت به نمونه کنترل مربوطه بود ($P<0.05$) (شکل ۳-الف).

بیان ژن mTOR به‌عنوان یک مارکر مهاری اتوفاژی در سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین به‌صورت وابسته به زمان و غلظت کاهش یافت. بیان ژن mTOR بعد از ۲۴ ساعت در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تونیکامایسین

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

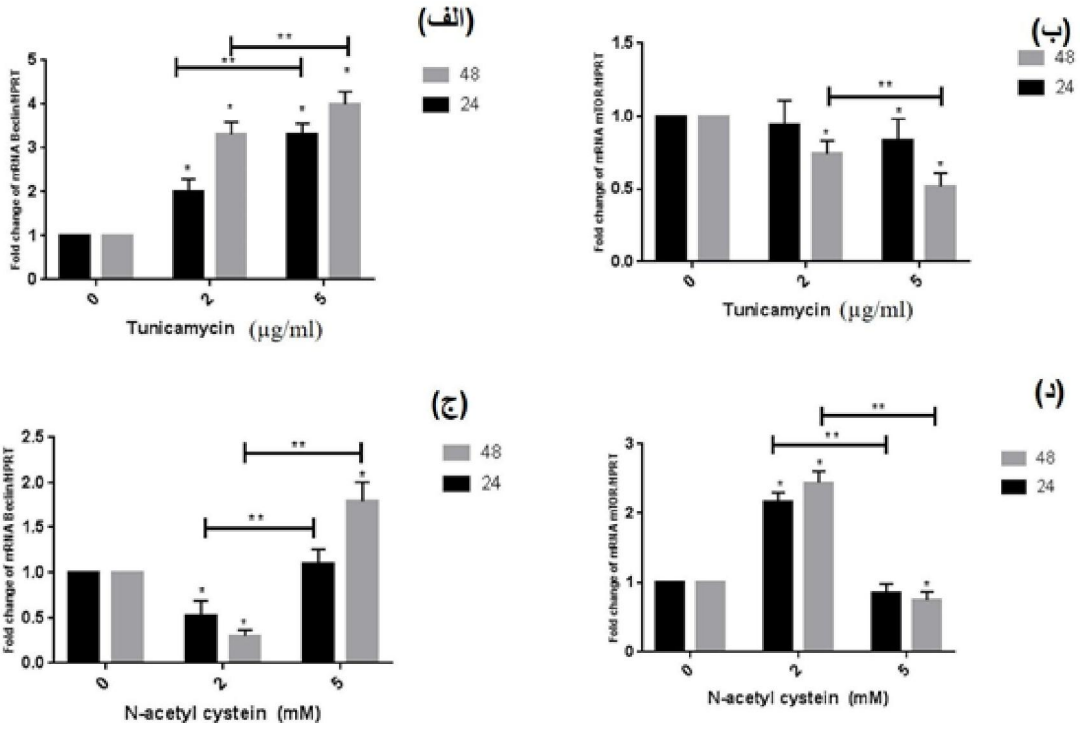
به‌طور معناداری کاهش یافت (۰/۸ برابر، $p<0.05$). به‌علاوه بیان ژن mTOR سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت به‌طور وابسته به غلظت کاهش یافت. تغییر نسبت بیان mTOR/HPRT در رده سلولی MD-MB-231 تیمار شده با ۲ یا ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت،۰/۷ و ۰/۵ برابر نسبت به کنترل مربوطه بود ($P<0.05$) (شکل ۳-ب). نسبت پروتئین LC3II/LC3I در سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌های تیمار نشده تقریباً ۲ برابر شد ($P<0.05$) (شکل ۴-الف). همچنین میزان بیان پروتئین p62 نسبت به β-actin در سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین با غلظت ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر به مدت ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌های تیمار نشده تقریباً ۷۵ درصد کاهش داشت (شکل ۵- الف).



شکل ۲: اثر تونیکامایسین یا N-استیل سیستئین روی بقای سلول با استفاده از روش MTT.

