مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۲۷/هفته اول اردیبهشت ماه ۱۳۹۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۲/۱۵

# ارتباط بین حضور توالی ویروس تومور پستان موش در بافت پستان و ابتلای به سرطان پستان در زنان ایرانی

سید شروین شریعت پناهی[۱]، دکتر محمد سلیمانی درجاق[۲]، دکتر رسول صالحی[۳]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** ویروس تومور پستان موش (Mouse mammary tumor virus یا MMTV) یک عامل پیشرفت تومورهای پستان در موش‌ها می‌باشد. مطالعات حضور توالی‌هایی مشابه سکانس‌های ویروسی MMTV را در نمونه‌های سرطان پستان در انسان نشان داده‌اند، اما به دلیل حضور رتروویروس‌های اندوژن انسانی (Human endogenous retroviruses یا HERVs)، نقش این ویروس هرگز به عنوان عامل تأثیرگذار در بروز سرطان پستان به اثبات نرسیده است. در این مطالعه، اثر MMTV بر سرطان پستان بررسی شد. برای غلبه بر تشابه توالی MMTV با وجود توالی‌های اندوژن، توالی‌هایی از ژن MMTV-ENV که همولوژی خیلی پایینی به HERV-Ks یا به هر ژن انسانی دیگری دارند، انتخاب شدند.

**روش‌ها:** تحقیق حاضر به صورت مورد- شاهدی انجام شد. ابتدا DNA از ۵۹ بافت توموری و شاهد سالم موجود در بلوک‌های پارافینی استخراج گردید. سپس از روش Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) برای یافتن توالی‌های DNA مشابه سکانس‌های env ویروس MMTV استفاده شد.

**یافته‌ها:** توالی‌های DNA مشابه سکانس‌های env ویروس MMTV در ۱۹ نمونه (۳۲/۲ درصد) از ۵۹ نمونه‌ی سرطان پستان یافت شدند، در صورتی که این توالی‌ها تنها در ۳ نمونه‌ی بافت سالم پستان (۵ درصد) مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$).

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج به دست آمده، MMTV می‌تواند یکی از عوامل خطر مهم برای ایجاد سرطان پستان در بیماران ایرانی محسوب شود. تعیین توالی محصول PCR نشان داد که این توالی‌ها ۹۹ درصد با MMTV سویه‌ی موشی BR6 و ۱۰۰ درصد با سویه‌های موشی C3H و GR همولوژی دارند.

**واژگان کلیدی:** ویروس تومور پستان موش، سرطان پستان، تومور بدخیم، عوامل خطر، Nested polymerase chain reaction

**ارجاع:** شریعت پناهی سید شروین، سلیمانی درجاق محمد، صالحی رسول. **ارتباط بین حضور توالی ویروس تومور پستان موش در بافت پستان و ابتلای به سرطان پستان در زنان ایرانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۲۷): ۲۱۷-۲۰۸

## مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی بین زنان در سرتاسر جهان و نیز کشور ایران است. نرخ شیوع سرطان پستان در کشورهای غربی در طول چند دهه‌ی گذشته روند صعودی داشته است (۵-۱). شیوع سرطان پستان در ایران ۲۵/۰۶ مورد در هر ۱۰۰۰۰۰ زن تخمین زده می‌شود (۶).

مطالعات زیادی برای شناخت عوامل خطر این

۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۳- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های کودکان و گروه علوم تشریحی و بیولوژی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
**نویسنده‌ی مسؤول:** دکتر رسول صالحی
Email: r_salehi@med.mui.ac.ir

تومور انجام گرفته است، اما عوامل خطر شناخته شده برای کمتر از نیمی از تمام موارد سرطان پستان توجیه‌کننده و مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با ایجاد سرطان پستان در حد بسیار کمی شناخته شده است (۸-۷). در مطالعات اخیر، نقش ویروس‌ها در ایجاد این سرطان بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. ویروس پاپیلومای انسانی، ویروس تومور پستان موش (Mouse mammary tumor virus یا MMTV) و ویروس Epstein–Barr و ویروس‌های کاندید به عنوان عامل سرطان پستان می‌باشند (۹). ویروس‌ها به عنوان عامل مؤثر در حداقل ۱۵ درصد از سرطان‌های انسانی معرفی شده‌اند (۱۰).

