Journal of Police Medicine

Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 211-220

Original Article

Effect of aflatoxin B1 on BRCA1 and BRCA2 genes expression under in vitro cultured cell line of normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEC)

Received: 5 July 2014 **Revised:** 2 November 2014 **Accepted:** 9 November 2014

Saeedeh Moradi[1]
Hamzeh Azari[1]
Iraj Jafari Anarkooli[2]
Babak Qasemi- Panahi[3]
Somayeh Elhami[4]
Ali Forouharmehr[5*]

[1]MSc, Animal physiology, Department of Animal science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

[2]Assistant Professor, Anatomical Sciences, Department of Anatomy, Zanjan university of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[3]Assistant Professor of Animal Reproduction, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

[4]MSc, Animal Genetics, Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

[5]Ph.D Candidate, Animal Genetics, Department of Animal Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

[*]**Corresponding Author:**
Ali Forouharmehr
Tel: (+98)9165648473

e-mail: ali.forouharmehr@stu.um.ac.ir

ABSTRACT

Background: Aflatoxins are carcinogenic compounds that are produced by Aspergillus flvaus and A. parasiticus fungi growing on foods. Among variety of known aflatoxins, aflatoxin B1 has been reported as the most carcinogenic compounds. This toxin can enter human body through contaminated food. The mammary tissue is one of the body tissues that aflatoxin B1 can penetrate. The BRCA1 and BRCA2 genes are two major effective genes mammary gland tumor suppression, so expression of these genes can be affected by aflatoxin B1.

Materials and Methods: In order to evaluate the effects of aflatoxin B1 on BRCA1 and BRCA2 genes expression, normal Human Mammary Epithelial Cells (HMEC) were cultured as monolayer. After 10 days, monolayer cells culture reached suitable amount and was passaged for treatment to 16 flasks 25cm^2 (four treatments with four replicates for each one). After proper cells growth, three treatments, 15, 25 and 35 µl of aflatoxin B1 were added to the flasks and then, cells were separated for extraction of RNA, cDNA and Real time PCR performance after 24 hours. MTT assay was performed to measure cell viability.

Results: The results showed that all three concentrations decreased the expression of BRCA1 and BRCA2 genes ($P<0.0001$). In addition, the results of MTT assay showed that cell viability was reduced with increasing concentration of toxin and duration of exposure.

Conclusion: According to the results, it seems that aflatoxin B1 can increase the risk of breast cancer by reducing expression of BRCA1 and BRCA2 genes.

Keywords: aflatoxin B1, BRCA1 protein, BRCA2 protein, real-time polymerase chain reaction

زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳ - شماره ۴- صفحات ۲۲۰-۲۱۱

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

تأثیر آفلاتوکسین B1 بر بیان ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در شرایط کشت آزمایشگاهی رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی (HMEC)

تاریخ دریافت: ۳۰ مهر ۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۹ آذر ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۰ دی ۱۳۹۳

سعیده مرادی[۱]
حمزه آذری[۱]
ایرج جعفری انارکولی[۲]
بابک قاسمی پناهی[۳]
سمیه الهامی[۴]
علی فروهرمهر[۵*]

[۱]کارشناس ارشد، فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.
[۲]استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.
[۳]استادیار، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، تبریز، ایران.
[۴]کارشناسی ارشد ژنتیک دام، دانشگاه زنجان، گروه علوم دامی، زنجان، ایران.
[۵]دانشجوی دکترا تخصصی ژنتیک دام، دانشگاه فردوسی مشهد، گروه علوم دامی، مشهد، ایران.

***نویسنده مسئول:**
علی فروهرمهر
تلفن: ۹۱۶۵۶۴۸۴۷۳(۹۸+)
پست الکترونیک:
Ali.Forouharmehr@stu.um.ac.ir

چکیده

مقدمه: آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی سرطان‌زا هستند که توسط قارچ‌های Aspergillus flvaus و A. parasiticus تولید می‌شوند. در میان آفلاتوکسین‌های شناخته‌شده سرطان‌زایی آفلاتوکسین B1 بیشتر از سایر آفلاتوکسین‌ها می‌باشد. این سم می‌تواند با آلوده کردن مواد غذایی وارد بدن انسان و درنهایت بافت پستان شود. دو ژن مؤثر در سرکوب تومور در پستان، ژن‌های BRCA1 و BRCA2 می‌باشند که بیان این ژن‌ها می‌تواند توسط آفلاتوکسین B1 تحت تأثیر قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی تأثیر آفلاتوکسین B1 بر بیان ژن‌های BRCA1 و BRCA2، رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی (HMEC) به‌صورت تک لایه کشت داده شد. ۱۰ روز پس از کشت تک لایه و رسیدن به تعداد سلول مناسب، سلول‌ها به‌منظور اعمال تیمارها به ۱۶ فلاسک cm^2 ۲۵ (چهار تیمار هرکدام چهار تکرار) پاساژ داده شد. بعد از رشد سلول‌ها، سه تیمار ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرولیتری آفلاتوکسین B1 به فلاسک‌ها اضافه گردید. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها سلول‌ها به‌منظور استخراج RNA، تبدیل به cDNA و انجام Real time PCR از فلاسک‌ها جدا شدند. به‌منظور بررسی قدرت زنده‌مانی سلول‌ها MTT تست صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد هر سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرولیتری سم سبب کاهش بیان ژن‌های BRCA1 و BRCA2 می‌شود ($P < ۰/۰۰۰۱$). همچنین نتایج MTT تست نیز نشان داد قدرت زندمانی سلول‌ها با افزایش غلظت سم و مدت‌زمان تماس با سم کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصله به نظر می‌رسد آفلاتوکسین B1 با کاهش بیان ژن های BRCA1 و BRCA2 می‌تواند خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد.