الف- اثر تونیکامایسین روی بقای سلول در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده. **ب-** اثر N-استیل سیستئین روی بقای سلول در غظت‌ها و زمان‌های مختلف در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده. بقای سلول در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف با استفاده از روش MTT تعیین شد. نتایج به‌دست‌آمده از سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین و N-استیل سیستئین با سلول‌های تیمار نشده مقایسه شدند. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه نمونه به‌صورت سه بار تکرار گزارش شدند. علامت * نشان‌دهنده‌ی $P<0.05$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار در مقایسه با کنترل در نظر گرفته شد. علامت ** نشان‌دهنده‌ی $P<0.01$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف در نظر گرفته شد.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]



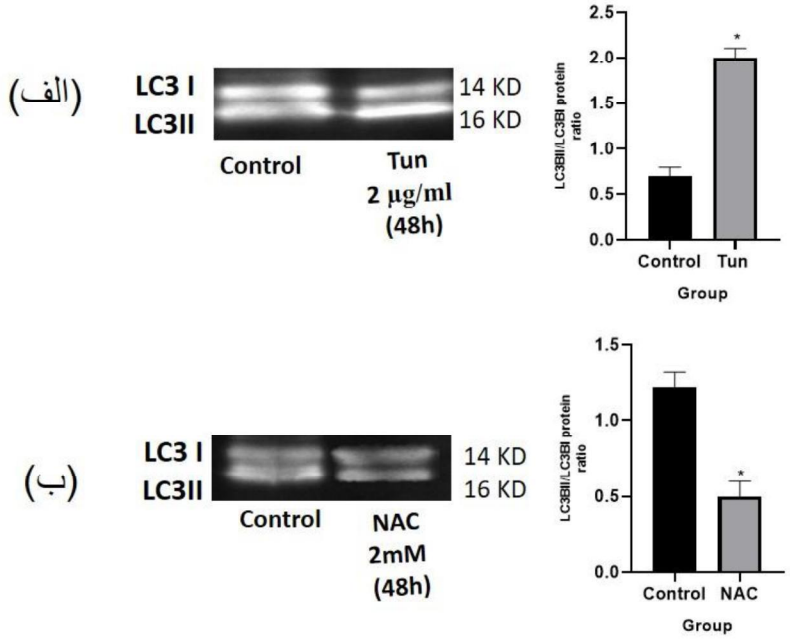
شکل ۳: بیان مارکرهای اتوفاژی در سطح mRNA در رده سلولی MDA-MB-231 در حضور غلظت‌های مختلف تونیکامایسین و N-استیل سیستئین.

الف- بیان ژن Beclin 1 در سلول‌ها در حضور تونیکامایسین، **ب-** بیان ژن mTOR در سلول‌ها در حضور تونیکامایسین، **ج-** بیان ژن Beclin 1 در سلول‌ها در حضور N-استیل سیستئین، **د-** بیان ژن mTOR در سلول‌ها در حضور N-استیل سیستئین. بیان ژن‌ها در سطح mRNA در غلظت‌ها و زمان‌های متفاوت با استفاده از Q-PCR تعیین شد. بیان ژن HPRT به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتایج به‌دست‌آمده از سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین و یا N-استیل سیستئین با سلول‌های تیمار نشده مقایسه شدند. بر اساس این نتایج N- استیل سیستئین در غلظت ۲ میلی‌مولار منجر به کاهش بیان Beclin 1 و افزایش بیان mTOR می‌شود درحالی‌که غلظت ۵ میلی‌مولار N-استیل سیستئین منجر به افزایش بیان Beclin 1 و کاهش بیان mTOR می‌گردد. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه نمونه با سه بار تکرار گزارش شدند. علامت * نشان‌دهنده‌ی $P<0.05$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار در مقایسه با کنترل درنظر گرفته شد. علامت ** نشان‌دهنده‌ی $P<0.01$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار بین گروه‌های مختلف در نظر گرفته شد.