MMTV یک رتروویروس منتقل‌شونده از راه شیر است که به جنس بتا رتروویروس تعلق دارد. نقش رتروویروس MMTV به عنوان یکی از علل اصلی ایجاد سرطان پستان در موش‌های آزمایشگاهی به خوبی ثابت شده است (۱۴-۱۱). بیش از ۷۵ سال قبل Bittner به وجود MMTV به عنوان یک بتا رتروویروس غیر حاد ترانسفورم‌کننده پی برد (۱۱). ژنوم این رتروویروس به شکل تصادفی وارد ژنوم میزبان می‌شود و می‌تواند باعث بر هم زدن تنظیم ژن‌های مجاور و در نتیجه ایجاد تومور شود (۱۴-۱۳).

در چندین مطالعه‌ی اخیر ادعا شده است که یک ویروس مشابه MMTV که آن را HMTV (Human mammary tumor virus) می‌نامند، ممکن است در برخی موارد در ابتلای انسان به سرطان پستان نقش داشته باشد (۱۹-۱۵). اگر چه ارتباط بین حضور MMTV-like gene sequences با کارسینوم پستان در چندین تحقیق به خوبی ثابت شده است (۲۴-۲۰)، اما در برخی مطالعات این ارتباط دیده نشده است. بنابراین در حال حاضر این نظریه که MMTV می‌تواند یک عامل اتیولوژیک برای بروز سرطان پستان در انسان قلمداد گردد، موضوعی بحث برانگیز می‌باشد.

Wang و همکاران سکانس‌های ژن MMTV-ENV را با توالی‌های ژن HERV-k10 (Human endogenous retroviruses) انسانی مطابقت دادند و یک ناحیه‌ی ۶۶۰ جفت بازی با همولوژی بسیار پایین (۱۶ درصد) بین نوکلئوتیدهای ۹۷۶-۱۶۴۰ از ژن env را انتخاب نمودند (۱۹).

در مطالعه‌ی حاضر نیز به این مسأله با دقت کافی پرداخته شد و با به کار گرفتن پرایمرهای اختصاصی ابتدا یک قطعه‌ی DNA ۶۸۵ جفت بازی (بین موقعیت‌های ۹۷۶-۱۶۶۱) تکثیر شد و سپس با کاربرد پرایمرهای داخلی، یک توالی ۲۵۲ جفت بازی (بین موقعیت‌های ۱۳۸۸-۱۶۴۰) مورد بررسی قرار گرفت (۲۷-۲۵). توالی این پرایمرها در جدول ۱ آمده است.

**جدول ۱. پرایمرهای شماره‌ی ۱ تا ۴ که طراحی‌شده و مکان آن‌ها در ژن ENV**

| اندازه‌ی محصول (جفت باز) | موقعیت روی ژن Env | توالی پرایمر Sequence (5′-3′) | Designation |
|---|---|---|---|
| ۲۵۲ | ۱۳۸۸-۱۴۰۵ | TACATCTGCCTGTGTTAC | داخلی |
| | ۱۶۲۶-۱۶۴۰ | ATCTGTGGCATACCT | |
| ۶۷۱ | ۱۶۴۷-۱۶۶۱ | GAATCGCTTGGCTCG | خارجی |
| | ۹۷۶-۹۹۰ | CCTCACTGCCAGATC | |

در برخی از کشورها مثل آمریکا، استرالیا، ایتالیا، مکزیک، آرژانتین و برزیل وجود MMTV-like env sequences در ۳۰ تا ۴۰ درصد از موارد سرطان پستان، گزارش شده است (۳۱-۲۸، ۱۹-۱۸). در کشور تونس حدود ۷۴ درصد از نمونه‌های سرطان پستان از نظر وجود MMTV مثبت بودند (۳۲). در کشورهای آسیای جنوب شرقی مثل ژاپن و چین حضور MMTV-like env sequences به ترتیب ۱۲ و ۱۰ تا ۱۷ درصد بوده است (۳۳، ۳۰). این در حالی است که در کشور ویتنام شیوع این ویروس فقط ۰/۸ درصد گزارش شده است (۳۱). تاکنون در هیچ یک از مطالعات فوق حضور این توالی‌ها در نمونه‌های بافت سالم، بیش از ۴ درصد گزارش نشده است (۳۴، ۳۲-۳۱، ۲۸، ۱۹).