کلید واژه‌ها: آفلاتوکسین B1، پروتئین BRCA1، پروتئین BRCA2، real-time Polymerase chain reaction.

مقدمه

مایکوتوکسین ها به عنوان یکی از بارزترین آلوده کننده های مواد غذایی که بهداشت عمومی، امنیت غذایی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به‌ویژه کشورهای درحال‌توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد موردبررسی قرار می‌گیرند در میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین آن‌ها هستند. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات سمی هستند که به عنوان متابولیت های ثانویه به وسیله قارچ هایی چون Aspergillus flvaus و A. parasiticus به دنبال رشد روی اقلام غذایی تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان عوامل سرطان‌زا، جهش زا، ناقص الخلقه زا و تضعیف کننده سیستم ایمنی شناخته

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 211-220

می‌شوند [۵-۱] از میان ۱۸ نوع مختلف آفلاتوکسین شناخته‌شده، آفلاتوکسین های B1، B2، G1، G2 توسط آژانس بین المللی تحقیق روی سرطان (IARC[1]) در گروه A عوامل سرطان زا قرارگرفته‌اند که در این میان سمیت و سرطان‌زایی آفلاتوکسین B1 بیشتر از انواع دیگر گزارش‌شده است [۶ و ۷] این ترکیب بسیار سمی می‌تواند از طریق غذاهای آلوده به‌ویژه لبنیات و خشکبار به بدن انسان منتقل شود و درنهایت از طریق جریان خون در بافت‌های مختلف بدن ازجمله بافت پستان حضور پیدا کند [۸]. مشهورترین ژن های مؤثر در جلوگیری از بروز سرطان پستان BRCA1[2] و BRCA2[3] است. ژن های BRCA1 و BRCA2 به ترتیب بر روی کروموزوم ۲۱-۱۲ q ۱۷ و ۱۲-۱۳ q ۱۳ انسان قرار دارند و جز ژن های مرسوم سرکوبگر تومور به شمار می‌آیند، این دو ژن نقش بسیار مؤثری در ترمیم آسیب های DNA ناشی از عوامل اگزوژنیک (انواع سموم و اشعه ماورای بنفش) و اندوژنیک (دآمیناسیون ستوزین، انواع اکسیژن فعال و غیره)، کنترل چرخه سلولی و تقسیم میتوز را بازی می کنند [۱۰ و ۹] مطالعات نشان می‌دهد BRCA1 و BRCA2 نقش بسیار مهمی در حفظ کل ژنوم و یا حداقل بخشی از آن دارند در حقیقت وقتی یک آسیب در DNA دو رشته رخ می‌دهد این دو ژن با نقش کلیدی که در مسیر بیولوژیکی (HR[4]) دارند می تواند با الگو قرار دادن کروماتید خواهری سالم اقدام به ترمیم بخش آسیب دیده DNA نمایند به‌طوری‌که کاهش بیان این دو ژن و یا حتی جهش در بخشی از آن‌ها می‌تواند منجر به بروز ناپایداری شدید ژنومی و درنهایت بروز سرطان گردد [۱۴-۱۱] مطالعات نشان می‌دهد که نقص در عملکرد BRCA1 در ابتلای ۸۰٪ درصد افراد بالای ۷۰ سال و نقص در عملکرد BRCA2 در ابتلای تقریباً ۵۰٪ از افراد بالای ۷۰ سال مؤثر است، با توجه به مطالب گفته شد چنین برداشت می‌شود هر عاملی که بتواند بیان این دو ژن را تحت تأثیر قرار دهد می‌تواند نقش مؤثری در افزایش خطر ابتلا به سرطان پستان داشته باشد [۱۵]، به همین منظور در این مطالعه به ارزیابی الگوی بیان ژنی این دو ژن تحت تأثیر آفلاتوکسین B1 با روش مولکولی Real time PCR پرداخته‌شده است.

مواد روش‌ها

کشت سلول:

به منظور انجام این تحقیق رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی[5] (HMEC) از شرکت GIBCO خریداری شد. سپس سلول‌ها در دمای ۳۷ ^{o}c و حضور ۵ درصد Co_2 و میزان رطوبت ۹۵ درصد با محیط کشت نرمال شامل ۱۰ درصد FBS[6]، ۸۸ درصد DMEM f12[7]، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسن و ۱ درصد ضد قارچ آمفوتریسن B برای رسیدن به تعداد سلول موردنیاز برای اعمال تیمارها به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند [۸]. بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت اولیه و رسیدن به تعداد سلول مناسب به‌منظور پاساژ سلولی، سلول‌ها به ۱۶ فلاسک cm^2 ۲۵ پاساژ داده شدند. باگذشت ۱۰ روز از پاساژ سلولی و پوشیده شدن کف فلاسک‌ها با سلول، سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرولیتری آفلاتوکسین B1 هرکدام در چهار تکرار (۴ تیمار هرکدام با ۴ تکرار) به فلاسک های کشت اضافه گردید، ۴ فلاسک هم به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تست MTT[8]:

به‌منظور بررسی تأثیر آفلاتوکسین B1 بر قدرت زندمانی سلول‌های اپیتلیال نرمال پستان نوع انسانی MTT تست انجام گرفت. به همین منظور تعداد ۱۰۰۰۰ هزار سلول به ازای هر خانه در ۴۰ خانه یک پلت ۴۸ خانه‌ای به‌صورت تک لایه کشت داده شد. بعد از چسبیدن سلول‌ها به کف پلت سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرو لیتر آفلاتوکسین B1 هرکدام در ۴ تکرار به چاهک‌ها اضافه شد (چهار چاهک نیز به‌عنوان گروه کنترل بدون اعمال سم در نظر گرفته شد) و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در انکوباتور با دمای ۳۷ ^{o}c و غلظت ۵ درصد CO2 انکوبه شد. سپس سلول‌ها با PBS شستشو داده شد و میزان ۱۵۰ میکرو لیتر محیط کشت تازه به همراه ۵۰ میکرو لیتر معرف MTT (۲ mg/µL در PBS) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ ^{o}c و غلظت ۵ درصد CO_2 قرار گرفت. بعد از گذشت ۴ ساعت محیط کشت قبلی خارج گردید و میزان ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO[9] به همراه ۲۵ میکرو لیتر بافر سورنسون (۰/۱ M گلاسین، ۰/۱ M NaCl، ۱۰/۵ PH) به خانه‌ها اضافه شد و درنهایت سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای حل شدن کریستال فورمازان به‌منظور جذب اشعه UV در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر در ۳۷ ^{o}c و میزان ۵٪ CO_2 انکوبه شدند، درنهایت میزان

1: International Agency for Research on Cancer, 2: Breast Cancer Susceptibility Gene1, 3: Breast Cancer Susceptibility Gene 2, 4: Homologs Recombinant, 5: Normal Human Mammary Epithelial Cells, 6: Fetal Bovine Serum, 7: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 8: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-y1) - 2,5diphenyltetrazolium bromide, 9: Dimethyl sulfoxide

زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۲۰-۲۱۱

جذب نوری هر خانه که معیاری از زنده ماندن سلول‌ها می‌باشند، با دستگاه ELISA reader در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید [۱۶].

مراحل و روش کار بررسی بیان ژن

استخراج RNA بر اساس دستورالعمل کیت استخراج RNA شرکت Invitrogen صورت گرفت. عمل سنجش کمیت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از دستگاه نانودراپ از روی نسبت طول‌موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. البته کیفیت RNA بر روی ژل آگارز یک درصد نیز موردبررسی قرار گرفت. RNA استخراج‌شده برای مراحل بعدی در دمای ^{o}c ۸۰- نگهداری گردید. برای انجام مرحله نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت BiONEER(Korea)، ۱۹ میکرو لیتر از RNAبه همراه ۱ میکرو لیتر اولیگودیتی با الگوی دمایی ^{o}c ۳۰ به مدت پنج دقیقه، ^{o}c ۶۰ به مدت ۶۰ دقیقه و ^{o}c ۹۵ به مدت پنج دقیقه استفاده شد.

تکثیر ژن‌های موردنظر برای اندازه‌گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به‌صورت نسبی انجام گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسانس درنتیجه اتصال رنگ سایبرگرین[1] با استفاده از دستگاه ABI ۷۵۰۰ صورت گرفت [۱۷]. در اجرای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر غلظت نهایی مواد، به‌طور خلاصه شامل: ۱۲/۵ میکرو لیتر سایبرگرین (BiONEER) به همراه یک میکرو لیتر از هرکدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ میلی مولار و ۰/۵ میکرو لیتر Dye که این محلول توسط nuclease-free water به حجم ۲۲ میکرو لیتر رسانده می‌شد و در انتها سه میکرو لیتر از cDNA ساخته‌شده در مرحله قبل به آن اضافه شد. پروفایل دمایی و شرایط معرف‌ها (شامل غلظت پرایمرها و غلظت کلرید منیزیم) برای تمام پرایمرها مورد آزمایش قرار گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن های موردنظر با استفاده از روش Real time PCR یکسان و شامل سه مرحله که عبارت است از: مرحله اول پیش واسرشتی سازی اولیه جهت فعال شدن آنزیم Taq DNA polymerase به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}c ۹۵ و در مرحله دوم ۴۵ سیکل برای تکثیر شامل: ۱۵ ثانیه واسرشته سازی با دمای ^{o}c ۹۵، اتصال پرایمرها با دمای ^{o}c ۵۷ (برای پرایمر BRCA2 دمای ^{o}c ۵۸) به مدت یک دقیقه و در مرحله سوم به منظور رسم منحنی تفکیک یک چرخه شامل: واسرشته سازی ۱۵ ثانیه با دمای ^{o}c ۹۵، اتصال یک دقیقه با دمای ^{o}c ۶۰، واسرشت سازی ۱۵ ثانیه با دمای ^{o}c ۹۵ و ذوب ۱۵ ثانیه با ^{o}c ۶۰ انجام گردید. در این مرحله کاهش دما از ^{o}c ۹۵ به ^{o}c ۶۰ با سرعت ۰/۰۳ درجه سانتی‌گراد بر ثانیه انجام شد و حدود ۲۰ دقیقه به طول انجامید. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن های BRCA1، BRCA2 و GAPDH با استفاده از نرم افزار Premier Primer (نسخه ۵) طراحی شد. ساخت و تولید آغازگرها توسط شرکت بایونیر کره جنوبی صورت گرفت (جدول ۱).

برای ژن‌های هدف و مرجع نمونه‌ها به‌صورت سه‌تایی بـه همـراه یـک واکنـش بـدون الگـو[2] (NTC) و هم‌زمان در پلت ۹۶ چاهکی انجام گرفت و میانگین چرخه‌های آستانه (Ct) برای هر ژن در نظر گرفته شد. منحنی تکثیر ژن های BRCA1، BRCA2 و GAPDH نشان دادند که تکثیر به‌خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچ‌گونه پارازیتی صورت گرفته است (شکل ۱).

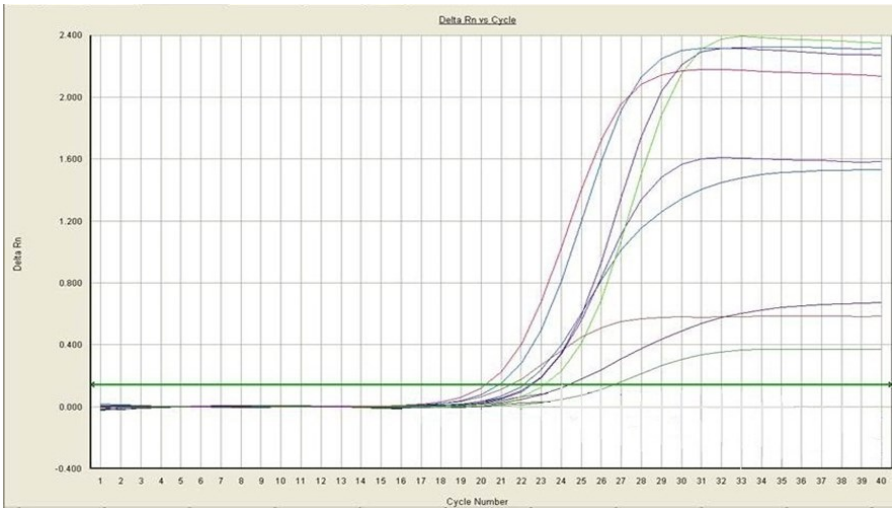
برای اطمینان از تولید قطعات اختصاصی و عدم وجود باندهای غیراختصاصی و ساختارهای ثانویه و دوتایی در محصولات Real-

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی طراحی‌شده ژن‌های BRCA1، BRCA2 و GAPDH

نام ژن‌ها	شماره ثبت ژن در بانک جهانی ژن	توالی پرایمر	اندازه (bp)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	کارایی واکنش تکثیر
BRCA1	NM_007294.3	Forward :ATGGATTTATCTGCTCTTCGCG reverse: GGTCACACTTTGTGGAGACAGG	۱۲۱	۵۷	۹۱
BRCA2	NM_000059.3	f: GGATCCAAAGAGAGGCCAAC r: GGTTCAGAATTATAGGGTGGAGC	۱۲۸	۵۸	۹۶
GAPDH	NM_002046.5	f: GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA r:GTAGTTGAGGTCAATGAAGGGG	۱۲۱	۵۷	۱۰۰

[1]: SYBR Green, [2]: No Template Control

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 211-220

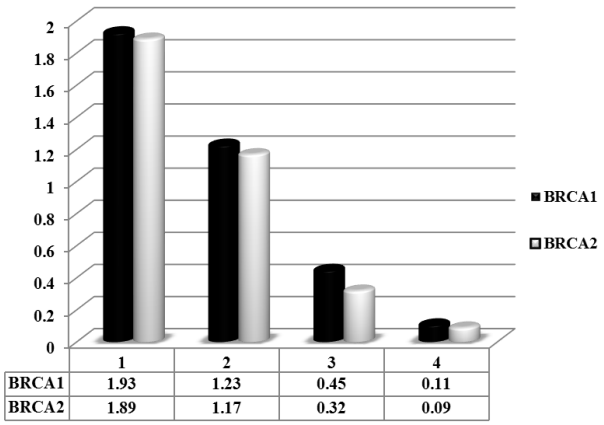


شکل ۱: منحنی تکثیر محصولات ژن BRCA1

time PCR منحنی ذوب رسم شد. پس از انجام واکنش تکثیر به روش Relative Quantitative Real-time PCR داده‌های خام به‌صورت Ct از دستگاه استخراج شد و تجزیه‌وتحلیل Ctها با استفاده از نرم‌افزار SDS ABI 7500 آنالیز شد. همچنین برای اطلاع از افزایش و کاهش بیان ژن های موردنظر از نرم افزار REST 2009 استفاده گردید. تجزیه وتحلیل آماری داده ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمون دانکن در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. حداقل میانگین مربعات گزارش شد. همچنین اندازه گیری میزان بیان ژن های موردنظر از روش پفافل [۱۸] با استفاده از راندمان کارایی واکنش تکثیر تصحیح‌شده، موردبررسی قرار گرفتند. راندمان کارایی واکنش تکثیر هر یک از واکنش‌ها به‌طور اختصاصی و با استفاده از نرم‌افزار LinReg محاسبه و در معادله مورداستفاده قرار گرفت. همچنین در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج این بررسی نشان داد بیان ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در تیمارهای دریافت‌کننده آفلاتوکسین B1 با غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرو لیتر در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۰۰۱$) که این کاهش بیان با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 چشمگیر بود. (جدول ۲ و نمودار ۱)



	1	2	3	4
BRCA1	1.93	1.23	0.45	0.11
BRCA2	1.89	1.17	0.32	0.09

نمودار ۱: کاهش بیان دو ژن BRCA1 و BRCA2 با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 چشمگیر بود.

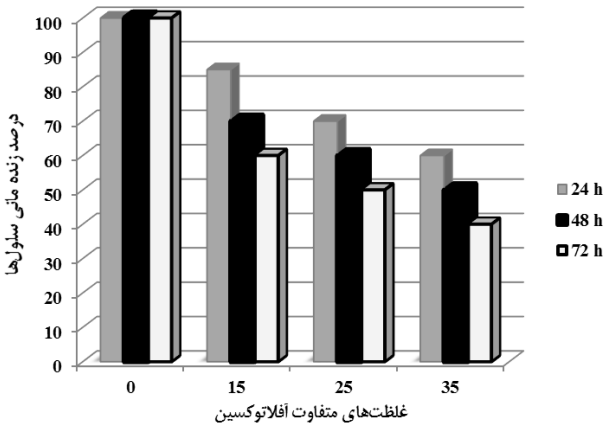
جدول ۲: SEM میانگین خطای استاندارد؛ در هر ردیف اعدادی که با حروف متفاوت نشان داده‌شده‌اند، اختلاف معنی‌داری دارند. تیمار ۱: آفلاتوکسین B1 با غلظت µL ۱۵، تیمار ۲: آفلاتوکسین B1 با غلظت µL ۲۵ و تیمار ۳: آفلاتوکسین B1 با غلظت µL ۳۵. مقادیر بیان ژن برای هر تیمار با روش Pfaffl (۲۰۰۱) نرمال‌سازی شده است.

ژن‌ها	تیمارهای آزمایشی				SEM	P-Value
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳		
BRCA1	۱/۹۳^{a}	۱/۲۳^{b}	۰/۴۵^{c}	۰/۱۱^{d}	۰/۰۷	< ۰/۰۰۰۱
BRCA2	۱/۸۹^{a}	۱/۱۷^{b}	۰/۳۲^{c}	۰/۰۹^{d}	۰/۰۴	< ۰/۰۰۰۱

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۲۰-۲۱۱

نتایج MTT:

نتایج MTT تست نشان داد سم آفلاتوکسین B1 سبب کاهش معنی‌داری در قدرت زنده‌مانی سلول‌ها شد که این کاهش با افزایش غلظت سم و مدت قرار گرفتن در معرض سم افزایش نشان داد (نمودار ۲).



نمودار ۲: نتایج MTT تست سلول‌های اپیتلیال پستان با سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرو لیتری سم آفلاتوکسین B1 در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

بحث و نتیجه‌گیری

ازآنجایی که در کشورهای درحال توسعه، کنترل مطلوبی روی مواد غذایی ازنظر وجود مایکوتوکسین ها اعمال نمی شود [۱۹] آلـوده شدن مواد غذایی به مایکوتوکسین ها می تواند اثـرات مخربی بر روی ارگان‌های بـدن ایجاد کند. بسیاری از دانه‌های غلات، میوه‌ها، سبزیجات، لبنیات و دیگر مواد خوراکی قابلیت آلوده شدن با مایکوتوکسین را دارا می باشند؛ بنابراین احتمال مصرف مایکوتوکسین‌ها در هر نوع غذای انسان وجود دارد [۲۰]. بر اساس تحقیقی که شرکت بایومین (BIOMIN) آلمان در طول مدت سه ماه از ژانویه تا مارس ۲۰۱۰ بر روی ۱۷۹۰ نمونه از تولیدات غذایی در کل دنیا انجام داد، ۳۳ درصد نمونه ها آلوده به آفلاتوکسین گزارش شد. آفلاتوکسین B1 به عنوان یکی از قوی ترین مواد سرطان‌زا شناخته می‌شود [۷ و ۳]. این ترکیب بسیار سمی می‌تواند از طریق غذاهای آلوده به بدن انسان منتقل شود و درنهایت از طریق جریان خون به بافت‌های مختلف بدن ازجمله بافت پستان نفوذ کند [۸]. از شناخته‌شده‌ترین ژن‌های مؤثر در جلوگیری از بروز سرطان پستان BRCA1 و BRCA2 است که این ژن‌ها به‌طور طبیعی ساخت پروتئین ها و آنزیم هایی را کد می کنند که توانایی ترمیم DNA صدمه دیده را دارند. DNA همه سلول ها تحت استرس شدید عوامل اندوژنیک (دآمیناسیون سیتوزین، اکسیژن‌های فعال و غیره) و اگزوژنیک (اشعه ماورایی بنفش و انواع توکسین‌ها) قرار دارد [۲۱] که این استرس‌ها سبب آسیب DNA دو رشته‌ای می‌شوند که در صورت عدم تعمیر، این آسیب‌ها می‌توانند برای سلول خطرناک باشند و سبب نقص در مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی از قبیل حذف، انواع جابه‌جایی و سرطان شوند [۲۲]. در حالت طبیعی سلول‌ها بسیاری از این آسیب‌ها را با استفاده از دو مسیر بیولوژیکی NHEJ[1] و HR که دو ژن BRCA1 و BRCA2 در آن نقش کلیدی بازی می کنند خنثی می کند [۸]. فعالیت‌هایی که به BRCA2 نسبت داده می‌شود شامل ترمیم همانندسازی DNA و رونویسی، تغییر الگوی کروماتین، دو برابر شدن سانتروزوم و سیتوکینز می باشد [۲۳]. یافته های متقاعدکننده ای وجود دارد که نشان می دهد BRCA1 نقش اساسی‌تری در روند ترمیم دارد [۲۴] و از این طریق سبب جلوگیری از رشد تومورها می‌شود به‌طوری‌که تحقیقات نشان می‌دهد افزایش بیان ژن BRCA1 باعث القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور می‌شود و بیان پایین BRCA1 در بروز سرطان پستان و حتی سایر سرطان ها ازجمله سرطان تخمدان نقش دارد [۲۶ و ۲۵]. کیان و همکاران ۲۰۱۱ گزارش کردند، بیان پایین BRCA1 تقریباً در ۳۰ درصد از سرطان های پستان تک گیر و ۷۰ درصد از سرطان های تخمدان مشاهده شده است [۲۷]. مارجلی و همکاران ۲۰۱۰ نیز گزارش کردند که سطح بیان ژن BRCA1 در سرطان‌های تک‌گیر نسبت به بافت نرمال پایین‌تر می باشد و ارتباطات معنی دار میان سطح بیان ژن BRCA1 و رشد تومور وجود دارد به نحوی که کاهش بیان این ژن با افزایش رشد تومور مرتبط بوده است [۲۳]. تعداد زیادی مشاهدات و یافته های دیگر نیز وجود دارد که نشان می‌دهد بیان ژن BRCA1 در سرطان پستان بسیار ضعیف و در برخی موارد نزدیک به صفر بوده است [۳۰-۲۸]. در برخی از پژوهش‌ها آفلاتوکسین B1 باعث آسیب شدید DNA به‌عنوان یک عامل اگزوژنی گزارش‌شده است [۳۲ و ۳۱]. تحقیقات نشان می‌دهد آفلاتوکسین B1 در تقابل با DNA می توانند از نسخه برداری DNA توسط RNA پلیمراز ممانعت کرده و باعث جلوگیری از

[1]: Non-Homologous End-Joining

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 211-220

سنتز mRNA و درنهایت ساخت پروتئین شود [۳۳]. همچنین در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های کبدی با اثر مستمر آفلاتوکسین، تغییر مورفولوژی هسته، کاهش در بیوسنتز پروتئین، اثر متقابل با DNA، جلوگیری از سنتز DNA و کاهش سنتز RNA مشاهده شد[۳۴]. همچنین نتایج حاصل از تست امز[1] مشخص کرده است که آفلاتوکسین B1 نسبت به سایر آفلاتوکسین ها دارای بیشترین فعالیت جهش‌زایی می‌باشد [۳۷-۳۵]. فروهرمهر و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادن آفلاتوکسین B1 به‌عنوان یک عامل اندوژنیک می‌تواند با تأثیر بر بیان ژن مؤثر در تمایز سلول‌های اپیتلیال پستان در ایجاد سرطان پستان نقش داشته باشد همچنین آن‌ها نشان دادند که این سم می تواند با تأثیر بر میزان قدرت زنده مانی سلول و مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول، در ایجاد سرطان پستان نقش داشته باشد [۳۸ و ۸]. در تحقیقی که بالدی و همکاران ۲۰۱۰ انجام دادند ۶ تیمار از اوکراتوکسین A به ترتیب با غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر را بر روی لاین سلولی BME-UV1 مورد بررسی قراردادند و مشاهده کردند که از غلظت ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به بالا مرگ سلولی رخ می‌دهد و میزان قطعه‌قطعه شدن DNA نیز افزایش می‌یابد [۳۹] لگاتور ۱۹۹۶ تأثیر چهار غلظت سم آفلاتوکسین (مجموع آفلاتوکسین ها، B1، B2، G1، G2) به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و یک ppm را در مقایسه با گروه کنترل بر روی سلول‌های اپیتلیال ریه مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد با افزایش غلظت سم میزان مرگ سلولی و میزان قطعه‌قطعه شدن DNA افزایش می‌یابد [۴۰]. همچنین در برخی تحقیقات مشاهده شد که تغذیه کردن موش‌ها با جیره غذایی حاوی ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین B1 طی ۳۷۰ روز سبب ایجاد غدد سرطانی همراه با خونریزی و مرگ بافت شده است. برخی محققان سرطان زایی آفلاتوکسین B1 را در بسیاری از حیوانات ازجمله ماهی، موش صحرایی، موش، سنجاب، میمون و هامستر مورد آزمایش قراردادند که در این پژوهش‌ها بسیاری از سرطان‌ها و تومورهای سرطانی مشاهده شد که ازجمله آن‌ها می‌توان به سرطان کبد در موش، ماهی، سنجاب، موش صحرایی، هامستر و میمون، سرطان کولون و کلیه در موش، سرطان کولون در هامستر، سرطان ریه در موش صحرایی و سارکوم استخوان، سرطان مثانه و سرطان پانکراس در میمون اشاره کرد [۴۱] که به نظر می‌رسد علت تشکیل تمامی این تومورها می تواند اختلال در مرگ برنامه ریزی شده سلول‌ها، ناشی از حضور آفلاتوکسین B1 باشد. با توجه به مطالب گفته شده و نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می رسد حضور آفلاتوکسین B1 در مواد غذایی و درنهایت ورود آن به بدن می‌تواند با کاهش بیان ژن های سرکوبگر تومور و همچنین ایجاد ناهنجاری هایی مانند انحرافات و شکسته شدن کروموزوم ها، کروماتیدها و آسیب به DNA به‌عنوان یک عامل اندوژنیک، خطر ابتلا به سرطان را افزایش دهد. از طرف دیگر با توجه به نتایج حاصل از MTT تست و تأیید کاهش قدرت زنده‌مانی سلول‌ها، به نظر می‌رسد این سم می‌تواند بر مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلول‌ها نیز تأثیرگذار باشد و از این طریق خطر ابتلا به سرطان را دوچندان کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دکتر امیرحسن زرنانی رئیس پژوهشکده نانو بیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا و خانم هاله عدالت‌خواه مسئول آزمایشگاه Real time PCR آن پژوهشکده، جهت فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و توصیه‌های فنی و تکنیکی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Gao SS, Chen XY, Zhu RZ, Choi BM, Kim SJ, Kim BR. Dual effects of phloretin on aflatoxin B1 metabolism: activation and detoxification of aflatoxin B1. Biofactors 2012;38: 34-43.
2. Hanioka N, Nonaka Y, Saito K, Negishi T, Okamoto K, Kataoka H, et al. Effect of aflatoxin B1 on UDP-glucuronosyltransferase mRNA expression in HepG2 cells. Chemosphere 2012; 89: 526-9.
3. Jeannot E, Boorman GA, Kosyk O, Bradford BU, Shymoniak S, Tumurbaatar B, et al. Increased incidence of aflatoxin B1-induced liver tumors in hepatitis virus C transgenic mice. Int J Cancer 2012; 130: 1347-56.
4. Josse R, Dumont J, Fautrel A, Robin MA, Guillouzo A. Identification of early target genes of aflatoxin B1 in human hepatocytes, inter-individual variability and comparison with other genotoxic compounds. Toxicol Appl Pharmacol 2012; 258: 176-87.
5. Kabak B, Ozbey F. Aflatoxin M 1 in UHT milk consumed in Turkey and first assessment of its bioaccessibility using an in vitro digestion model. Food Control 2012; 28: 338-44.

1: Ames

6. Kabak B. Aflatoxin M 1 and ochratoxin A in baby formulae in Turkey: Occurrence and safety evaluation. Food Control 2012; 26: 182-7.
7. Bianco G, Russo R, Marzocco S, Velotto S, Autore G, Severino L. Modulation of macrophage activity by aflatoxins B1 and B2 and their metabolites aflatoxins M1 and M2. Toxicon 2012; 59: 644-50.
8. Forouharmehr A, Harkinezhad T, Qasemi-Panahi B. Effect of Aflatoxin B1 on Growth of Bovine Mammary Epithelial Cells in 3D and Monolayer Culture System. Adv Pharm Bull 2013; 3: 143-6.
9. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 2001; 27: 247-54.
10. Ohnishi T, Mori E, Takahashi A. DNA double-strand breaks: their production, recognition, and repair in eukaryotes. Mutat Res 2009; 669: 8-12
11. Tirkkonen M, Johannsson O, Agnarsson BA, Olsson H, Ingvarsson S, Karhu R, et al. Distinct somatic genetic changes associated with tumor progression in carriers of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations. Cancer Res 1997; 57: 1222-7.
12. Patel KJ, Yu VP, Lee H, Corcoran A, Thistlethwaite FC, Evans MJ, et al. Involvement of Brca2 in DNA repair. Mol cell 1998; 1: 347-57.
13. Gretarsdottir S, Thorlacius S, Valgardsdottir R, Gudlaugsdottir S, Sigurdsson S, Steinarsdottir M, et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. Cancer res 1998; 58: 859-62.
14. Xu X, Weaver Z, Linke SP, Li C, Gotay J, Wang XW, et al. Centrosome amplification and a defective G2-M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. Mol cell 1999; 3: 389-95.
15. O'Donovan PJ, Livingston DM. BRCA1 and BRCA2: breast/ovarian cancer susceptibility gene products and participants in DNA double-strand break repair. Carcinogenesis 2010; 31: 961-7.
16. Caruso M, Mariotti A, Zizzadoro C, Zaghini A, Ormas P, Altafini A, et al. A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1. Toxicon 2009; 53: 400-8.
17. Vandesompele J, De Paepe A, Speleman F. Elimination of primer-dimer artifacts and genomic coamplification using a two-step SYBR green I real-time RT-PCR. Anal Biochem 2002; 303: 95-8.
18. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29: e45.
19. Strosnider H, Azziz-Baumgartner E, Banziger M, Bhat RV, Breiman R, Brune MN, et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. Environ Health Perspect 2006; 114: 1898-903.
20. Binder EM. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. Anim Feed Sci Tech 2007; 133: 149-66.
21. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. Nat Genet 2001; 27: 247-54.
22. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature 2009; 461: 1071-8.
23. Margeli M, Cirauqui B, Castella E, Tapia G, Costa C, Gimenez-Capitan A, et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. PLoS One 2010; 5: e9499.
24. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. Oncogene 2006; 25: 5864-74.
25. Yarden RI, Papa MZ. BRCA1 at the crossroad of multiple cellular pathways: approaches for therapeutic interventions. Molecular cancer therapeutics 2006; 5: 1396-404.
26. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. Nat Genet 1995; 9: 444-50.
27. Qian XP, Liu BR, Jiang M, Hu J, Yu LX, Wang LF, et al. [Relationship between BRCA1 mRNA expression in tumor cells from malignant effusions and chemosensitivity to cisplatin in patients with metastatic malignant effusions]. Zhonghua zhong liu za zhi [Chinese journal of oncology] 2011; 33: 457-60. (Chinese)
28. Jacquemier J, Eisinger F, Birnbaum D, Sobol H. Histoprognostic grade in BRCA1-associated breast cancer. Lancet 1995; 345: 1503.
29. Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, Sloane JP, Anderson TJ, van de Vijver MJ, et al. The pathology of familial breast cancer: histological fea-

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 211-220

tures of cancers in families not attributable to mutations in BRCA1 or BRCA2. Clin Cancer Res 2000; 6: 782-9.

30. Wilson CA, Ramos L, Villasenor MR, Anders KH, Press MF, Clarke K, et al. Localization of human BRCA1 and its loss in high-grade, non-inherited breast carcinomas. Nat Genet 1999; 21: 236-40.

31.Hartlerode AJ, Scully R. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. Biochem J 2009; 423: 157-68.

32.Partanen HA, El-Nezami HS, Leppanen JM, Myllynen PK, Woodhouse HJ, Vahakangas KH. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. Toxicol Sci 2010; 113: 216-25.

33.Bbosa GS, Lubega A, Kyegombe DB, Kitya D, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW. Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. In: Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects. Translated by Razzaghi-Abyaneh M. 1st ed. InTech 2013; 242-5.

34.Liu R, Jin Q, Huang J, Liu Y, Wang X, Zhou X, et al. In vitro toxicity of aflatoxin B1 and its photodegradation products in HepG2 cells. J Appl Toxicol 2012; 32: 276-81.

35.Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000; 455: 29-60.

36.Rustom IY. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. Food chemistry 1997; 59: 57-67.

37.Richard J, Payne G, eds, Desjardins A, Maragos C, Norred W, Pestka J. Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. CAST Task Force Report 2003; 139: 101-3.

38.Forouharmehr A, Harkinezhad T, Qasemi-Panahi B. Evaluation of STAT5A Gene Expression in Aflatoxin B1 Treated Bovine Mammary Epithelial Cells. Adv Pharm Bull 2013; 3: 461-4.

39.Baldi A, Losio MN, Cheli F, Rebucci R, Sangalli L, Fusi E, et al. Evaluation of the protective effects of alpha-tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity. Br J Nutr 2004; 91: 507-12.

40.Legator M. Biological effects of aflatoxin in cell culture. Bacteriol Rev 1966; 30: 471.

41.Bbosa GS, Lubega A, Kyegombe DB, Kitya D, Ogwal-Okeng J, Anokbonggo WW. Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. In: Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects. Translated by Razzaghi-Abyaneh M. 1st ed. InTech 2013, 246-7.

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۲۰-۲۱۱