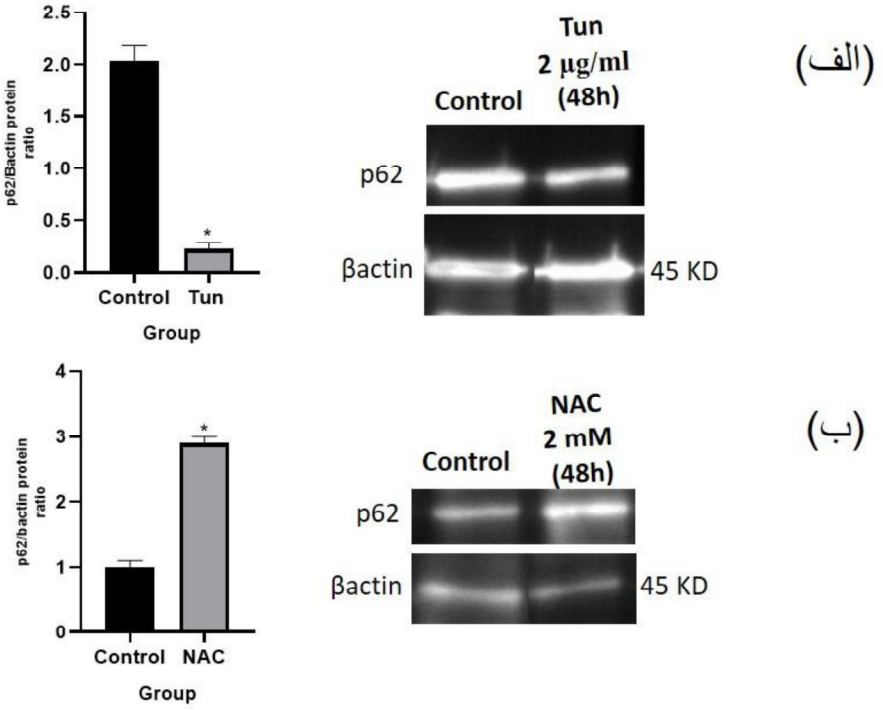
اثر N-استیل سیستئین روی بیان مارکرهای اتوفاژی MDA-MB-231

سلول‌هایی که با غلظت ۲ میلی مولار N-استیل سیستئین تیمار شدند، به صورت وابسته به زمان کاهش بیان Beclin 1 را نشان دادند. نسبت بیان Beclin 1/HPRT در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت ۲ میلی مولار N-استیل سیستئین به ترتیب ۰/۵ و ۰/۳ بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت در مقایسه با کنترل بود. اگرچه غلظت ۵ میلی مولار از N-استیل سیستئین به تغییر بیان ژن Beclin 1 بعد از ۲۴ ساعت منجر نشد، میزان بیان Beclin 1 بعد از ۴۸ ساعت به‌طور مشخصی افزایش داشت (۱/۸ برابر $P<0.05$) (شکل ۳-ج). به‌علاوه، غلظت ۲ میلی‌مولار N-استیل سیستئین به افزایش بیان mTOR منجر شد، گرچه mTOR در حضور غلظت ۵ میلی مولار N-استیل سیستئین کاهش بیان داشت. تغییر بیان mTOR/HPRT در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با غلظت‌های ۲ یا ۵ میلی مولار از N-استیل سیستئین برای ۲۴ ساعت، ۲/۱ و ۲/۵ است ($P<0.05$) و بعد از ۴۸ ساعت، ۰/۸۵ (غیر معنادار) و ۰/۷۵ ($P<0.05$) مقدار اندازه‌گیری شده در کنترل مربوطه بود (شکل ۳-د).

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]



شکل ۴: بیان LC3 به‌عنوان مارکر اتوفاژی در رده سلولی MDA-MB-231 در حضور تونیکامایسین و N–استیل سیتئین.
الف- نسبت LC3II/LC3I در حضور تونیکامایسین افزایش و ب- در حضور N–استیل سیستئین کاهش یافته است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه نمونه با سه بار تکرار گزارش شدند. علامت * نشان‌دهنده‌ی $P<0.05$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار در مقایسه با کنترل درنظر گرفته شد.