در ایران در تنها مطالعه‌ای که به تازگی در شهر شیراز صورت گرفته است، رابطه‌ای بین MMTV و ابتلا به سرطان پستان یافت نشده است (۳۵).

هدف این مطالعه، جستجو برای DNA یک ویروس مرتبط با MMTV اگزوژن در نمونه‌های سرطان پستان در بیماران ایرانی بود. در این مطالعه برای غلبه بر مشکل وجود توالی‌های اندوژن انسانی، توالی‌هایی از ژن MMTV-ENV انتخاب شدند که همولوژی خیلی پایینی با HERV-Ks یا به هر ژن انسانی دیگری داشتند (۱۹).

## روش‌ها

در این مطالعه‌ی مورد- شاهدی، بررسی ژنوم MMTV در ۱۱۸ نمونه‌ی بافت توموری و شاهد سالم از طریق روش Nested polymerase chain reaction (Nested-PCR) انجام گرفت. نمونه‌های مورد مطالعه به طور تصادفی از نمونه‌های بافت پستان که در زمان جراحی اولیه، در سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۰ در بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان، به شکل بلوک‌های پارافینی تثبیت شده با فرمالین در آمده بودند، جمع‌آوری گردید.

۵۹ نمونه از بافت توموری پستان و ۵۹ نمونه هم به عنوان شاهد از بافت سالم پستان انتخاب شدند. به منظور ایجاد اطمینان، اسلایدها از نظر بدخیمی توسط پاتولوژیست بازبینی و تأیید شد. تمام نمونه‌ها متعلق به زنان ایرانی بود که در مناطق میانی ایران ساکن بودند.

مجوزهای لازم برای انجام این طرح پژوهشی از کمیته‌ی اخلاق بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان گرفته شد و ملاحظات اخلاقی برای حفظ اطلاعات هویتی بیماران انجام گرفت.

از هر نمونه، پنج برش ۱۰ میکرونی با استفاده از دستگاه میکروتوم تهیه و به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. پارافین در یک میلی‌لیتر گزیلن حل و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید و در دور ۱۰۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی خارج گردید. این کار دو بار دیگر تکرار شد تا پارافین به طور کامل حل شود. سپس ۱ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰ درصد به هر تیوب اضافه و به خوبی مخلوط گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۵۰۰ دور سانتریفوژ و پس از آن مایع رویی خالی شد. این مرحله برای یک مرتبه دیگر تکرار گردید. پس از خشک کردن نمونه، DNA با استفاده از روش استاندارد فنل- کلروفرم استخراج گردید (۳۶). برای هر نمونه، غلظت DNA توسط اسپکتروفتومتری سنجیده شد و به شکل نانوگرم بر میکرولیتر ثبت گردید.

جدول ۲. توالی پرایمرهای مربوط به SMA جهت انجام Polymerase chain reaction (PCR)

| ژن هدف | طول قطعه‌ی تکثیرشده | توالی نوکلئوتید (3´→5´) | نوع پرایمر |
|---|---|---|---|
| ژن SMN | ۱۸۵ | AGACTATCAACTTAATTTCTGATCA | SMAR 11 |
| | | CCTTCCTTCTTTTTGATTTTGTTT | SMAX7DRA |

برای اطمینان از عدم حضور ممانعت کننده‌های واکنش PCR، تمامی DNAهای استخراج شده ابتدا با کاربرد پرایمرهای ژن SMN، به عنوان یک ژن انسانی با تعداد کپی مناسب PCR شدند و یک قطعه‌ی ۱۸۵ نوکلئوتیدی از این ژن تکثیر شد. قطعه‌ی ۱۸۵ جفت بازی DNA با استفاده از پرایمرهای ژن SMN تکثیر گردید. توالی پرایمرهای مربوط به SMA جهت انجام PCR در جدول ۲ آمده است.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر بافر × ۱۰، ۲۰۰ میلی‌مول dNTPs، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱/۵ واحد Taq DNA polymerase، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از هر یک از پرایمرهای F و R انجام شد.

