

## Effect of Six Weeks of Interval Exercise Training along with Selenium Nanoparticle Ingestion on *Bcl-2* and *LC3* Genes expression in the Tumor Tissue of Breast Tumor-Bearing Mice

Agha-Alinejad H<sup>1\*</sup>, Hashemi Jokar E<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Education, Faculty of Humanities, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> PhD Student of Exercise Physiology, Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education & Sport Sciences, Islamic Azad University Central Tehran Branch, Tehran, Iran

Receive: 2018/12/23  
Accepted: 2019/05/02

\*Corresponding Author:  
Hamid Agha-Alinejad  
halinejad@modares.ac.ir

Ethics Approval:  
IR.SSRI.REC.1395.129

### Abstract

**Introduction:** Some factors such as exercise training and pharmacological interventions can slow tumor growth. To determine the underlying mechanisms, we investigated the effect of six weeks of interval exercise training along with selenium nanoparticle ingestion on *Bcl-2* and *LC3* genes expression in the tumor tissue of breast tumor-bearing mice.

**Methods:** Twelve female BALB/c mice were injected with cancer cell line and assigned to four groups: control (CT), training (TT), selenium nanoparticles (ST), and training + selenium nanoparticles (SeTT). Interval training program was conducted for 6 weeks, 5 sessions per week. The mice in the ST and SeTT groups received selenium nanoparticles for six weeks. Two days after the last session of intervention (exercise or selenium nanoparticles), the mice were anesthetized and tumor tissues were removed. Expression of *Bcl-2* and *LC3* genes was determined with real-time PCR technique. A one-way analysis of variance, followed by the Tukey post hoc test, was used to compare gene expression among the groups.

**Results:** Results indicated a significant decrease in tumor volume in the SeTT group ( $p < 0.001$ ) and an increase in *LC3* expression in the TT ( $p = 0.006$ ) and SeTT ( $p = 0.04$ ) groups. Moreover, a significant decrease in *Bcl-2* expression was observed in the ST group ( $p = 0.01$ ).

**Conclusion:** Ingestion of selenium nanoparticles in combination with interval training may exert a synergistic inhibitory effect on tumor growth, with this effect being mediated in part through the changes in *Bcl-2* and *LC3* genes expression in the tumor tissue.

**Keywords:** Tumor Tissue, Interval Training, Apoptosis

## تأثیر شش هفته تمرین ورزشی تناوبی همراه با مصرف نانوذره سلنیوم بر بیان ژن Bcl-2 و LC3 در بافت تومور موش‌های ماده حامل تومور پستان

حمید آقا علی‌نژاد<sup>۱</sup>، سیده الهام هاشمی جوکار<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه تربیت بدنی، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت بدنی و ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

### چکیده

تاریخ ارسال: ۹۷/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۲

نشانی نویسنده مسئول:

حمید آقا علی‌نژاد

halinejad@modares.ac.ir

**مقدمه:** برخی عوامل مانند تمرینات ورزشی و مداخلات دارویی می‌توانند روند رشد تومور را تحت تأثیر قرار دهند. به‌منظور مشخص شدن سازوکار دقیق این تأثیرگذاری، در پژوهش حاضر تأثیر شش هفته تمرین ورزشی تناوبی همراه با مصرف نانوذره سلنیوم بر بیان ژن Bcl-2 و LC3 در بافت تومور موش‌های ماده حامل تومور پستان مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش بررسی:** ۱۲ سر موش ماده balb/c پس از تزریق سلول‌های سرطانی در چهار گروه تقسیم شدند: کنترل (CT)، تمرین (TT)، نانو ذرات سلنیوم (ST)، تمرین + نانو ذرات سلنیوم (SeTT). برنامه تمرین تناوبی به مدت شش هفته و پنج روز در هفته اجرا شد. علاوه بر این، موش‌ها در گروه ST و SeTT به مدت شش هفته و سه روز در هفته نانوذرات سلنیوم را دریافت کردند. با گذشت دو روز از آخرین مداخله (تمرین یا نانوذره)، موش‌ها بیهوش شدند و بافت تومور جدا شد. بیان ژن‌های Bcl-2 و LC3 با تکنیک Real-time PCR بررسی گردید. در نهایت یافته‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شد.

**یافته‌ها:** نتایج کاهش معنادار حجم تومور در گروه SeTT ( $p < 0.001$ ) و افزایش بیان LC3 در گروه‌های TT ( $p = 0.006$ ) و SeTT ( $p = 0.04$ ) را نشان داد. همچنین، کاهش معنادار بیان Bcl-2 در گروه ST ( $p = 0.001$ ) مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** مصرف نانو ذرات سلنیوم به همراه تمرین تناوبی می‌تواند تأثیر سینرژیک در مقابله با رشد تومور داشته باشد که این تأثیرات احتمالاً تا حدودی ناشی از تغییرات در بیان ژن‌های Bcl-2 و LC3 در بافت تومور باشد.

**واژه‌های کلیدی:** بافت تومور، تمرین تناوبی، آپوپتوز

## مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است و در سال ۲۰۰۸ حدود ۱/۴ میلیون مورد جدید ابتلا به این سرطان در سراسر جهان گزارش شده است (۱). شناسایی اولیه، روش‌های درمان بهبود یافته و سبک زندگی فعال منجر به افزایش بقای بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌شود (۲) و مطالعات متعددی اثرات مثبت تمرینات ورزشی را در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان پستان گزارش کرده‌اند (۳). در تایید این گفته‌ها، مطالعات صورت گرفته تاثیر تمرینات ورزشی را در کاهش حجم تومور نشان داده‌اند (۴). باوجود این، برخی مطالعات نیز عدم تغییر (۵) و حتی افزایش (۶) حجم تومور را به دنبال تمرینات ورزشی گزارش کرده‌اند و یافته‌ها در این رابطه ضد و نقیض است. در مقایسه انواع مختلف تمرینات ورزشی نیز عنوان شده است که تمرینات ورزشی استقامتی به صورت تناوبی در مقایسه با تمرینات استقامتی طولانی‌مدت برای بیماران مبتلا به سرطان بسیار قابل تحمل‌تر است (۷) و بر همین اساس اهمیت تمرین تناوبی در نمونه‌های مبتلا به سرطان تا حدود زیادی مورد توجه قرار گرفته است (۸).

