

## 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 Moradi<sup>1</sup>  
Hamzeh Azari<sup>1</sup>  
Iraj Jafari Anarkooli<sup>2</sup>  
Babak Qasemi- Panahi<sup>3</sup>  
Somayeh Elhami<sup>4</sup>  
Ali Forouharmehr<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>MSc, Animal physiology, Department of Animal science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Anatomical Sciences, Department of Anatomy, Zanjan university of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

<sup>3</sup>Assistant Professor of Animal Reproduction, Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>4</sup>MSc, Animal Genetics, Department of Animal Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

<sup>5</sup>Ph.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 25cm<sup>2</sup> (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 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

### چکیده

سعیده مرادی<sup>۱</sup>

حمزه آذری<sup>۱</sup>

ایرج جعفری انارکولی<sup>۲</sup>

بابک قاسمی پناهی<sup>۳</sup>

سمیه الهامی<sup>۴</sup>

علی فروهرمهر<sup>۵\*</sup>

<sup>۱</sup> کارشناس ارشد، فیزیولوژی دام، گروه علوم دامی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.  
<sup>۳</sup> استادیار، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، تبریز، ایران.  
<sup>۴</sup> کارشناسی ارشد ژنتیک دام، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.  
<sup>۵</sup> 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:** آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی سرطان‌زا هستند که توسط قارچ‌های *Aspergillus flvaus* و *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 در نهایت 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:** به منظور بررسی تأثیر آفلاتوکسین B1 بر بیان ژن‌های 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، سلول‌ها به منظور اعمال تیمارها به ۱۶ فلاسک ۲۵ cm<sup>۲</sup> (چهار تیمار هر کدام 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 به منظور استخراج RNA، تبدیل به cDNA و انجام Real time PCR از فلاسک‌ها جدا شدند. به منظور بررسی قدرت زندمانی 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 ( $P < 0/0001$ ). 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 ژن‌های 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.

مهم‌ترین آن‌ها هستند. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات سمی هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه به وسیله قارچ‌هایی چون *Aspergillus flvaus* و *A. parasiticus* به دنبال رشد روی اقلام غذایی تولید می‌شوند. این ترکیبات به‌عنوان عوامل سرطان‌زا، جهش‌زا، ناقص‌الخلقه‌زا و تضعیف‌کننده سیستم ایمنی شناخته

مایکوتوکسین‌ها به‌عنوان یکی از بارزترین آلوده‌کننده‌های مواد غذایی که بهداشت عمومی، امنیت غذایی و اقتصاد ملی بسیاری از کشورها به‌ویژه کشورهای در حال توسعه را تحت تأثیر قرار می‌دهد مورد بررسی قرار می‌گیرند در میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها

## مواد روش‌ها

کشت سلول:

به منظور انجام این تحقیق رده سلولی نرمال اپیتلیال پستان نوع انسانی<sup>۵</sup> (HMEC) از شرکت GIBCO خریداری شد. سپس سلول‌ها در دمای °C ۳۷ و حضور ۵ درصد CO<sub>2</sub> و میزان رطوبت ۹۵ درصد با محیط کشت نرمال شامل ۱۰ درصد FBS<sup>۶</sup>، ۸۸ درصد DMEM f12<sup>۷</sup>، 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<sup>۲</sup> 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 فلاسک‌های کشت اضافه گردید، ۴ فلاسک هم به‌عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد.

تست MTT<sup>۸</sup>:

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 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 به‌عنوان 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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> قرار گرفت. بعد از گذشت ۴ ساعت محیط کشت قبلی خارج گردید و میزان ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO<sup>۹</sup> به همراه ۲۵ میکرو لیتر بافر سورنسون (۰/۱ M گلاسن، ۰/۱ M NaCl، PH ۷/۵) به خانه‌ها اضافه شد و درنهایت سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه برای حل شدن کریستال فورمازان به‌منظور جذب اشعه UV در طول موج ۵۷۰ نانومتر در °C ۳۷ و میزان ۵٪ CO<sub>2</sub> انکوبه شدند، درنهایت میزان

می‌شوند [۵-۱] از میان ۱۸ نوع مختلف آفلاتوکسین شناخته شده، آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1، G2 توسط آژانس بین‌المللی تحقیق روی سرطان (IARC) 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 به‌ویژه لبنیات و خشکبار به بدن انسان منتقل شود و درنهایت 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<sup>۱</sup> و BRCA2<sup>۲</sup> است. ژن‌های BRCA1 و BRCA2 به ترتیب بر روی کروموزوم ۱۲-۲۱ 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 اگزوزژنیک (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)<sup>۴</sup> دارند می‌تواند 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 [۱۱-۱۴] مطالعات نشان می‌دهد که نقص در عملکرد BRCA1 در ابتدای ۸۰٪ درصد افراد بالای ۷۰ سال و نقص در عملکرد BRCA2 در ابتدای 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.