برنامه‌ی انجام PCR با پرایمرهای SMN توسط دستگاه ترموسایکلر، ابتدا ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۱ دور)، سپس ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد ۱ دقیقه (۳۰ دور) و در نهایت ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه (۱ دور) تنظیم شد. تمامی نمونه‌هایی که قابلیت تکثیر خوبی نشان ندادند با نمونه‌های دیگری جایگزین شدند و یا استخراج DNA از آن‌ها به طور مجدد انجام گرفت.

برای تشخیص ژنوم MMTV در نمونه‌ها از روش Nested PCR استفاده شد. حجم هر واکنش PCR، ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد که شامل ۵ میکرولیتر بافر × ۱۰، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۲۰۰ میلی‌مول از dNTPs mix و ۲/۵ واحد تک پلی‌مراز، ۱۰۰ نانوگرم DNA و ۱۰ پیکومول از پرایمر خارجی (برای دور اول) و پرایمر داخلی به همراه ۱ میکرولیتر از محصول PCR مرحله‌ی اول (برای دور دوم) بود. برای دور دوم ۱/۵ واحد تک پلیمراز استفاده شد. برای تکثیر DNA چه در مرحله‌ی اول و چه در مرحله‌ی دوم واکنش Nested PCR، سیکل حرارتی به صورتی که توسط Etkind و همکاران شرح داده شده بود، انتخاب گردید (۳۴).

محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد برای دور اول و ۲ درصد برای دور دوم به همراه Green DNA viewer الکتروفورز شدند. تجزیه و تحلیل و عکس‌برداری با سیستم Gel-Document (E-Box, VILBER) انجام شد.

برای اطمینان از حضور DNA ویروسی و عدم تکثیر اشتباه توالی‌های غیر اختصاصی یا توالی‌های رتروویروسی اندوژن، ۳ عدد از محصولات Nested PCR از بین نمونه‌های مبتلا به بدخیمی به طور تصادفی انتخاب و برای تعیین سکانس ارسال شدند. با استفاده از نرم‌افزار NCBI-BLAST ترادف حاصل با توالی‌های موجود در Gene bank database مربوط به سویه‌های موشی ویروسی (GR, CH3 and BR6)، برای یافتن درصد همولوژی تطابق داده شد.

نتایج حاصل توسط نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۸ (version 18, SPSS Inc., Chicago, IL) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

## یافته‌ها

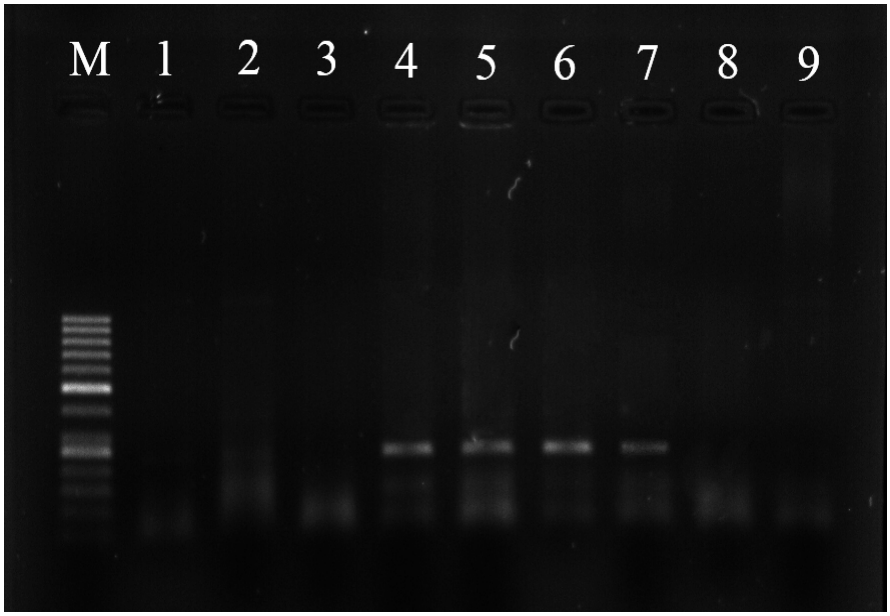
بررسی حضور توالی‌های MMTV-like env در مجموع بر روی ۱۱۸ بافت توموری پستان و نیز بافت‌های سالم جمع‌آوری شده انجام گردید.