علاوه بر تمرینات ورزشی، برخی محققان عنوان کرده‌اند که عنصری از قبیل سلنیوم نیز می‌توانند در درمان سرطان مورد استفاده قرار بگیرند (۹). سلنیوم یک عنصر کمیاب و دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند تاثیرات محافظت در برابر سرطان را نیز به دنبال داشته باشد (۱۰) و مطالعات صورت گرفته روی نمونه‌های حیوانی، اثرگذاری بیشتر تلفیق تمرینات ورزشی با مصرف نانوذرات سلنیوم را در کاهش حجم تومور پستان در مقایسه با تمرین ورزشی به تنهایی گزارش کرده‌اند (۱۱).

علی‌رغم اینکه نقش تمرینات ورزشی در کاهش حجم تومور نمونه‌های حیوانی تا حدود زیادی مورد تایید است (۱۲)، اما مسیر دقیق اثرگذاری تمرین ورزشی بر بافت توموری هنوز کاملاً مشخص نیست. برخی محققان اثرات ضد توموری تمرینات ورزشی را به تنظیم افزایشی عوامل آپوپتیک (Bax) و تنظیم کاهش‌ی عوامل آنتی‌آپوپتیک (Bcl-2) نسبت داده‌اند (۱۳) و بر این اساس، به نظر می‌رسد که آپوپتوز نقش مهمی را در روند رشد تومور و پیشرفت سرطان ایفا می‌کند.

آپوپتوز نقش مهمی در حذف سلول‌های آلوده، آسیب‌دیده و سایر سلول‌های ناخواسته از بدن دارد. با توجه به اینکه نقص در آپوپتوز می‌تواند در بروز بیماری‌هایی مانند سرطان نقش داشته باشد، علاقه به کنترل آپوپتوز به صورت فزاینده‌ای در بین محققان حیطه سرطان رو به افزایش است (۱۴). در بافت پستان، همانند اکثر بافت‌های دیگر، آپوپتوز سلولی از طریق مسیر آپوپتیک داخلی تنظیم می‌شود که از پروتئین‌های خانواده Bcl-2 تشکیل شده است (۱۵). Bcl-2 یک پروتئین آنتی‌آپوپتیک است که در نصف بدخیمی‌های انسان و ۶۰٪ بیماران مبتلا به سرطان پستان دچار بیش بیان می‌شود که نقش انکوژنیک خود را به واسطه جلوگیری از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض آپوپتوز اعمال می‌کند و بیش‌بیانی Bcl-2 موجب افزایش مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و رادیوتراپی و فنوتیپ تومور تهاجمی در بیماران مبتلا به انواع مختلف سرطان‌ها می‌شود (۱۶). یافته‌های جدید نشان داده‌اند که Bcl-2 نه تنها آپوپتوز بلکه مرگ سلولی اتوفژیک را نیز در سرطان‌های پستان مهار می‌کند (۱۷). از این رو، یکی از حوزه‌های مهم دیگر سرطان، اتوفژای یا خودخوری<sup>۱</sup> است.

اتوفژای یک فرآیند برنامه‌ریزی شده از نظر ژنتیکی و تکاملی حفاظت شده است که پروتئین‌های سلولی با عمر طولانی و ارگانل‌ها را تخریب می‌کند. در واقع، اتوفژای شامل تشکیل وزیکول دو غشایی است که سیتوپلاسم و ارگانل‌ها را احاطه می‌کند و سپس با لیزوزوم‌ها ادغام می‌شود، بنابراین محتوای لیزوزوم را تخریب می‌کند (۱۸). حدود ۳۰ ژن ویژه، اتوفژای را تنظیم می‌کنند که از بین این ژن‌ها، LC3 (پروتئین زنجیره سبک ۳ مرتبط با میکروتوبول<sup>۲</sup>) نقش مهمی در اتوفژای پستانداران ایفا می‌کند و معمولاً به عنوان نشانگر تشکیل اتوفگوزوم مورد استفاده قرار می‌گیرد که تعداد اتوفگوزوم‌های مشاهده شده در بافت به نوبه خود می‌تواند به عنوان مقیاس فعالیت اتوفگیک در نظر گرفته شود (۱۹). با وجود این، نقش اتوفژای در درمان سرطان ضد و نقیض است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که اتوفژای رشد تومور را سرکوب می‌کند (۲۰)، در حالی که سایر مطالعات عنوان کرده‌اند که اتوفژای از طریق محافظت از سلول‌های توموری در برابر

<sup>1</sup> Self-eating

<sup>2</sup> Microtubule-associated Protein Light Chain 3

و علوم ورزشی تایید شده است. نمونه‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر ۱۲ سر موش ماده Balb/c سه تا پنج هفته‌ای با میانگین وزن ۱۷ گرم بودند که از انیستیتو پاستور تهران خریداری و به حیوان‌خانه دانشگاه تربیت مدرس انتقال یافتند. طی دوره پژوهشی موش‌ها در اتاقی به ابعاد ۱/۶۰ در ۲/۲۰ متر در شرایط کنترل نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، شروع روشنایی ۶ صبح و شروع خاموشی ۶ عصر) دما (۲۲±۳ درجه سلسیوس) و رطوبت (حدود ۴۵٪) نگهداری شدند. همه موش‌ها آزادانه به آب و غذای استاندارد که شامل آب و غذای معمول موش بود، دسترسی داشتند. تمامی موش‌ها به مدت دو هفته با شرایط زندگی در حیوان‌خانه سازگار شدند و سپس پروتکل پژوهشی اجرا شد. در طول دوره پژوهش موش‌ها توسط یک نفر جابجا و دستکاری شدند. سرطانی کردن موش‌ها از طریق آدنوکارسینومای مجرای تهاجمی موشی و با استفاده از تزریق رده سلولی 4T-1 ایجاد شد. به منظور القای تومور، موش‌ها در ابتدا با کتامین و زایلازین که به صورت درون صفاقی به آنها تزریق گردید، بی‌هوش شدند و سلول‌های سرطانی 4T-1 به صورت زیر جلدی به ناحیه بالای ران آنها تزریق شد. تقریباً دو هفته بعد از تزریق سلول‌های سرطانی، که تومور در ناحیه تزریق شده قابل لمس بود، موش‌ها در گروه‌های پژوهشی تقسیم‌بندی شدند.