شکل ۵: بیان p62 به‌عنوان مارکر اتوفاژی در رده سلولی MDA-MB-231 در حضور تونیکامایسین و N–استیل سیتئین.
الف- میزان پروتئین p62 نسبت به بتا اکتین در حضور تونیکامایسین کاهش و ب- در حضور N–استیل سیستئین افزایش یافته است. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار از سه نمونه با سه بار تکرار گزارش شدند. علامت * نشان‌دهنده‌ی $P<0.05$ است که به‌عنوان اختلاف معنادار در مقایسه با کنترل درنظر گرفته شد

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]

نسبت پروتئین LC3II/LC3I در سلول‌های تیمار شده با N-استیل سیستئین با غلظت 2 میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌های تیمار نشده تقریباً ۵۰ درصد کاهش داشت ($P<0.05$) (شکل ۴-ب). همچنین میزان بیان پروتئین p62 نسبت به β-actin در سلول‌های تیمار شده با N-استیل سیستئین با غلظت 2 میلی مولار به مدت ۴۸ ساعت نسبت به سلول‌های تیمار نشده تقریباً ۳ برابر افزایش داشت (شکل ۵- ب).

ارتباط بین زنده ماندن سلول و بیان ژن‌های مربوط به اتوفاژی

بر اساس تست پیرسون، ارتباطی منفی بین بیان Beclin 1 و زنده ماندن سلول در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف تونیکامایسین در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت وجود داشت ($r=-0.6$, $P<0.05$). همچنین ارتباط بین بیان mTOR و زنده ماندن سلول در سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین معنادار و مثبت بود ($r=0.34$, $P<0.05$). در سلول‌های تیمار شده با N-استیل سیستئین ارتباطی مثبت و معنادار بین بیان mTOR و زنده ماندن سلول دیده شد ($r=0.27$, $P<0.05$). گرچه در این سلول‌ها ارتباط بین بیان Beclin 1 و زنده ماندن سلول‌ها معنادار نبود.

بحث

اتوفاژی، مکانیسم تجزیه‌ی اجزای سیتوپلاسم در لیزوزوم، یک فرآیند در سلول‌های توموری است که بسته به شرایط خاص سلول به بقا و یا مرگ سلول منجر می‌شود (۸). در این مطالعه، اثر تونیکامایسین به‌عنوان یک القاکننده‌ی اتوفاژی و N-استیل سیستئین به‌عنوان مهارکننده‌ی اتوفاژی بر روی رده سلولی MDA-MB-231 بررسی شد. نتایج ما نشان داد که تونیکامایسین دارای اثر مهاری وابسته به زمان و غلظت روی بقای سلول‌های MDA-MB-231 است. در این راستا Hou و همکاران نشان دادند که تونیکامایسن می‌تواند باعث مهار تکثیر رده‌های سلولی کارسینوم کبد شود. یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که تیمار رده‌های سلولی کارسینوم کبد با غلظت‌های مختلف تونیکامایسین به مدت ۴۸ ساعت منجر به مهار تکثیر سلولی به‌صورت وابسته به غلظت می‌شود (۲۱).

همچنین بر اساس نتایج این مطالعه، N-استیل سیستئین باعث تکثیر بیشتر سلول‌ها در غلظت کم (۲ میلی مولار) در زمان بیشتر (۴۸ ساعت) می‌شود، در حالی که غلظت بالاتر N-استیل سیستئین منجر به تکثیر کمتر می‌شود که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی اثر سمی N-استیل سیستئین در غلظت‌های بالاتر (5 و 10 میلی‌مولار) باشد. بررسی میزان سمیت سلولی N-استیل سیستئین بر روی رده سلولی نوروبلاستومای انسان توسط JURKOWSKA و همکارانشان در لهستان نشان داد که غلظت ۵ میلی مولار N-استیل سیستئین منجر به سمیت حدود ۳۱ درصد در این رده سلولی می‌شود (۲۲).