از بین ۵۹ نمونه‌ی مبتلا به سرطان پستان، ۴۵ مورد (۷۶/۲ درصد) کارسینومای داکتال (مجاری) تهاجمی، ۹ مورد (۱۵/۲ درصد) کارسینومای لوبولار تهاجمی و ۵ مورد (۸/۴ درصد) کارسینومای مدولاری بودند.

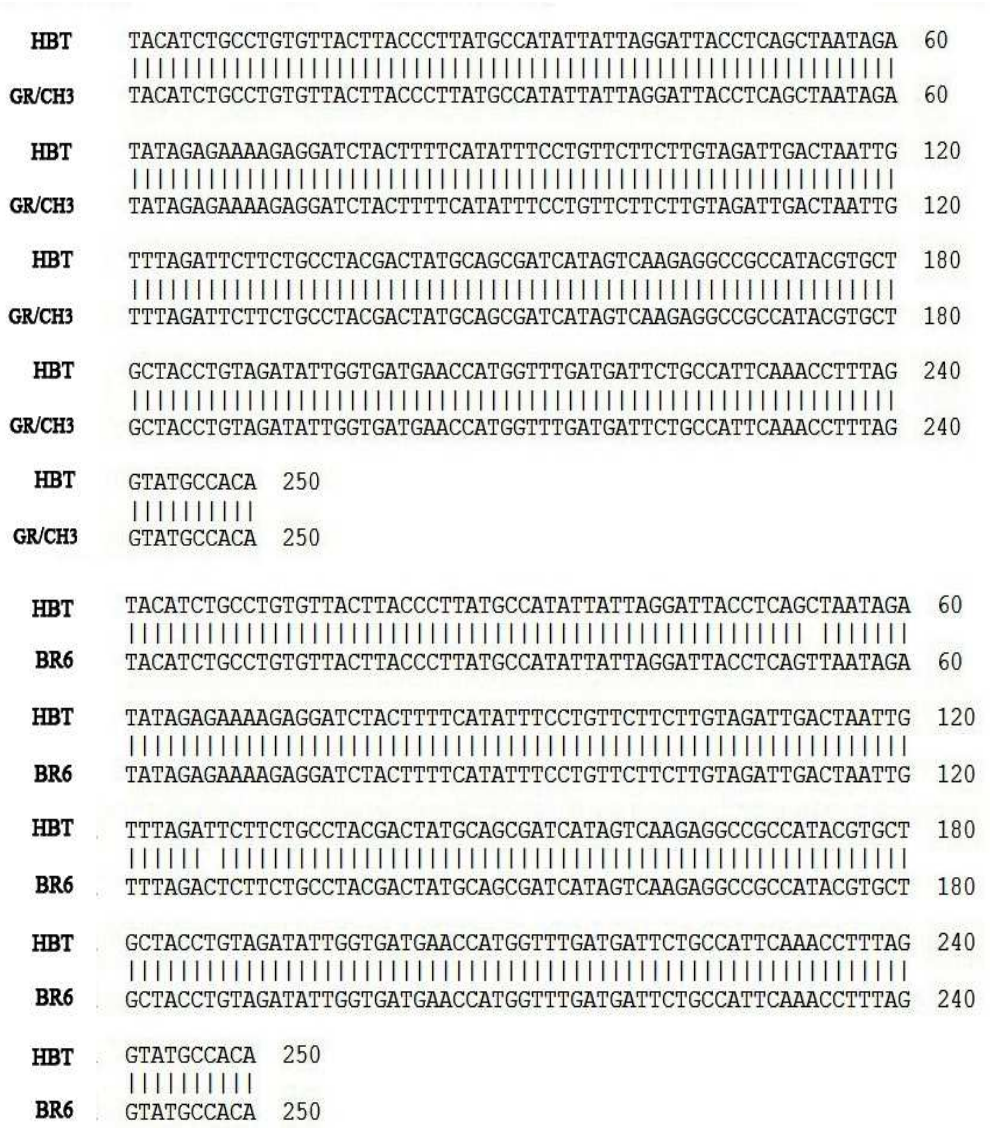
تنها از نمونه‌هایی که DNA آن‌ها قابلیت تکثیر باند ۱۸۵ نوکلئوتیدی ژن SMN انسانی را توسط PCR داشتند، برای بررسی آلودگی با MMTV استفاده شد.