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 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 °C ۹۵ و در مرحله دوم °C 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 سانتی‌گراد 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 سه‌تایی به همراه یک واکنش بدون الگو<sup>۲</sup> (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 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-

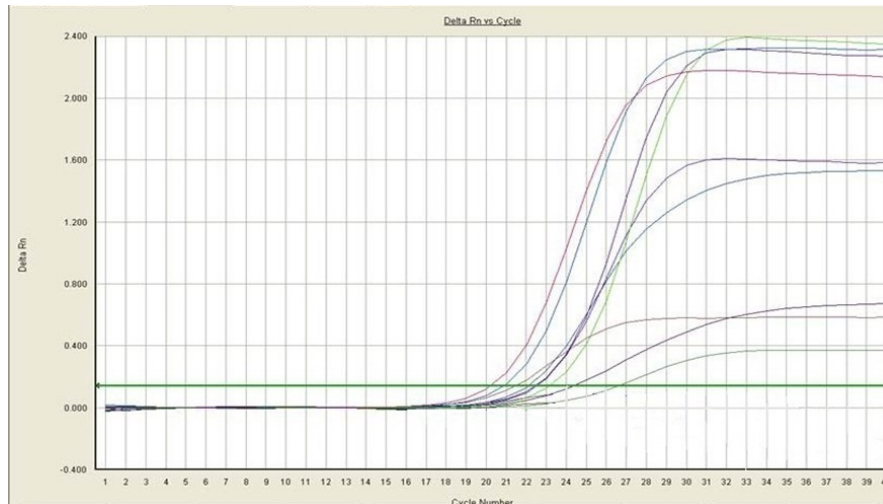
جذب نوری هر خانه که معیاری از زنده ماندن سلول‌ها می‌باشند، با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر ثبت گردید [۱۶].

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 نسخه‌برداری 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 موردنظر برای اندازه‌گیری 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 اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسانس در نتیجه اتصال رنگ سایبرگرین<sup>۱</sup> 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

جدول ۱: پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ژن‌های BRCA1، BRCA2 و GAPDH

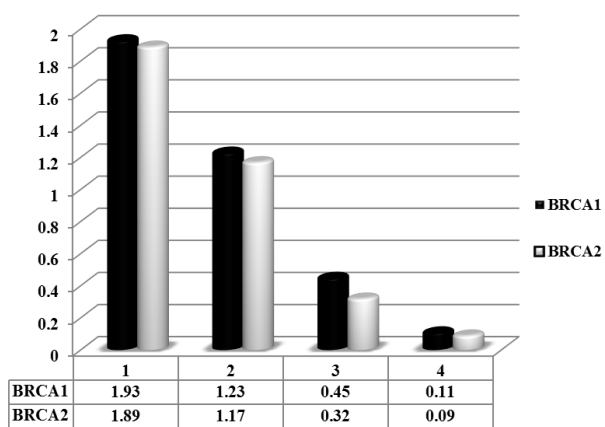
نام ژن‌ها	شماره ثبت ژن در بانک جهانی ژن	توالی پرایمر	دمای اتصال (درجه)		کارایی واکنش تکثیر
			اندازه (bp)	سانتی‌گراد)	
BRCA1	NM_007294.3	Forward :ATGGATTATCTGCTCTTCGCG reverse: GGTCACACTTGTGGAGACAGG	۱۲۱	۵۷	۹۱
BRCA2	NM_000059.3	f: GGATCCAAAGAGAGGCCAAC r: GTTTCAGAATTATAGGGTGGAGC	۱۲۸	۵۸	۹۶
GAPDH	NM_002046.5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



شکل ۱: منحنی تکثیر محصولات ژن BRCA1

## 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 معنی داری داشت ( $P < 0.0001$ ) که این کاهش بیان با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 چشمگیر بود. (جدول ۲ و نمودار ۱)



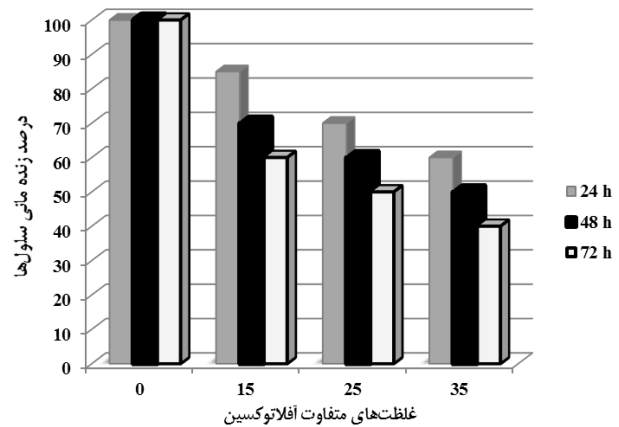
نمودار ۱: کاهش بیان دو ژن BRCA1 و BRCA2 با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 چشمگیر بود.