**گروه‌های پژوهشی:** ۱۲ سر موش ماده بالب/سی پس از تزریق سلول‌های سرطانی در چهار گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه اول (تومور-کنترل) (CT): این گروه شامل ۳ سر موش بود که بعد از سرطانی شدن در هیچ مداخله‌ای شرکت نداشتند. گروه دوم (تومور-تمرین) (TT): این گروه شامل ۳ سر موش بود که پس از سرطانی شدن، تمرینات تناوبی را بدون مصرف مکمل نانو ذرات سلنیوم اجرا کردند. گروه سوم (تومور-نانو ذرات سلنیوم) (ST): این گروه شامل ۳ سر موش بود که پس از سرطانی شدن، تنها مکمل نانو ذرات سلنیوم را مصرف کردند و گروه چهارم (تومور-تمرین-نانو ذرات سلنیوم) (SeTT): این گروه شامل ۳ سر موش بود که پس از سرطانی شدن، تمرین تناوبی و مصرف مکمل نانو ذرات سلنیوم را داشتند. **تهیه و مصرف نانو ذرات سلنیوم:** لاکتوباسیلوس برویس در ۱۰۰ میلی‌لیتر از (MRS) مایع کشت شد (Merch، آلمان) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه

محرك‌های مرگ سلولی، رشد تومور را افزایش می‌دهد (۲۱). نتایج در رابطه با نقش ژن LC3 در رشد سلول‌های توموری پستان متناقض است. برخی محققان عنوان کرده‌اند که تنظیم اتوفاژی و آپوپتوز از طریق برخی عوامل رونویسی مانند TFDP3 به واسطه افزایش بیان LC3 اعمال می‌شود و تنظیم افزایشی بیان LC3 در رده سلولی MDA-MB-231 پستان به افزایش تعداد اتوفاگوزوم‌ها در طول شیمی‌درمانی منجر می‌شود که تحریک مسیر اتوفاژی را در بافت بدخیم به دنبال دارد (۲۲). در مقابل، گزارش شده است که ژن LC3 برای تمایز، بقا، مهاجرت و تهاجم سلول‌های توموری پستان ضروری است و می‌تواند در رشد تومور و پیشرفت آن نقش داشته باشد و بر این اساس هدف قرار دادن LC3 را به عنوان یک راهکار درمانی مطرح کرده‌اند (۲۳).

علاوه بر اثرات ضد توموری تمرینات ورزشی که تاحدودی به تغییرات در میانجی‌های آپوپتیک و آنتی‌آپوپتیک نسبت داده شده است (۲۴)، به نظر می‌رسد که آپوپتوز مسیر اصلی مرگ سلولی برای بیشتر گونه‌های سلنیوم نیز باشد و در تایید این گفته‌ها عنوان شده است که سلنیوم می‌تواند از طریق چندین مسیر شامل فعال‌سازی p53، تنظیم افزایشی Bax و تنظیم کاهشی Bcl-2، اثرات آپوپتیک خود را اعمال کند (۲۵). با وجود این که گزارش شده است که مصرف سلنیوم در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان می‌تواند اثرات سرکوبگر تومور ناشی از تمرینات ورزشی را تقویت کند (۱۱)، اما سازوکارهای این اثرگذاری از طریق مسیرهای آپوپتوز و اتوفاژی مورد بررسی قرار نگرفته است و در رابطه با اثرات هم‌زمان تمرینات ورزشی به‌ویژه از نوع تناوبی و مصرف مکمل نانوذره سلنیوم بر تغییرات حجم تومور و مسیرهای احتمالی آن اطلاعاتی در دست نیست. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر شش هفته تمرین تناوبی همراه با مصرف نانوذره سلنیوم بر عوامل مرتبط با آپوپتوز (Bcl-2) و اتوفاژی (LC3) در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی بود که به صورت میدانی و آزمایشگاهی اجرا شد و با کد اخلاق شماره IR.SSRI.REC.1395.129 در پژوهشگاه تربیت بدنی

شد. بعد از یک شب انکوباتور، ۱ میلی‌لیتر از سلنیوم اکسید از استوک (200 mg/l) در ۱۰۰ میلی‌لیتر از کشت مایع لاکتوباسیلوس اضافه شد و به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. سلول‌ها توسط سانتریفیوژ در 400 برای ۱۵ دقیقه جمع‌آوری شدند و پلیت حاصل ۳ بار با PBS شسته شد و برای استخراج نانو ذرات سلنیوم استفاده شد. پلیت حاصل در نیتروژن مایع منجمد و هاون کوبی شد. نانو ذرات سلنیوم از بقایای سلولی با سیستم استخراج آب الکل N-octyl جدا شد. نانو ذرات سلنیوم جدا شده در 100 kv با یک میکروسکوپ انتقال الکترونی EM-208 (TEM) (EEI Ltd Eindhoven) برای ارزیابی اندازه مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. پتانسیل زتا از نانو ذرات تلخیص شده با استفاده از Zetasizer MS 2000 (Malvern, UK) تعیین شد. برای تعیین ترکیب عنصری از نانو ذرات، انرژی پراکنده طیف اشعه ایکس (EDX) میکروآنالیز نیز انجام شد. در نهایت نانو ذرات سلنیوم قرمز عنصری در PBS استریل به حالت سوسپانسیون در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۶). بعد از ابتلای موش‌ها به سرطان، یک روز در میان به مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در اندازه ۲۵۰ نانومتر از نانو ذرات سلنیوم Se NPs به صورت خوراکی به موش‌ها داده شد (۲۷).

**اندازه‌گیری حجم تومور و وزن تومور:** حجم تومور در دو بعد اندازه‌گیری شد. بزرگ‌ترین بعد تومور به عنوان طول (L) تومور و بعد دیگر (در زاویه ۹۰ درجه) به عنوان عرض (W) آن در نظر گرفته شد. پس از ظاهر شدن تومور، هر هفته یک بار طول و عرض تومور توسط کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد و با فرمول محاسباتی حجم تومور  $[V = \pi/6 (W \times L^2)]$  میزان آن تعیین شد (۲۸).

**برنامه تمرینی:** برنامه تمرین تناوبی به مدت شش هفته و پنج روز در هفته اجرا شد. بعد از یک هفته آشناسازی (دویدن روی نوارگردان مخصوص جوندگان با سرعت ۱۲-۱۰ متر بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و ۵ روز در هفته)، آزمون فعالیت ورزشی بیشینه موش‌ها به عمل آمد. بدین منظور بعد از ۱۰ دقیقه گرم کردن، موش‌ها با سرعت اولیه ۶ متر بر دقیقه روی نوارگردان می‌دویدند و هر ۳ دقیقه یک بار تا زمان رسیدن به واماندگی، ۳ متر بر دقیقه به سرعت نوارگردان افزوده می‌شد. Vmax زمانی محاسبه گردید که موش‌ها قادر نبودند در آن سرعت بدوند. برنامه

**برداشت بافت تومور:** ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی، موش‌ها با استفاده از ترکیب کتامین-زایلازین بی‌هوش شدند و در محیط کاملاً استریل با استفاده از تیغ جراحی و ایجاد برش، تومور استخراج گردید و سپس حدود ۳۰ میلی‌گرم از آن جدا شد که بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد و جهت انجام آزمایشات سلولی مولکولی در یخچال ۸۰- نگهداری شد.