در گروه بیماران از مجموع ۵۹ نمونه‌ی مورد بررسی، ۱۹ نمونه (۳۲/۲ درصد) مبتلا به عفونت MMTV بودند، این در حالی بود که از میان ۵۹ نمونه‌ی شاهد تنها ۳ نمونه (۵ درصد)دارای عفونت با ویروس MMTV بودند. آزمون Fisher's exact اختلاف بین دو گروه را معنی‌دار نشان داد ($P < ۰/۰۰۱$) (شکل ۱).

توالی‌های ۲۵۲ جفت بازی این ۳ محصول PCR که از سه تومور پستان انسانی مجزا بودند، با یکدیگر مشابه بود؛ تطابق نرم‌افزاری بین توالی‌های سکانس‌شده‌ی نمونه‌های بدخیم پستان مثبت برای عفونت MMTV با توالی‌های استاندارد سوش‌های مختلف MMTV، نشان‌دهنده‌ی همولوگ بودن ۹۹ درصدی ژن MMTV ENV مربوط به سویه‌ی موشی BR6 و ۱۰۰ درصد همولوگی با ژن MMTV ENV سویه‌های موشی GR و CH3 بود (شکل ۲). در صورتی که این همولوگ بودن برای توالی‌های MMTV-Env like اندوژن انسانی با استفاده از NCBI (National center for biotechnology Information- GenBank Blast Program) حداکثر ۱۲ درصد به دست آمد.




**شکل ۱. باند ۲۵۰ جفت بازی، محصول PCR (Polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای داخلی و الکتروفورز بر روی ژل ۲ درصد آگارز. ردیف‌های ۴، ۵، ۶ و ۷ متعلق به نمونه‌هایی هستند که آلوده به توالی‌های مشابه MMTV (Mouse mammary tumor virus) بودند.**




**شکل ۲. توالی ۲۵۰ جفت بازی محصول Nested PCR (Nested polymerase chain reaction) مربوط به یک تومور پستان انسانی که با سویه‌های GR، CH3 و BR6ی MMTV (Mouse mammary tumor virus) مقایسه شده است.**

## بحث

سرطان پستان عامل اصلی مرگ و میر در میان زنان سرتاسر جهان است (۵، ۳-۱). این سرطان در ایران شایع‌ترین سرطان در زنان می‌باشد و متأسفانه سیر مرگ و میر آن در دهه‌ی گذشته روند صعودی داشته است (۴). تاکنون تلاش‌های بسیاری برای مشخص کردن عوامل ایجادکننده‌ی این بدخیمی انجام شده است، اما به نظر می‌رسد هنوز راه زیادی در پیش است. همانند سایر بدخیمی‌ها، فرضیه‌ی نقش داشتن ویروس‌ها توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در این رابطه ویروس‌های پاپیلومای انسانی، Epstein–Barr و MMTV کانون تمرکز بسیاری از کارهای تحقیقی بوده‌اند (۹).

مطالعه‌ی حاضر با هدف جستجو برای بررسی

وجود DNA یک ویروس مرتبط با MMTV اگزوژن در نمونه‌های سرطان پستان انجام شد. در این مطالعه توالی‌هایی از ژن MMTV-ENV که همولوژی خیلی پایینی با HERV-Ks یا با هر ژن انسانی دیگری داشتند، انتخاب شدند (۱۹). نتایج این مطالعه همانند مطالعات پیشین (۳۱، ۲۹، ۱۹)، نشان داد که سکانس‌های env مشابه MMTV در بافت‌های سالم پستان وجود نداشتند و یا به میزان بسیار پایینی وجود داشتند؛ اگر چه یک مطالعه‌ی جدید که در جنوب غربی ایران توسط معتمدی‌فر و همکاران انجام شد، هیچ ارتباطی را بین توالی‌های شبه MMTV با ابتلا به سرطان پستان در بیماران نشان نداد (۳۵)، اما ما از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را در حضور ژنوم MMTV در تومورهای پستان و بافت سالم پستان به دست آوردیم.