جدول ۲: SEM میانگین خطای استاندارد؛ در هر ردیف اعدادی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، اختلاف معنی داری دارند. تیمار ۱: آفلاتوکسین B1 با غلظت ۱۵  $\mu\text{L}$ ، تیمار ۲: آفلاتوکسین B1 با غلظت ۲۵  $\mu\text{L}$  و تیمار ۳: آفلاتوکسین B1 با غلظت ۳۵  $\mu\text{L}$  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	
$< 0.0001$	۰/۰۷	۰/۱۱ <sup>d</sup>	۰/۴۵ <sup>c</sup>	۱/۲۳ <sup>b</sup>	BRCA1
$< 0.0001$	۰/۰۴	۰/۰۹ <sup>d</sup>	۰/۳۳ <sup>c</sup>	۱/۱۷ <sup>b</sup>	BRCA2

نتایج MTT:

نتایج MTT تست نشان داد سم آفلاتوکسین B1 سبب کاهش معنی داری در قدرت زنده ماندن 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 ۲۵، ۳۵ و ۴۵ میکرو لیتری سم آفلاتوکسین 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 میکوتوکسین ها اعمال نمی شود [۱۹] آلوده شدن مواد غذایی به میکوتوکسین 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 میکوتوکسین را دارا می باشند؛ بنابراین احتمال مصرف میکوتوکسین 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 آفلاتوکسین گزارش شد. آفلاتوکسین 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 متقاعدکننده 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]. 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]. 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 آفلاتوکسین B1 باعث آسیب شدید DNA به عنوان یک عامل اگزوژنی گزارش شده است [۳۲ و ۳۱]. تحقیقات نشان می دهد آفلاتوکسین B1 در تقابل با DNA می تواند از نسخه برداری DNA توسط RNA پلیمرز ممانعت کرده و باعث جلوگیری از

تمامی این تومورها می‌تواند 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 می‌رسد حضور آفلاتوکسین B1 در مواد غذایی و در نهایت ورود آن به بدن می‌تواند با کاهش بیان ژن‌های سرکوبگر تومور و همچنین ایجاد ناهنجاری‌هایی مانند انحرافات و شکسته شدن کروموزوم‌ها، 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 زنده‌مانی سلول‌ها، به نظر می‌رسد این سم می‌تواند بر مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها نیز تأثیرگذار باشد و از این طریق خطر ابتلا به سرطان را دوچندان کند.

### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دکتر امیرحسن زرانی رئیس پژوهشکده نانو بیوتکنولوژی پژوهشگاه فناوری‌های 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 قدرانی می‌شود.

### منابع

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 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<sup>۱</sup> مشخص کرده است که آفلاتوکسین B1 نسبت به سایر آفلاتوکسین‌ها دارای بیشترین فعالیت جهش‌زایی می‌باشد [۳۷-۳۵]. فروهرمهر و همکاران ۲۰۱۳ نشان دادن آفلاتوکسین B1 به عنوان 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 می‌تواند با تأثیر بر میزان قدرت زنده‌مانی سلول و مرگ برنامه‌ریزی 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 غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۱۵، ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را بر روی لاین سلولی BME-UV1 مورد بررسی قرار دادند 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 آفلاتوکسین‌ها، 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 سرطان‌زایی آفلاتوکسین B1 را در بسیاری از حیوانات از جمله ماهی، موش صحرائی، موش، سنجاب، میمون و هامستر مورد آزمایش قرار دادند که در این پژوهش‌ها بسیاری از سرطان‌ها و تومورهای سرطانی مشاهده شد که از جمله آن‌ها می‌توان به سرطان کبد در موش، ماهی، سنجاب، موش صحرائی، هامستر و میمون، سرطان کولون و کلیه در موش، سرطان کولون در هامستر، سرطان ریه در موش صحرائی و سارکوم استخوان، سرطان مثانه و سرطان پانکراس در میمون اشاره کرد [۴۱] که به نظر می‌رسد 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 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. Histoprognotic 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. 1<sup>st</sup> 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. 1<sup>st</sup> ed. InTech 2013, 246-7.