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** جهت استخراج total RNA از تومور به نسبت ۱ به ۱۰ در QIAzol Lysis Reagent هموزن گردید. به منظور برداشتن اجزا پروتئینی، محصول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس به نسبت ۱ به ۰/۵ با کلروفرم مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و بخش معدنی و آبی از هم جدا شدند، بخش محتوی RNA برداشته و با نسبت ۱ به ۰/۵ با ایزوپروپانول مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق رها و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. Pellet حاوی RNA در اتانول شستشو و در ۲۰ μl آب RNase-Free حل شد. غلظت RNA (با استفاده از دستگاه Eppendorff Germany) سنجیده شد و نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ بین ۱/۸ تا ۲ به عنوان تخلیص مطلوب تعریف گردید. سنتز cDNA با استفاده از ۱ μg RNA و با استفاده از کیت سنتز cDNA ساخت فرمنتاز و آنزیم Mulv Reverse transcriptase انجام گرفت (۲۹).

**روش Real-time PCR:** جهت اندازه‌گیری سطوح بیان ژن LC3 و Bcl-2، از روش کمی Real time-PCR با استفاده از Primix syber green II استفاده

۹۵ به مدت ۱۰ دقیقه- ۹۵ به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ به مدت ۱ دقیقه (تکرار ۴۰ سیکل) بود. میزان بیان ژن‌های مورد نظر نیز با روش  $2^{\Delta\Delta CT}$  اندازه‌گیری شد. در بخش آمار استنباطی جهت تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (KS) استفاده شد. جهت تعیین معنا دار بودن تفاوت بین متغیرها از آزمون آماری آنالیز واریانس دو سویه استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS-24 استفاده شد.

شد (Applied Biosystems, USA). مخلوط واکنش در حجم نهایی  $20 \mu\text{L}$  و هر واکنش به صورت duplicate صورت پذیرفت. طراحی پرایمرها بر اساس اطلاعات ژن‌های LC3 و Bcl-2 در بانک ژنی NCBI، با استفاده از نرم‌افزار Oligo و توسط شرکت ماکرو ژن (Macrogen Inc. Seoul, Korea) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ گزارش شده است، ضمن اینکه از Gapdh به عنوان ژن کنترل استفاده شد. برنامه دمایی مورد استفاده در Real time-PCR شامل:

جدول ۱: توالی پرایمر و دما

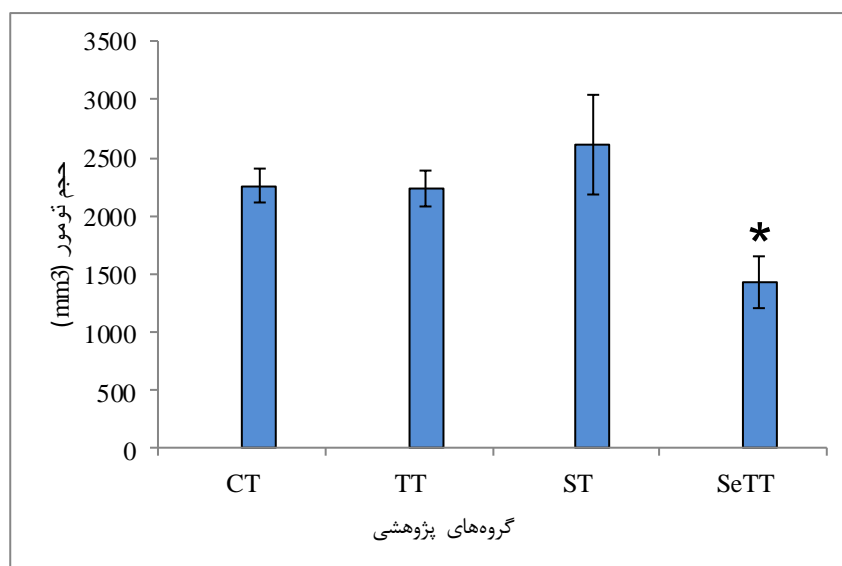
ژن	توالی پرایمر	دما
LC3	F: GCGACCAGCACCCAGTAAG R: GTTGACCAGCAGGAAGAAGGC	۸۱/۱۲
BCL2	F: TGAGTACCTGAACCGGCATCT R: GCATCCCAGCCTCCGTTAT	۷۸/۶۲
GAPDH	F: GGAGAGTGTTCCTCGTCCC R: GTGCCGTTGAATTTGCCGTG	۸۲/۰۲

گروه‌های TT ( $p=0/006$ ) و SeTT ( $p=0/04$ ) معنادار بود. در واقع، تمرین به صورت تنهایی و در ترکیب با سلنیوم با افزایش بیان LC3 همراه بود. هرچند افزایش بیان LC3 در گروه ST معنادار نبود ( $p=0/15$ )، اما افزایش از نظر بالینی قابل ملاحظه بود (نمودار ۲). همچنین بیان ژن Bcl-2 در بافت تومور سه گروه TT، ST و SeTT کاهش یافت. با وجود این، کاهش Bcl-2 صرفاً در گروه ST از نظر آماری معنادار بود ( $p=0/01$ ) (نمودار ۳).

## یافته‌ها

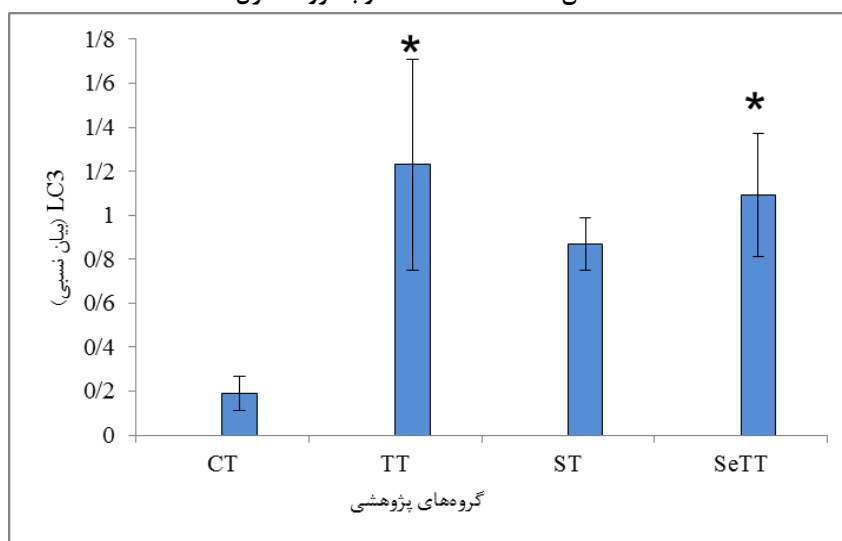
نتایج پژوهش حاضر کاهش معنادار حجم تومور را در گروه تومور-تمرین- نانو ذرات سلنیوم (SeTT) نشان داد ( $p<0/01$ ). با وجود این، تمرین ورزشی تناوبی و مکمل سلنیوم به تنهایی با تغییر معناداری در حجم تومور همراه نبود (نمودار ۱).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان بیان ژن LC3 بافت تومور در سه گروه TT، ST و SeTT در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است که این افزایش در

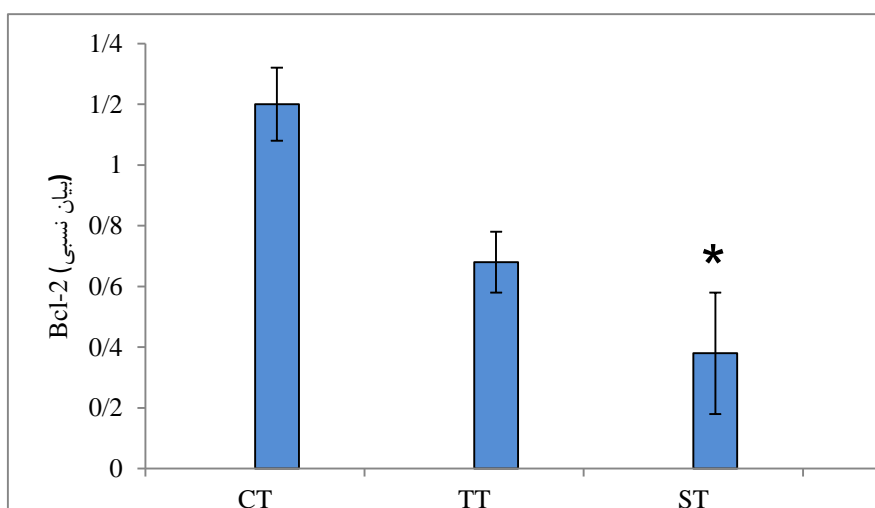


نمودار ۱: حجم تومور در گروه‌های مختلف پژوهشی

\* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل



نمودار ۲: میزان بیان ژن LC3 در گروه‌های مختلف  
\* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل



نمودار ۳: میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های مختلف  
\* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل

است و مطالعات مختلف نشان داده‌اند که LC3 می‌تواند مرگ سلولی و یا بقای آن را افزایش دهد (۳۰). اما برخلاف این گفته‌ها، LC3 به عنوان یکی از عوامل موثر در اتوفاجی نیز شناخته شده است که بر اساس شواهد موجود می‌تواند عملکرد آپوپتیک نیز داشته باشد (۳۱). گزارش شده است که کاهش فعالیت اتوفاجیک به دلیل کم شدن میزان بیان LC3 و Beclin-1 می‌تواند با توموروزنز و افزایش رشد تومور همراه باشد (۳۲). همسو با این موارد، در پژوهش حاضر نیز افزایش بیان LC3 در گروه SeTT با کاهش معنادار حجم تومور همراه بود. اما با وجود افزایش بیان LC3 در گروه‌های TT و ST، تغییر

## بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که بعد از شش هفته تمرین تناوبی با و بدون مصرف نانوذرات سلنیوم، بیان ژن LC3 در بافت تومور به صوت معناداری افزایش یافته است ( $p < 0.05$ )، علی‌رغم افزایش قابل ملاحظه بیان LC3 در گروه سلنیوم، این افزایش از نظری آماری معنادار نبود. همچنین، بیان ژن Bcl-2 در همه گروه‌های پژوهشی در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، اما این کاهش تنها در گروه مکمل سلنیوم (ST) از نظر آماری معنادار بود ( $p = 0.01$ ). نتایج در رابطه با نقش LC3 در سرطان ضد و نقیض

حجم تومور می‌شود، باید مطالعات بیشتری صورت گیرد. با وجود این، بر اساس یافته‌های حاضر به نظر می‌رسد که بخشی از تاثیرات ضدتوموری مشاهده شده برای LC3 در مطالعه حاضر ناشی از تعامل و ارتباط LC3 با فاکتورهای اثرگذار بر مسیرهای آپوپتوزی از جمله Bcl-2 در بافت تومور باشد. در مجموع، هنوز نتیجه‌گیری قطعی در رابطه با عملکرد ژن LC3 در رده‌های مختلف سرطان از جمله سرطان پستان غیر ممکن است. همچنین، یافته‌های حاضر بر این واقعیت تاکید دارد که علاوه بر تغییرات بیان ژن LC3 در بافت تومور، عوامل دیگری نیز بر تغییرات در حجم تومور اثرگذار هستند که باید در پژوهش‌های آتی بیشتر مورد مطالعه قرار گیرند.

یکی از عوامل تعیین‌کننده دیگر در تغییرات حجم تومور پروتئین‌های خانواده Bcl-2 هستند. گزارش شده است که بیان Bcl-2 در بافت تومور می‌تواند تعیین‌کننده میزان مقاومت به شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به سرطان پستان باشد به نحوی که افزایش بیان Bcl-2 با مقاومت در برابر شیمی‌درمانی همراه است (۳۸). همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، خوری و همکارانش (۲۰۱۶) نشان دادند که ۵ هفته تمرینات ورزشی به تنهایی یا در ترکیب با مصرف تاموکسیفن با کاهش بیان Bcl-2 همراه است که کاهش Bcl-2 در گروه‌های تاموکسیفن، تمرین و تمرین + تاموکسیفن در مقایسه با گروه کنترل معنادار بود (۱۳). در پژوهش حاضر نیز تمرین و نانوذرات سلنیوم با کاهش بیان Bcl-2 در بافت تومور همراه بود، اما کاهش بیان Bcl-2 تنها در گروه ST معنادار بود. علی‌رغم نتایج تقریباً مشابه با پژوهش خوری و همکارانش (۲۰۱۶)، نوع تومور القا شده در پژوهش حاضر (4T-1) متفاوت از تومور القا شده (MC4-L2) در پژوهش خوری و همکارانش (۲۰۱۶) بود.

برخی مطالعات نیز گزارش کرده‌اند که Mir-21 از طریق تنظیم افزایشی عامل ضد آپوپتوزی Bcl-2 منجر به افزایش رشد تومور می‌شود (۳۹). بر اساس شواهد موجود، کاهش بیان Bcl-2 و افزایش بیان Bax منجر به تحریک آپوپتوز تومور می‌شود (۴۰). علی‌رغم کاهش میزان بیان ژن Bcl-2 در گروه‌های SeTT، ST و TT در پژوهش حاضر، کاهش حجم تومور صرفاً در گروه SeTT مشاهده شد. امینی و همکارانش (۲۰۱۷) نیز افزایش عوامل آپوپتیک (mir-15) و کاهش عوامل آنتی‌آپوپتیک (bcl-

معناداری در حجم تومور این دو گروه مشاهده نشد (البته افزایش اندک و غیرمعنادار حجم تومور در گروه ST مشاهده شد).

در رابطه با مطالعاتی که برخلاف یافته‌های حاضر گزارش کرده‌اند که LC3 نه تنها در سلول‌های توموری دارای عملکرد آپوپتوزی نیست، بلکه به افزایش تهاجم و رشد سلول‌های توموری پستان نیز منجر می‌شود (۲۳) می‌توان عنوان کرد که احتمالاً رده متفاوت سلول سرطانی پستان مورد بررسی در پژوهش فوق (سلول‌های سرطان پستان سه‌گانه منفی با ویژگی تهاجمی بسیار بالا) در مقایسه با پژوهش حاضر می‌تواند تاحدودی تناقض در یافته‌ها را توجیه کند (۲۳). در تایید این فرضیه، دوناسکیمنتو<sup>۳</sup> و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که تاثیرات ضد توموری برخی عناصر از قبیل Halilectin-3 در رده سلولی MCF7 سرطان پستان انسان از طریق تنظیم افزایشی مسیر آپوپتوزی کاسپاز ۹ و همچنین افزایش بیان LC3 اعمال می‌شود و افزایش بیان کاسپاز ۹ و LC3 تاثیرات آپوپتیک قابل ملاحظه‌ای بر سلول‌های سرطانی دارد (۳۳). این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً در برخی رده‌های سلولی سرطان پستان، LC3 می‌تواند بواسطه تعامل با عوامل آپوپتیک مانند کاسپازها به آپوپتوز سلول‌های سرطانی منجر شود. در مقابل، در رده سلولی پستان MDA-MB-231 نیز کاهش بیان LC3 به عنوان یکی از مسیرهای مقابله با رشد سلول‌های سرطانی مطرح شده است (۳۴). بر اساس شواهد موجود، به نظر می‌رسد که تاثیرات توموروزنی LC3 تاحدودی بواسطه نقش آن در تنظیم کاهش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور از قبیل p53 اتفاق می‌افتد (۳۵). با وجود این، در مورد یافته‌های حاضر و نقش LC3 در مهار رشد تومور و سازوکارهای احتمالی آن اطلاعی در دست نیست.

در سایر گونه‌های سرطان از جمله سرطان روده بزرگ و معده نیز نقش ژن LC3 در رشد و توسعه سلول‌های سرطانی و کاهش بقای نمونه‌های مبتلا به سرطان تایید شده است (۳۶، ۳۷). بنابراین، به نظر می‌رسد که ژن LC3 در انواع گوناگون سرطان دارای نقش‌های مختلفی باشد. با این همه، در رابطه با نتایج حاضر و سازوکاری که بواسطه آن تنظیم افزایشی بیان LC3 منجر به کاهش

<sup>3</sup> do Nascimento

تاثیر منفی اما غیرمعنادار تمرین تناوبی در پژوهش حاضر بر حجم تومور را شاید بتوان به شدت بالای تمرین ورزشی نسبت داد. در این رابطه، آلمیدا و همکارانش (۲۰۰۹) گزارش کردند که تمرین شنا با شدت ۵۰٪ ظرفیت عملکردی منجر به کاهش معنادار حجم و وزن تومور در مقایسه با گروه کنترل می‌شود، اما در شدت ۸۰٪ ظرفیت عملکردی، کاهش اندک حجم تومور در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (۶). از این رو، به نظر می‌رسد که یک شدت بهینه برای اثرگذاری مثبت فعالیت ورزشی وجود داشته باشد. البته نوع تومور القا شده و برنامه تمرینی آلمیدا و همکارانش (۲۰۰۹) متفاوت از پژوهش حاضر بود. اما بر خلاف یافته‌های پژوهش حاضر شلمزاری و همکارانش (۲۰۱۴) نشان دادند که تمرینات استقامتی منجر به کاهش معنادار حجم تومور در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان می‌شود (۴۲). علی‌رغم مدت زمان مشابه برنامه تمرینی بعد از توموری شدن موش‌ها (۶ هفته)، نوع برنامه تمرینی (استقامتی) و تومور القا شده (MC4-L2) در پژوهش شلمزاری و همکارانش (۲۰۱۴) متفاوت از پژوهش حاضر بود. در مجموع، ۶۰٪ مطالعات انجام شده در رابطه با تغییرات حجم تومور به دنبال فعالیت ورزشی از نقش مثبت تمرینات ورزشی در پیشگیری از بروز و رشد تومور حمایت کرده‌اند و سازوکارهای مختلفی برای اثرگذاری مثبت فعالیت ورزشی ارائه شده است (۱۲). با وجود این، هنوز سازوکارهای اثرگذاری فعالیت ورزشی بر سرطان تا حدود زیادی ناشناخته مانده است و بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌توان عنوان کرده به‌منظور تفسیر بهتر نتایج پژوهش حاضر، باید در پژوهش‌های آتی عوامل آتی آپوتیک همانند Bcl-2 هم‌زمان با عوامل آپوتیک از قبیل Bax مورد بررسی قرار گیرند.

### نتیجه‌گیری

نتایج حاضر نشان داد که ترکیب تمرینات ورزشی تناوبی و مصرف نانوذرات سلنیوم (برخلاف تمرین ورزشی و یا مصرف نانوذرات سلنیوم به تنهایی) تاثیرات ضدتوموری معناداری دارد که این تغییرات با کاهش بیان ژن Bcl-2 (غیرمعنادار) و افزایش بیان ژن LC3 در بافت تومور همراه بود. اگرچه کاهش حجم تومور به دنبال تنظیم کاهشی بیان ژن Bcl-2 کاملاً مورد انتظار است، اما در

بافت تومور پستان در نمونه‌های موش را به دنبال هشت هفته تمرین هوازی نشان دادند که با کاهش معنادار حجم تومور همراه بود. این یافته‌ها بر نقش ضدتوموری فعالیت ورزشی تاکید دارد (۴۱). البته مدت زمان برنامه تمرینی (۸ هفته) و نوع تمرین ورزشی (استقامتی) پژوهش امینی و همکارانش (۲۰۱۷) متفاوت از پژوهش حاضر بود. با وجود این، کاهش بیان Bcl-2 در پژوهش حاضر با کاهش حجم تومور همراه نبود و کاهش حجم تومور و کاهش بیان Bcl-2 تنها در گروه SeTT مشاهده شد. احتمالاً عدم کاهش حجم تومور به دنبال تمرین ورزشی در گروه TT را بتوان به عدم افزایش عوامل آپوتیک نسبت داد که البته در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار نگرفته است.

یکی دیگر از یافته‌های پژوهش حاضر این بود که شش هفته تمرین تناوبی همراه با مصرف نانوذرات سلنیوم در موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان موجب کاهش معنادار حجم تومور می‌شود ( $p = 0/05$ ). اما تمرین تناوبی تنها و همچنین مصرف نانوذرات سلنیوم بدون تمرین ورزشی با تغییری در حجم تومور همراه نبود. برخی پژوهشگران اثرگذاری بیشتر داروهای ضدسرطان از قبیل تاموکسیفن و لرتروزول را در ترکیب با فعالیت ورزشی در مقایسه با فعالیت ورزشی و تاموکسیفن یا لرتروزول به تنهایی نشان داده‌اند (۲۴). در تایید این گفته‌ها، در پژوهش حاضر نیز تمرین ورزشی تناوبی همراه با مصرف عامل ضدتومور سلنیوم با کاهش معنادار حجم تومور همراه بود. همسو با یافته‌های پژوهش حاضر، شمسی و همکارانش (۲۰۱۷) گزارش کردند که تمرینات تناوبی همراه با مصرف نانوذرات سلنیوم با کاهش حجم تومور همراه است (۲۹). برنامه تمرینی و روش اجرای پژوهش شمسی و همکارانش (۲۰۱۷) کاملاً مشابه با پژوهش حاضر بود. همین محققان اخیراً تاثیر هم‌زمان تمرینات ورزشی تناوبی و مصرف نانوذرات سلنیوم در کاهش حجم تومور را با تعدیل سطوح میانجی‌های التهابی از قبیل IL-4 و افزایش سایتوکاین‌های Th-1 در بافت تومور مرتبط دانستند (۱۱). یافته‌های حاضر نیز در تایید مطالعات فوق بیانگر اهمیت مصرف نانوذرات سلنیوم در ترکیب با تمرینات تناوبی به عنوان یک عامل کمکی سرکوبگر تومور است که می‌تواند با بررسی‌های بیشتر امید به مدیریت بهتر سرطان پستان را به دنبال داشته باشد.

تمرینات تناوبی یا مصرف نانوذرات سلنیوم به عوامل دیگری غیر از تغییرات در بیان LC3 و Bcl-2 نیز بستگی دارد.

### تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تعارض منافی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

رابطه با تنظیم افزایشی LC3 نمی‌توان با قاطعیت اظهار نظر کرد، بویژه با توجه به اینکه مطالعات متعددی نقش آن را در تومور و وزن نشان داده‌اند و بر همین اساس باید در مورد سازوکار افزایش بیان LC3 و ارتباط افزایش بیان آن با تغییرات حجم تومور مطالعات بیشتری صورت گیرد. البته با توجه به اینکه افزایش بیان LC3 و کاهش بیان Bcl-2 در گروه‌های TT و ST نیز مشاهده شد، می‌توان نتیجه گرفت که تغییرات در حجم تومور بعد از یک دوره

### References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. 2011; 61(2):69-90.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. CA: a cancer journal for clinicians. 2012; 62(4):220-41.
- Adraskela K, Veisaki E, Koutsilieris M, Philippou A. Physical exercise positively influences breast cancer evolution. Clinical breast cancer. 2017; 17(6):408-17.
- Pedersen L, Idorn M, Olofsson GH, Lauenborg B, Nookaew I, Hansen RH, et al. Voluntary running suppresses tumor growth through epinephrine-and IL-6-dependent NK cell mobilization and redistribution. Cell metabolism. 2016; 8;23(3):554-62.
- Ardery S, Horn A, Opoku-Acheampong A, Baumfalk D, Behnke B. exercise training does not alter prostate tumor cell growth in rat serum or prostate conditioned media. The FASEB Journal. 2018; 32(1):855-19.
- Almeida PWM, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CEM, Dias-Peixoto MF, Russo RC, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. J Appl Physiol. 2009;107(1):261-5.
- Alves CR, da Cunha TF, da Paixão NA, Brum PC. Aerobic exercise training as therapy for cardiac and cancer cachexia. Life sciences. 2015; 125:9-14.
- Mijwel S, Backman M, Bolam KA, Jervaeus A, Sundberg CJ, Margolin S, et al. Adding high-intensity interval training to conventional training modalities: optimizing health-related outcomes during chemotherapy for breast cancer: the OptiTrain randomized controlled trial. Breast cancer research and treatment. 2018; 168(1):79-93.
- Fernandes AP, Gandin V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2015; 1850(8):1642-60.
- Wang X, Sun K, Tan Y, Wu S, Zhang J. Efficacy and safety of selenium nanoparticles administered intraperitoneally for the prevention of growth of cancer cells in the peritoneal cavity. Free Radical Biology and Medicine. 2014; 72:1-10.
- Shamsi MM, Chekachak S, Soudi S, Gharakhanlou R, Quinn LS, Ranjbar K, et al. Effects of exercise training and supplementation with selenium nanoparticle on T-helper 1 and 2 and cytokine levels in tumor tissue of mice bearing the 4 T1 mammary carcinoma. Nutrition. 2019; 57:141-7.
- Pedersen L, Christensen JF, Hojman P. Effects of exercise on tumor physiology and metabolism. The Cancer Journal. 2015; 21(2):111-6.
- Khori V, Shalamzari SA, Isanejad A, Alizadeh AM, Alizadeh S, Khodayari S, et al. Effects of exercise training together with tamoxifen in reducing mammary tumor burden in mice: Possible underlying pathway of miR-21. European Journal of Pharmacology. 2015; 765:179-87.
- Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, et al. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. Oncogene. 2002; 21(57):8843.
- Williams MM, Cook RS. Bcl-2 family proteins in breast development and cancer: could Mcl-1 targeting overcome therapeutic resistance? Oncotarget. 2015; 6(6):3519.
- Akar U, Chaves-Reyez A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y, et al. Silencing of Bcl-2

- expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy*. 2008; 4(5):669-79.
17. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122(6):927-39.
  18. Hippert MM, O'Toole PS, Thorburn A. Autophagy in cancer: good, bad, or both? *Cancer research*. 2006; 66(19):9349-51.
  19. He JH, Luo RZ, Cai MY, Li M, Lu JB, Yuan ZY. Decreased expression of light chain 3 (LC3) increased the risk of distant metastasis in triple-negative breast cancer. *Medical Oncology*. 2013; 30(1):468.
  20. Furuya D, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. Beclin 1 augmented cis-diamminedichloroplatinum induced apoptosis via enhancing caspase-9 activity. *Experimental cell research*. 2005; 307(1):26-40.
  21. Liang XH, Yu J, Brown K, Levine B. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer research*. 2001; 61(8):3443-9.
  22. Ding LY, Chu M, Jiao YS, Hao Q, Xiao P, Li HH, Guo Q, Wang YD. TFDP3 regulates the apoptosis and autophagy in breast cancer cell line MDA-MB-231. *PloS one*. 2018; 13(9): e0203833.
  23. Hamurcu Z, Delibaşı N, Geçene S, Şener EF, Dönmez-Altuntaş H, Özkul Y, et al. Targeting LC3 and Beclin-1 autophagy genes suppresses proliferation, survival, migration and invasion by inhibition of Cyclin-D1 and uPAR/Integrin  $\beta$ 1/Src signaling in triple negative breast cancer cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018; 144(3):415-30.
  24. Isanejad A, Alizadeh AM, Shalamzari SA, Khodayari H, Khodayari S, Khorri V. et al. MicroRNA-206, let-7a and microRNA-21 pathways involved in the anti-angiogenesis effects of the interval exercise training and hormone therapy in breast cancer. *Life Sciences*. 2016; 151:30-40.
  25. Maiyo F, Singh M. Selenium nanoparticles: potential in cancer gene and drug delivery. *Nanomedicine*. 2017; 12(9):1075-89.
  26. Yazdi MH, Mahdavi M, Varastehmoradi B, Faramarzi MA, Shahverdi AR. The immunostimulatory effect of biogenic selenium nanoparticles on the 4T1 breast cancer model: an in vivo study. *Biological trace element research*. 2012; 149(1):22-8.
  27. Chekachak S, Shamsi MM, Soudi S, Ranjbar K. The Effect of Endurance Interval Training with Selenium Nanoparticles on Skeletal Muscle Cachexia in Mice with Breast Cancer. 2017; 13(26): 67-77.
  28. Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol*. 2010; 108(2):343-8.
  29. Shamsi MM, Chekachak S, Soudi S, Quinn LS, Rangbar K, Chenari J, et al. Combined effect of aerobic interval training and selenium nanoparticles on expression of IL-15 and IL-10/TNF- $\alpha$  ratio in skeletal muscle of 4T1 breast cancer mice with cachexia. *Cytokine*. 2017; 90:100-8.
  30. Ladoire S, Chaba K, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Michaud M, et al. Immunohistochemical detection of cytoplasmic LC3 puncta in human cancer specimens. *Autophagy*. 2012; 8(8):1175-84.
  31. Tran TA, Ahn KS, Song YW, Moon JY, Cho M, Lim Y, Cho SK. Mechanism of 2', 3'-dimethoxyflavanone-induced apoptosis in breast cancer stem cells: Role of ubiquitination of caspase-8 and LC3. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014; 562:92-102.
  32. Shen Y, Li DD, Wang LL, Deng R, Zhu XF. Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy*. 2008; 4(8):1067-8.
  33. Do Nascimento-Neto LG, Cabral MG, Carneiro RF, Silva Z, Arruda FV, Nagano CS, et al. Halilectin-3, a Lectin from the Marine Sponge *Haliclona caerulea*, Induces Apoptosis and Autophagy in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through Caspase-9 Pathway and LC3-II Protein Expression. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*. 2018; 18(4):521-8.
  34. Su CC, Chien SY, Kuo SJ, Chen YL, Cheng CY, Chen DR. Tanshinone IIA inhibits human breast cancer MDA-MB-231 cells by decreasing LC3-II, Erb-B2 and NF- $\kappa$ Bp65. *Molecular medicine reports*. 2012; 5(4):1019-22.
  35. Kang JH, Lee SH, Cheong H, Lee CH, Kim SY. Transglutaminase 2 Promotes Autophagy by LC3 Induction through p53 Depletion in Cancer Cell. *Biomolecules & therapeutics*. 2019; 27(1):34-40.
  36. Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S, Li T. Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015; 8(4):3882.
  37. Masuda GO, Yashiro M, Kitayama K, Miki Y, Kasashima H, Kinoshita H, et al.

- Clinicopathological correlations of autophagy-related proteins LC3, Beclin 1 and p62 in gastric cancer. *Anticancer research*. 2016; 36(1):129-36.
38. Yang D, Chen MB, Wang LQ, Yang L, Liu CY, Lu PH. Bcl-2 expression predicts sensitivity to chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2013; 32(1):105.
39. Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007; 26(19):2799-803.
40. Winzer BM, Whiteman DC, Reeves MM, Paratz JD. Physical activity and cancer prevention: a systematic review of clinical trials. *Cancer Causes & Control*. 2011; 22(6):811-26.
41. Amini. A, Gaeini. A, Chobineh. S, Kordi. M. R, Alizadeh. S. The Effects of Aerobic Training on Expression of Bcl2 and miR-15 and Bcl2 Protein in Tumor Tissue in Mice with Breast Cancer. *Sport Physiology*. 2017; 32: 85-100.
42. Shalamzari SA, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, Shahbazi S, Khatib ZK, Kazemi A, Saei MA, Minayi N. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. *Iranian journal of basic medical sciences*. 2014; 17(4):231-236.