تفاوت بین نتایج این مطالعه و تحقیق اخیر می‌تواند ناشی از توزیع جغرافیایی متفاوت عوامل اتیولوژیک و ناقلین (مثل توزیع متفاوت موش خانگی) یا ویژگی‌های متفاوت جمعیت‌ها از نظر استعداد ابتلا به سرطان باشد.

نتایج ما در مورد شیوع توالی‌های پیدا شده با مطالعات انجام شده در کشورهای ایالات متحده که در آن‌ها توالی‌های MMTV-like در ۳۰ تا ۴۰ درصد موارد بدخیمی‌های پستان شناخته شده‌اند (۲۹، ۱۹) و نیز نتایج مطالعاتی که در ایتالیا (۲۸)، آرژانتین (۲۹) و استرالیا (۳۱) توالی‌های MMTV-like را به ترتیب ۳۷/۷، ۳۱/۷ و ۴۲/۲ درصد در تومورها نشان داده‌اند، مطابقت دارد.

از طرف دیگر، میزان مثبت بودن توالی‌های MMTV-like در نتایج ما نسبت به برخی مطالعات دیگر که در کشورهای با نرخ پایین سرطان پستان مانند چین و تونس انجام شده‌اند، بیشتر بود. در چین (۳۳) و تونس (۳۷) به ترتیب ۱۶/۸ و ۱۳/۹درصد از موارد سرطان پستان از نظر داشتن توالی‌های MMTV-like مثبت اعلام شده‌اند.

در مطالعات دیگری در ژاپن، سوئد، استرالیا و چین هیچ رابطه‌ای بین حضور یک رتروویروس مرتبط با MMTV و ابتلای به سرطان پستان پیدا نشده است (۴۰-۳۸). این اختلاف‌ها ممکن است مربوط به تفاوت‌های موجود در فرایندهای آزمایشگاهی و استانداردهای استفاده شده و یا ناهمگنی بافت‌ها مربوط باشد. انتقال احتمالی رتروویروس مرتبط با MMTV از حیوان به انسان، ممکن است توزیع جغرافیایی متغیری داشته باشد. به علاوه، پخش گونه‌های موش‌ها از نظر جغرافیایی متغیر است و به نظر می‌رسد که با همه‌گیری‌های سرطان پستان مرتبط است (۴۱).

محققین مسؤول مطالعات انجام‌شده در کشورهای با شیوع بسیار پایین MMTV معتقد هستند که شاید مطالعات دیگر، توالی‌های غیر اختصاصی مجزا از MMTV یا توالی‌های رتروویرال اندوژن را تشخیص داده باشند. تعدادی از توالی‌های رتروویروسی انسانی در ژنوم انسان وجود دارند و برخی نیز ارتباط خیلی نزدیکی با MMTV دارند (۲۵). روش‌های مرسوم به کار رفته در آن مطالعات، شاید به اندازه‌ی کافی برای حذف چنین تکثیرهای غیر اختصاصی، دقیق نباشند.

منشأ توالی‌های MMTV-ENV در نمونه‌های انسانی، خواه اگزوژن باشد و خواه اندوژن، مورد بحث قرار گرفته است. از آن جایی که این توالی تنها در بافت‌های توموری پستان پیدا شده است (۳۱، ۲۹، ۱۹)، ممکن است یک منشأ خارجی داشته باشد.

همان طور که گفته شد مطالعه‌ی حاضر با تمرکز بر روی توالی‌هایی با هومولوژی پایین به رتروویروس‌های اندوژن انسانی و با استفاده از روش‌های حساس انجام شد. ما نیز توالی‌های DNAی ENV شبه MMTV را در ۵۶ نمونه از ۵۹ نمونه‌ی بافت پستان سالم پیدا نکردیم. این نتایج به طور قدرتمندی یک منشأ ویروسی را در درصدی از تومورهای پستان انسانی پیشنهاد می‌کند.

با توجه به این که توالی‌های ویروسی در بافت سرطانی پستان یافت می‌شوند، اما در بافت سالم پستان وجود ندارند، به نظر می‌رسد که انتقال به صورت افقی رخ داده است.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه‌ی بیمارانی که در این تحقیق با رضایت کامل شرکت نمودند و نیز پرسنل محترم بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان کمال تشکر و قدردانی را داریم.

## References

1. National Cancer Institute of Canada (NCIC). Canadian cancer statistics 2001. Toronto, Canada: Goverment of Canada Publications; 2001.
2. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF, Miller BA, Clegg L, Edwards BK. SEER cancer statistics review 1973-1991: tables and graphs. Bethesda, Maryland: National Cancer Institute; 1994. p. 2789-94.
3. McPherson K, Steel CM, Dixon JM. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. BMJ 2000; 321(7261): 624-8.
4. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, Pourhoseingholi A, Barzegar F, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(1): 367-70.
5. American Cancer Society. Cancer facts & figures 2008. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2008.
6. Mousavi SM, Mohaghegghi MA, Mousavi-Jerrahi A, Nahvijou A, Seddighi Z. Burden of breast cancer in Iran: a study of the Tehran population based cancer registry. Asian Pac J Cancer Prev 2006; 7(4): 571-4.
7. Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. J Natl Cancer Inst 1995; 87(22): 1681-5.
8. Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. Breast Cancer Res 2004; 6(5): 213-8.
9. Joshi D, Buehring GC. Are viruses associated with human breast cancer? Scrutinizing the molecular evidence. Breast Cancer Res Treat 2012; 135(1): 1-15.
10. Butel JS. Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. Carcinogenesis 2000; 21(3): 405-26.
11. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. Science 1936; 84(2172): 162.
12. Moore DH, Long CA, Vaidya AB, Sheffield JB, Dion AS, Lasfargues EY. Mammary tumor viruses. Adv Cancer Res 1979; 29: 347-418.
13. Callahan R. MMTV-induced mutations in mouse mammary tumors: their potential relevance to human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1996; 39(1): 33-44.
14. van LF, Nusse R. Oncogene activation and oncogene cooperation in MMTV-induced mouse mammary cancer. Semin Cancer Biol 1995; 6(3): 127-33.
15. Holder WD, Jr., Wells SA, Jr. Antibody reacting with the murine mammary tumor virus in the serum of patients with breast carcinoma: a possible serological detection method for breast carcinoma. Cancer Res 1983; 43(1): 239-44.
16. Segev N, Hizi A, Kirenberg F, Keydar I. Characterization of a protein, released by the T47D cell line, immunologically related to the major envelope protein of mouse mammary tumor virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82(5): 1531-5.
17. Dion AS, Girardi AJ, Williams CC, Pomenti AA, Redfield ES. Responses of serum from breast cancer patients to murine mammary tumor virus: fact or artifact? J Natl Cancer Inst 1987; 79(2): 207-11.
18. Holland JF, Pogo BG. Mouse mammary tumor virus-like viral infection and human breast cancer. Clin Cancer Res 2004; 10(17): 5647-9.
19. Wang Y, Holland JF, Bleiweiss IJ, Melana S,

Liu X, Pelisson I, et al. Detection of mammary tumor virus env gene-like sequences in human breast cancer. Cancer Res 1995; 55(22): 5173-9.
20. Wang Y, Pelisson I, Melana SM, Go V, Holland JF, Pogo BG. MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. Arch Virol 2001; 146(1): 171-80.
21. Melana SM, Holland JF, Pogo BG. Search for mouse mammary tumor virus-like env sequences in cancer and normal breast from the same individuals. Clin Cancer Res 2001; 7(2): 283-4.
22. Liu B, Wang Y, Melana SM, Pelisson I, Najfeld V, Holland JF, et al. Identification of a proviral structure in human breast cancer. Cancer Res 2001; 61(4): 1754-9.
23. Mant C, Gillett C, D'Arrigo C, Cason J. