

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

ABSTRACT

Saeedeh Moradi¹Hamzeh Azari¹Iraj Jafari Anarkooli²Babak Qasemi- Panahi³Somayeh Elhami⁴Ali Forouharmehr^{5*}

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

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

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

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

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

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 25cm² (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

*Corresponding Author:

Ali Forouharmehr

Tel: (+98)9165648473

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

تأثیر آفاتوکسین B1 بر بیان ژن های 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

چکیده

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: (+۹۸)۹۱۶۵۶۴۸۴۷۳

پست الکترونیک:

Ali.Forouharmehr@stu.um.ac.ir

مقدمه: آفاتوکسین ها ترکیباتی سرطان زا هستند که توسط قارچ های *Aspergillus flvaus* و *A. parasiticus* تولید می شوند. در میان آفاتوکسین های شناخته شده سرطان زایی آفاتوکسین B1 بیشتر از سایر آفاتوکسین ها می باشد. این سم می تواند با آلوده کردن مواد غذایی وارد بدن انسان و در نهایت بافت پستان شود. دو ژن مؤثر در سرکوب تومور در پستان، ژن های BRCA1 و BRCA2 می باشند که بیان این ژن ها می تواند توسط آفاتوکسین B1 تحت تأثیر قرار گیرد.

مواد و روش ها: به منظور بررسی تأثیر آفاتوکسین B1 بر بیان ژن های BRCA1 و BRCA2، رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی (HMEC) به صورت تک لایه کشت داده شد. ۱۰ روز پس از کشت تک لایه و رسیدن به تعداد سلول مناسب، سلول ها به منظور اعمال تیمارها به ۱۶ فلاسک 25 cm^2 (چهار تیمار هر کدام چهار تکرار) پاساژ داده شد. بعد از رشد سلول ها، سه تیمار ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرولیتری آفاتوکسین B1 به فلاسک ها اضافه گردید. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها سلول ها به منظور استخراج RNA، تبدیل به cDNA و انجام Real time PCR از فلاسک ها جدا شدند. به منظور بررسی قدرت زنده مانگی سلول ها MTT تست صورت گرفت.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد هر سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرولیتری سم سبب کاهش بیان ژن های BRCA1 و BRCA2 می شود ($P < 0.001$). همچنین نتایج MTT تست نیز نشان داد قدرت زندمانی سلول ها با افزایش غلظت سم و مدت زمان تماس با سم کاهش می یابد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج حاصله به نظر می رسد آفاتوکسین B1 با کاهش بیان ژن های BRCA1 و BRCA2 می تواند خطر ابتلا به سرطان پستان را افزایش دهد.

کلید واژه ها: آفاتوکسین B1، پروتئین BRCA1، پروتئین BRCA2، real-time Polymerase chain reaction.

مقدمه

مهم ترین آن ها هستند. آفاتوکسین ها 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 می شوند. این ترکیبات به عنوان عوامل سرطان زا، جهش زا، ناقص الخلقه زا و تضعیف کننده سیستم ایمنی شناخته

مایکوتوکسین ها به عنوان یکی از بارزترین آلوده کننده های مواد غذایی که بهداشت عمومی، امنیت غذایی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می دهد مورد بررسی قرار می گیرند در میان مایکوتوکسین ها، آفاتوکسین ها

مواد روش‌ها

کشت سلول:

به منظور انجام این تحقیق رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی^۱ (HMEC) از شرکت GIBCO خریداری شد. سپس سلول‌ها در دمای °C ۳۷ و حضور ۵ درصد CO₂ و میزان رطوبت ۹۵ درصد با محیط کشت نرمال شامل ۱۰ درصد FBS^۲، ۸۸ درصد DMEM f12^۳، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین و ۱ درصد ضد قارچ آمفوتریسین B برای رسیدن به تعداد سلول مورد نیاز برای اعمال تیمارها به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند [۸]. بعد از گذشت ۱۰ روز از کشت اولیه و رسیدن به تعداد سلول مناسب به منظور پاساژ سلولی، سلول‌ها به ۱۶ فلاسک ۲۵ cm^۲ پاساژ داده شدند. با گذشت 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 فلاسک‌های کشت اضافه گردید، ۴ فلاسک هم به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تست MTT^۴:

به منظور 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 به صورت 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 به عنوان گروه کنترل بدون اعمال سم در نظر گرفته شد) و به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ در انکوباتور با دمای °C ۳۷ 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 °C ۳۷ و غلظت ۵ درصد CO₂ قرار گرفت. بعد از گذشت ۴ ساعت محیط کشت قبلی خارج گردید و میزان ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO^۵ به همراه ۲۵ میکرو لیتر بافر سورنسون (۰/۱ M گالاسین، ۰/۱ M NaCl، PH ۱۰/۵) به خانه‌ها اضافه شد و در نهایت سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای حل شدن کریستال فورمازان به منظور جذب اشعه UV در طول موج ۵۷۰ نانومتر در °C ۳۷ و میزان ۵٪ CO₂ انکوبه شدند، در نهایت میزان

می‌شوند [۵-۱] از میان ۱۸ نوع مختلف آفلاتوکسین شناخته شده، آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1، G2 توسط آژانس بین‌المللی تحقیق روی سرطان (IARC)^۱ در گروه A عوامل سرطان زا قرار گرفته‌اند که در این میان سمیت و سرطان‌زایی آفلاتوکسین B1 بیشتر از انواع دیگر گزارش شده است [۶ و ۷] این ترکیب بسیار سمی می‌تواند از طریق غذاهای آلوده به ویژه لبنیات و خشکبار به بدن انسان منتقل شود و در نهایت از طریق جریان خون در بافت‌های مختلف بدن از جمله بافت پستان حضور پیدا کند [۸]. مشهورترین ژن‌های مؤثر در جلوگیری از بروز سرطان پستان BRCA1^۲ و BRCA2^۳ است. ژن‌های BRCA1 و BRCA2 به ترتیب بر روی کروموزوم ۲۱-۱۲ q ۱۷ و ۱۳-۱۲ q ۱۳ انسان قرار دارند و جز ژن‌های مرسوم سرکوبگر تومور به شمار می‌آیند، این دو ژن نقش بسیار مؤثری در ترمیم آسیب‌های DNA ناشی از عوامل اگزوژنیک (انواع سموم و اشعه ماورای بنفش) و اندوژنیک (دامیناسیون ستوزین، انواع اکسیژن فعال و غیره)، کنترل چرخه سلولی و تقسیم میتوز را بازی می‌کنند [۹ و ۱۰] 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)^۴ دارند می‌تواند با الگو قرار دادن کروماتید خواهری سالم اقدام به ترمیم بخش آسیب دیده DNA نمایند به طوری که کاهش بیان این دو ژن و یا حتی جهش در بخشی از آن‌ها می‌تواند منجر به بروز ناپایداری شدید ژنومی و در نهایت 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 پرداخته شده است.

جذب نوری هر خانه که معیاری از زنده ماندن سلول‌ها می‌باشند، با دستگاه ELISA reader در طول موج 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 استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ از روی نسبت طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر تعیین گردید. البته کیفیت RNA بر روی ژل آگارز یک درصد نیز مورد بررسی قرار گرفت. RNA استخراج شده برای مراحل بعدی در دمای °C ۸۰- نگهداری گردید. برای انجام مرحله نسخه برداری معکوس و ساخت cDNA طبق دستورالعمل کیت BiONEER(Korea)، ۱۹ میکرو لیتر از RNA به همراه ۱ میکرو لیتر اولیگودیتی با الگوی دمایی °C ۳۰ به مدت پنج دقیقه، °C ۶۰ به مدت ۶۰ دقیقه و °C ۹۵ به مدت پنج دقیقه استفاده شد.

تکثیر ژن‌های مورد نظر برای اندازه گیری بیان ژن توسط واکنش Real time PCR بر اساس روش استاندارد به صورت نسبی انجام گرفت. تعیین کمیت نسبی در Real time PCR به وسیله اندازه گیری افزایش تشعشع فلورسانس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین^۱ با استفاده از دستگاه ABI ۷۵۰۰ صورت گرفت [۱۷]. در اجرای واکنش Real time PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر غلظت نهایی مواد، به طور خلاصه شامل: ۱۲/۵ میکرو لیتر سایبرگرین (BiONEER) به همراه یک میکرو لیتر از هر کدام 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 ساخته شده در

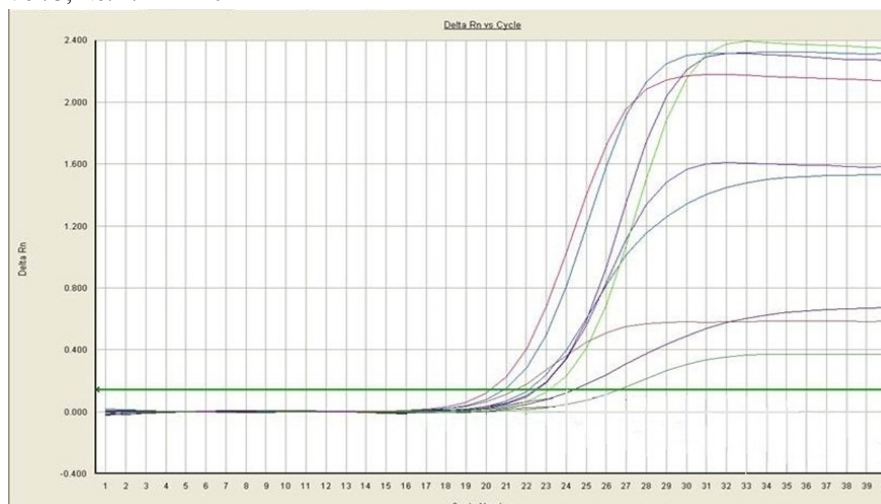
مرحله قبل به آن اضافه شد. پروفایل دمایی و شرایط معرف‌ها (شامل غلظت پرایمرها و غلظت کلرید منیزیم) برای تمام پرایمرها مورد آزمایش قرار گرفت. برنامه حرارتی برای تکثیر ژن‌های مورد نظر با استفاده از روش Real time PCR یکسان و شامل سه مرحله که عبارت است از: مرحله اول پیش واسرشتی سازی اولیه جهت فعال شدن آنزیم Taq DNA polymerase به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۹۵ و در مرحله دوم ۴۵ سیکل برای تکثیر شامل: ۱۵ ثانیه واسرشته سازی با دمای °C ۹۵، اتصال پرایمرها با دمای °C ۵۷ (برای پرایمر BRCA2 دمای °C ۵۸) به مدت یک دقیقه و در مرحله سوم به منظور رسم منحنی تفکیک یک چرخه شامل: واسرشته سازی ۱۵ ثانیه با دمای °C ۹۵، اتصال یک دقیقه با دمای °C ۶۰، واسرشت سازی ۱۵ ثانیه با دمای °C ۹۵ و ذوب ۱۵ ثانیه با °C ۶۰ انجام گردید. در این مرحله کاهش دما از °C ۹۵ به °C ۶۰ با سرعت ۰/۳ درجه سانتی گراد بر ثانیه انجام شد و حدود ۲۰ دقیقه به طول انجامید. طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن‌های 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 به صورت سه تایی به همراه یک واکنش بدون الگو^۲ (NTC) و هم‌زمان در پلت ۹۶ چاهکی انجام گرفت و میانگین چرخه‌های آستانه (Ct) برای هر ژن در نظر گرفته شد. منحنی تکثیر ژن‌های BRCA1، BRCA2 و GAPDH نشان دادند که تکثیر به خوبی و با عملکرد مناسب و بدون هیچ گونه 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 طراحی شده ژن‌های BRCA1، BRCA2 و GAPDH

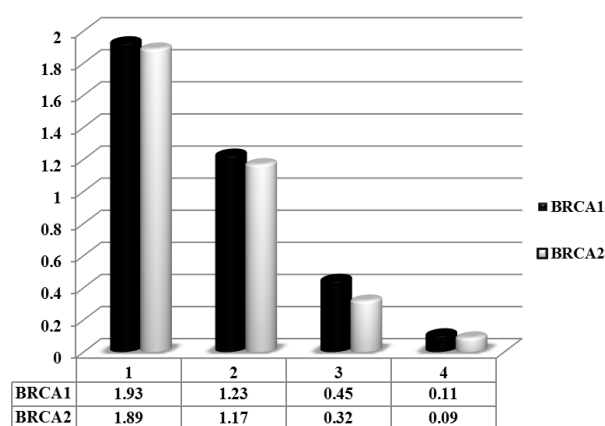
کارایی	دمای اتصال (درجه سانتی گراد)	اندازه (bp)	توالی پرایمر	شماره ثبت ژن در بانک جهانی ژن	نام ژن‌ها
۹۱	۵۷	۱۲۱	Forward :ATGGATTATCTGCTCTTCGCG reverse: GGTCACTTGTGGAGACAGG	NM_007294.3	BRCA1
۹۶	۵۸	۱۲۸	f: GGATCCAAAGAGAGGCCAAC r: GGTTCAGAATTATAGGGTGGAGC	NM_000059.3	BRCA2
۱۰۰	۵۷	۱۲۱	f: GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA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



شکل ۱: منحنی تکثیر محصولات ژن BRCA1

یافته‌ها

نتایج این بررسی نشان داد بیان ژن‌های BRCA1 و BRCA2 در تیمارهای دریافت‌کننده آفاتوکسین B1 با غلظت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرو لیتر در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی داری داشت ($P < 0.0001$) که این کاهش بیان با افزایش غلظت آفاتوکسین B1 چشمگیر بود. (جدول ۲ و نمودار ۱)



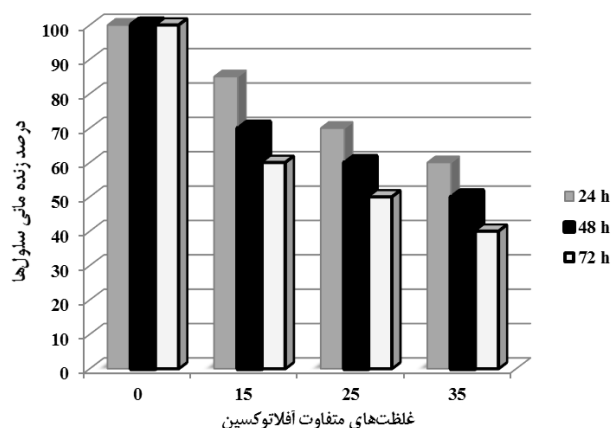
نمودار ۱: کاهش بیان دو ژن BRCA1 و BRCA2 با افزایش غلظت آفاتوکسین B1 چشمگیر بود.

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

P-Value	SEM	تیمارهای آزمایشی				ژن‌ها
		تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	
< 0.0001	0.07	0.11^d	0.45^c	1.23^b	1.93^a	BRCA1
< 0.0001	0.04	0.09^d	0.32^c	1.17^b	1.89^a	BRCA2

نتایج MTT:

نتایج MTT تست نشان داد سم آفاتوکسین B1 سبب کاهش معنی داری در قدرت زنده ماندی سلول ها 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 سلول های اپیتلیال پستان با سه غلظت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ میکرو لیتری سم آفاتوکسین B1 در سه بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که در کشورهای در حال توسعه، کنترل مطلوبی روی مواد غذایی از نظر وجود مایکوتوکسین ها اعمال نمی شود [۱۹] آلوده شدن مواد غذایی به مایکوتوکسین ها می تواند اثرات مخربی بر روی ارگان های بدن ایجاد کند. بسیاری از دانه های غلات، میوه ها، سبزیجات، لبنیات و دیگر مواد خوراکی قابلیت آلوده شدن با مایکوتوکسین را دارا می باشند؛ بنابراین احتمال مصرف مایکوتوکسین ها 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 آفاتوکسین گزارش شد. آفاتوکسین B1 به عنوان یکی از قوی ترین مواد سرطان زا شناخته می شود [۷ و ۳]. این ترکیب بسیار سمی می تواند از طریق غذاهای آلوده به بدن انسان منتقل شود و در نهایت از طریق جریان خون به بافت های مختلف بدن از جمله بافت پستان نفوذ کند [۸]. از شناخته شده ترین ژن های مؤثر در جلوگیری از بروز سرطان پستان BRCA1 و BRCA2 است که این ژن ها به طور

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، اکسیژن های فعال و غیره) و اگزوژنیک (اشعه ماورایی بنفش و انواع توکسین ها) قرار دارد [۲۱] که این استرس ها سبب آسیب DNA دو رشته ای می شوند که در صورت عدم تعمیر، این آسیب ها می توانند برای سلول خطرناک باشند و سبب نقص در مرگ برنامه ریزی شده سلول، ایجاد ناهنجاری های کروموزومی از قبیل حذف، انواع جابه جایی و سرطان شوند [۲۲]. در حالت طبیعی سلول ها بسیاری از این آسیب ها را با استفاده از دو مسیر بیولوژیکی 'NHEJ و HR که دو ژن BRCA1 و BRCA2 در آن نقش کلیدی بازی می کنند خنثی می کند [۸]. فعالیت هایی که به BRCA2 نسبت داده می شود شامل ترمیم همانندسازی DNA و رونویسی، تغییر الگوی کروماتین، دو برابر شدن سانتروم و سیتوکینز می باشد [۲۳]. یافته های متعادل کننده ای وجود دارد که نشان می دهد BRCA1 نقش اساسی تری در روند ترمیم دارد [۲۴] و از این طریق سبب جلوگیری از رشد تومورها می شود به طوری که تحقیقات نشان می دهد افزایش بیان ژن BRCA1 باعث القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور می شود و بیان پایین BRCA1 در بروز سرطان پستان و حتی سایر سرطان ها از جمله سرطان تخمدان نقش دارد [۲۶ و ۲۵]. کپان 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]. مارچلی و همکاران ۲۰۱۰ نیز گزارش کردند که سطح بیان ژن BRCA1 در سرطان های تک گیر نسبت به بافت نرمال پایین تر 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 می دهد بیان ژن BRCA1 در سرطان پستان بسیار ضعیف و در برخی موارد نزدیک به صفر بوده است [۳۰-۲۸]. در برخی از پژوهش ها آفاتوکسین B1 باعث آسیب شدید DNA به عنوان یک عامل اگزوژنی گزارش شده است [۳۲ و ۳۱]. تحقیقات نشان می دهد آفاتوکسین B1 در تقابل با DNA می تواند از نسخه برداری DNA توسط RNA پلیمراز ممانعت کرده و باعث جلوگیری از

تمامی این تومورها می تواند اختلال در مرگ برنامه ریزی شده سلول ها، 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 در نهایت ورود آن به بدن می تواند با کاهش بیان ژن های سرکوبگر تومور و همچنین ایجاد ناهنجاری هایی مانند انحرافات و شکسته شدن کروموزوم ها، کروماتیدها و آسیب به DNA به عنوان 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 زنده ماندی سلول ها، به نظر می رسد این سم می تواند بر مرگ برنامه ریزی شده سلول ها نیز تأثیرگذار باشد و از این طریق خطر ابتلا به سرطان را دوچندان کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دکتر امیرحسن زررانی رئیس پژوهشکده نانو بیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی ابن سینا و خانم هاله عدالت خواه مسئول آزمایشگاه Real time PCR آن پژوهشکده، جهت فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و توصیه های فنی و تکنیکی تشکر و قدرانی می شود.

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.

سنتز mRNA و در نهایت ساخت پروتئین شود [۳۳]. همچنین در مطالعه ای بر روی سلول های 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^۱ مشخص کرده است که آفلاتوکسین B1 نسبت به سایر آفلاتوکسین ها دارای بیشترین فعالیت جهش زایی می باشد [۳۷-۳۵]. فروهرمهر و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادن آفلاتوکسین B1 به عنوان یک عامل اندوژنیک می تواند با تأثیر بر بیان ژن مؤثر در تمایز سلول های اپیتلیال پستان در ایجاد سرطان پستان نقش داشته باشد همچنین آن ها نشان دادند که این سم می تواند با تأثیر بر میزان قدرت زنده ماندی سلول و مرگ برنامه ریزی شده 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 غلظت های 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 قرار دادند و مشاهده کردند که از غلظت ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر به بالا مرگ سلولی رخ می دهد و میزان قطعه قطعه شدن DNA نیز افزایش می یابد [۳۹] لگاتور ۱۹۹۶ تأثیر چهار غلظت سم آفلاتوکسین (مجموع آفلاتوکسین ها، B2، B1، G2، G1) به ترتیب ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و یک ppm را در مقایسه با گروه کنترل بر روی سلول های اپیتلیال ریه مورد بررسی قرار داد و مشاهده کرد با افزایش غلظت سم میزان مرگ سلولی و میزان قطعه قطعه شدن DNA افزایش می یابد [۴۰]. همچنین در برخی تحقیقات مشاهده شد که تغذیه کردن موش ها با جیره غذایی حاوی ۵ میلی گرم 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 از جمله ماهی، موش صحرایی، موش، سنجاب، میمون و هامستر مورد آزمایش قرار دادند که در این پژوهش ها بسیاری از سرطان ها و تومورهای سرطانی مشاهده شد که از جمله آن ها می توان 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 می رسد علت تشکیل

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 neo-adjuvant 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-

- 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.