به‌علاوه، بیان مارکرهای اتوفاژی در سلول‌های MDA-MB-231 در حضور تونیکامایسین به‌عنوان القاکننده‌ی اتوفاژی و N-استیل سیستئین به‌عنوان مهارکننده‌ی اتوفاژی بررسی شد. نتایج نشان داد که تونیکامایسین منجر به افزایش بیان Beclin 1 در سلول‌های تیمار شده به‌صورت وابسته به زمان و غلظت می‌شود که نشان‌دهنده‌ی فعال شدن اتوفاژی در سلول‌ها است. در حالی که mTOR، به‌عنوان شاخص مهاری اتوفاژی، به‌صورت وابسته به زمان و غلظت کاهش بیان داشت. همچنین سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در حضور ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از تونیکامایسین پس از ۴۸ ساعت افزایش تبدیل LC3-1 به LC3II و همچنین کاهش غلظت p62 را نشان دادند. در مجموع، تونیکامایسین منجر به مرگ سلول و افزایش بیان مارکرهای فعال‌کننده‌ی اتوفاژی و کاهش بیان مارکر مهاری اتوفاژی و مصرف p62 در این فرایند، می‌شود. بنابراین تونیکامایسین، مسیر اتوفاژی را فعال می‌کند که می‌تواند منجر به مرگ سلول شود که با روش MTT ارزیابی شد. در این راستا، Yu و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که فعال شدن استرس شبکه اندوپلاسمی باعث تحریک اتوفاژی و آپپتوز در سلول‌های سرطان سلول کوچک ریه می‌شود. آنها

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

نشان دادند که تونیکامایسین در غلظت‌های ۱ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث کاهش زنده ماندن سلول‌های سرطان سلول کوچک ریه می‌شوند. در این مطالعه فعال شدن مسیر اتوفاژی در غلظت‌های۱ تا ۸ میکروگرم در میلی‌لیتر با استفاده از مارکرهای LC3، Beclin 1 و p62 نشان داده شد (۲۳).

ارزیابی بیان مارکرهای اتوفاژی در سلول‌های MDA-MB-231 در حضور N-استیل سیستئین به‌عنوان یک مهارکننده‌ی اتوفاژی کاهش بیان Beclin 1 و افزایش بیان mTOR را در غلظت پایین (۲ میلی مولار) به‌صورت وابسته به زمان نشان داد. به‌علاوه، بیان Beclin 1 در حضور غلظت بالاتر N-استیل سیستئین (۵ میلی مولار) افزایش یافت و بیان mTOR کاهش یافت. بنابراین نتایج N-استیل سیستئین در غلظت کم (۲ میلی مولار) باعث مهار اتوفاژی می‌شود در حالی که در غلظت بالاتر (۵ میلی مولار) به افزایش مسیر اتوفاژی می‌انجامد که می‌تواند به علت اثرات سمی N-استیل سیستئین در غلظت‌های بالا باشد. همچنین سلول‌های سرطانی رده MDA-MB-231 در حضور غلظت ۲ میلی‌مولار N-استیل سیستئین در مدت زمان ۴۸ ساعت کاهش تبدیل LC3-1 به LC3II و همچنین افزایش غلظت p62 را نشان دادند. بنابراین، این اطلاعات نشان دادند که N-استیل سیستئین در غلظت پایین منجر به زنده ماندن سلول همراه با افزایش بیان مارکر مهاری اتوفاژی (mTOR) و کاهش بیان مارکرهای فعال‌کننده‌ی اتوفاژی (Beclin 1, LC3II) و عدم مصرف p62 می‌شود. پس، N-استیل سیستئین، فرآیند اتوفاژی را کاهش می‌دهد که دلیل زنده ماندن سلول است.

بعضی مطالعات اثرات مهاری N-استیل سیستئین را بر مسیر اتوفاژی نشان داده‌اند. برای مثال بر اساس مطالعه Mubashshir و همکاران، N-استیل سیستئین می‌تواند با از طریق کاهش اتوفاژی میتوکندری منجر به بهبود آسیب ایسکمیک-رپرفیوژن در موش بزرگ آزمایشگاهی شود. مهار اتوفاژی تحت‌تأثیر N-استیل سیستئین با کاهش بیان پروتئین‌های Beclin 1 و LC3II و افزایش p62 نشان داده شد (۲۴). همچنین، اثر N-استیل سیستئین بر روی مسیر اتوفاژی توسط Li و همکاران در یک مدل رت (Rat) تغییر ساختار قلبی بررسی شد. آن‌ها نشان داده شد که اتوفاژی در تغییر ساختار بطن چپ القا شده با فشار بالا نقش دارد به‌طوری‌که بیان نشانگرهای وابسته به اتوفاژی در این مدل افزایش داشت و آنتی‌اکسیدانت N-استیل سیستئین با مهار مسیر اتوفاژی از این تغییر ساختار جلوگیری می‌کنند (۵). به‌علاوه، Guha و همکاران نشان داند که تونیکامایسین به القای استرس شبکه آندوپلاسمی منجر می‌شود که مرگ سلول سرطان پروستات را با فعال کردن mTORC1 از طریق مسیر eNOS-RagC فعال می‌کند. به‌علاوه Guo و همکاران نشان دادند که کمپلکس مس دو ظرفیتی لیگاند اتیل-۲ [بیس (۲-پیریدیل متیل) آمینو] پروپیونات می‌تواند به مرگ سلول سرطانی از طریق اتوفاژی وابسته به ROS منجر شود و N-استیل سیستئین به‌عنوان جاروبگر ROS می‌تواند مسیر اتوفاژی را مسدود کرده و اثر این دارو روی سلول‌های سرطانی را معکوس کند (۲۵). همچنین، در مطالعه‌ای Underwood و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که عوامل آنتی‌اکسیدانت مثل N-استیل سیستئین می‌توانند اتوفاژی را مهار کنند که منجر به افزایش سطوح پروتئین‌های تجمع یافته مرتبط با بیماری‌های نورودژنرتیو می‌شود (۱۸). در این مطالعه مهار اتوفاژی با افزایش بقای سلول‌ها مرتبط بود که با مطالعه ما ناهمسو بود که می‌تواند به علت تفاوت در نوع مدل بیماری مورد مطالعه باشد. در تفسیر این تفاوت‌ها می‌توان گفت که در صورتی که سطح پایه اتوفاژی دچار اختلال شود، منجر به عدم هموستاز سلول می‌شود که می‌تواند باعث مرگ سلول و یا تکثیر بیش از حد سلول شود. بنابراین تنظیم مسیر اتوفاژی به عنوان یک هدف برای درمان سلول‌های دچار اختلال باید با توجه به تغییر اولیه در سطح پایه اتوفاژی انجام شود به‌گونه‌ای که درصورتی‌که افزایش بیش‌ازحد پایه مسیر اتوفاژی باعث اختلال شده، مهار این مسیر می‌تواند به بهبودی شرایط سلول کمک کند و برعکس. به‌علاوه در تنظیم مسیر اتوفاژی برای اهداف

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

درمانی علت بودن و یا معلول بودن تغییر این مسیر هم باید در نظر گرفته شود. این بدین معنی است که درصورتی‌که تغییر در مسیر اتوفاژی علت ایجاد اختلال می‌باشد، تنظیم این مسیر می‌تواند در دسته اهداف درمانی قرار گیرد اما درصورتی‌که تغییر در مسیر اتوفاژی معلول اختلال و در جهت بهبود شرایط موجود توسط سلول صورت گرفته، تنظیم این مسیر به سمت سطح پایه به بدتر شدن شرایط می‌انجامد.

همچنین، این مطالعه ارتباط منفی بین مارکرهای فعال کننده اتوفاژی و زنده ماندن سلول و همچنین ارتباط مثبت بین مارکر مهاری اتوفاژی و زنده ماندن سلول را نشان داد. به‌طوری‌که صرف‌نظر از تیمار سلول‌های سرطانی با تونیکامایسین و N-استیل سیستئین، با فزایش بیان mTOR که مارکر مهاری اتوفاژی هست، میزان زنده مانده سلول‌ها افزایش پیدا می‌کند و برعکس. ارتباط بین بیان Beclin 1 و میزان زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با تونیکامایسین منفی بود که به این معنا است که با افزایش بیان Beclin 1 که یک مارکر درگیر در مسیر اتوفاژی است، زنده ماندن سلول‌ها کاهش می‌یابد و برعکس. با اینحال بین بیان ژن Beclin 1 و زنده مانده سلول‌های تیمار شده با N- استیل سیستئین ارتباط معناداری دیده نشد که می‌تواند به علت تأثیر متفاوت غلظت‌های مختلف N-استیل سیستئین بر فعال شدن و یا مهار اتوفاژی باشد. بنابراین، این یافته‌ها برای درک بهتر نقش اتوفاژی در زنده ماندن سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MB-131 که جز رده سرطان پستان تریپل نگاتیو هست، می‌تواند مفید باشد. از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به استفاده از فقط یک رده سلولی سرطان و عدم استفاده از رده‌های سلولی غیرسرطانی اشاره کرد. بااین‌حال مطالعات پایه برای تعیین تأثیر داروها بر روی مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی در انواع متفاوت سلول‌ها می‌تواند به انتخاب صحیح آن‌ها در درمان بیماری‌ها کمک کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به بیان مارکرهای مربوط به مسیر اتوفاژی ازجمله LC3، mTOR، Beclin و p62 تونیکامایسین می‌تواند فرآیند اتوفاژی را به‌صورت وابسته به غلظت و زمان تقویت کند و به افزایش مرگ سلول در رده سلولی سرطان پستان MDA-MB-231 منجر شود. درحالی‌که N-استیل سیستئین فقط در غلظت پائین اتوفاژی را کاهش داده و به بقای سلول‌های MDA-MB-231 منجر می‌شود. بنابراین، اتوفاژی مکانیسمی است که می‌تواند به عنوان یک مسیر مرگ سلول منجر به کاهش بقای سلول در رده سلولی سرطان پستان در محیط کشت سلولی گردد و به‌عنوان یک هدف در درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد. با اینحال مطالعات بیشتر در آزمایشگاه و مدل‌های حیوانی برای تائید نقش اتوفاژی در رشد و بقای سلول موردنیاز است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان، از همه‌ی همکاران و سرپرستان دانشگاه علوم پزشکی آبادان به دلیل مشارکت در این مطالعه، نهایت قدردانی خود را ابراز می‌دارند. تأمین مالی این مطالعه توسط دانشگاه علوم پزشکی آبادان انجام شد (Grant No.95U-1165)

تضاد منافع

تضاد منافعی وجود ندارد.

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018; 68(6):394-424.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

doi: 10.3322/caac.21492.

2. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? Nat Rev Clin Oncol. 2009; 6(12):718-30.
doi: 10.1038/nrclinonc.2009.166.
3. Guo WJ, Ye SS, Cao N, Huang J, Gao J, Chen QY. ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. Exp Toxicol Pathol. 2010; 62(5):577-82.
doi: 10.1016/j.etp.2009.08.001.
4. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet. 2009; 43:67-93.
doi: 10.1146/annurev-genet-102808-114910.
5. Li B, Sun Y, Wang JP, Chi RF, Wang K, Yang ZJ, et al., Antioxidant N-acetylcysteine inhibits maladaptive myocyte autophagy in pressure overload induced cardiac remodeling in rats. Eur J Pharmacol. 2018; 839:47-56. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.08.034.
6. Qin W, Li C, Zheng W, Guo Q, Zhang Y, Kang M, et al.,. Inhibition of autophagy promotes metastasis and glycolysis by inducing ROS in gastric cancer cells. Oncotarget. 2015;6(37):39839-54.
doi: 10.18632/oncotarget.5674.
7. Wei P, Zhang L, Lu Y, Man N, Wen L. C60(Nd) nanoparticles enhance chemotherapeutic susceptibility of cancer cells by modulation of autophagy. Nanotechnology. 2010; 21(49):495101.
doi: 10.1088/0957-4484/21/49/495101.
8. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al., Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J. 2015; 34(7): 856-80.
doi: 10.15252/embj.201490784.
9. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. Nat Rev Cancer. 2017;17(9):528-42.
doi: 10.1038/nrc.2017.53.
10. Rebecca VW, Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. Oncogene. 2016; 35(1):1-11.
doi: 10.1038/onc.2015.99.
11. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. Nature. 2008; 451(7182): 1069-75.
doi: 10.1038/nature06639.
12. Easton JB, Houghton PJ. mTOR and cancer therapy. Oncogene. 2006; 25(48):6436-46.
doi: 10.1038/sj.onc.1209886.
13. Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 2010;584(7):1287-95.
doi: 10.1016/j.febslet.2010.01.017.
14. Yang Yp, Liang Zq, Gu Zl, Qin zh. Molecular mechanism and regulation of autophagy. Acta Pharmacol Sin. 2005; 26: 1421-34.
doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00235.x
15. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. Cell. 2010; 140(3):313-26.
doi: 10.1016/j.cell.2010.01.028.
16. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. Cell Death Differ. 2015;22(3):377-88.
doi: 10.1038/cdd.2014.150.
17. Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. Biochem J. 2012; 441(2): 523-40.
doi: 10.1042/BJ20111451.
18. Underwood BR, Imarisio S, Fleming A, Rose C, Krishna G, Heard P, et al., Antioxidants can inhibit basal autophagy and enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease. Hum Mol Genet. 2010; 19(17): 3413-29. doi: 10.1093/hmg/ddq253.
19. Tasdemir E, Maiuri MC, Tajeddine N, Vitale I, Criollo A, Vicencio JM, et al., Cell cycle-dependent induction of autophagy, mitophagy and reticulophagy. Cell Cycle. 2007; 6(18): 2263-7.
doi: 10.4161/cc.6.18.4681.
20. Wu J, Chen S, Liu H, Zhang Z, Ni Z, Chen J, et al., Tunicamycin specifically aggravates ER stress and overcomes chemoresistance in multidrug-resistant gastric cancer cells by inhibiting N-glycosylation. J Exp Clin Cancer Res. 2018; 37(1):272.
doi: 10.1186/s13046-018-0935-8.
21. Hou H, Ge C, Sun H, Li H, Li J, Tian H. Tunicamycin inhibits cell proliferation and migration in hepatocellular carcinoma through suppression of CD44s and the ERK1/2 pathway. Cancer Sci. 2018;109(4):1088-1100. doi: 10.1111/cas.13518.
22. Jurkowska H, Wróbel M. Inhibition of Human Neuroblastoma Cell Proliferation by N-acetyl-L-cysteine as a Result of Increased Sulfane Sulfur Level. Anticancer Res. 2018; 38(9): 5109-5113.
doi: 10.21873/anticanres.12831.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]
[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]
[DOI: 10.30699/ijbd.15.4.51]

23. Yu XS, Du J, Fan YJ, Liu FJ, Cao LL, Liang N, et al., Activation of endoplasmic reticulum stress promotes autophagy and apoptosis and reverses chemoresistance of human small cell lung cancer cells by inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Oncotarget. 2016; 7(47):76827-39.
doi: 10.18632/oncotarget.12718.

24. Ali M, Tabassum H, Alam MM, Parvez S. N-acetyl-L-cysteine ameliorates mitochondrial dysfunction in ischemia/reperfusion injury via attenuating Drp-1 mediated mitochondrial autophagy. Life Sci. 2022; 293:120338.
doi: 10.1016/j.lfs.2022.120338.

25. Guha P, Kaptan E, Gade P, Kalvakolanu DV, Ahmed H. Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1. Oncotarget. 2017; 8(40):68191-207.
doi: 10.18632/oncotarget.19277.

[Downloaded from ijbd.ir on 2026-11-23]

[DOR: 20.1001.1.17359406.1401.15.4.4.4]
[Downloaded from ijbd.ir on 2023-01-28]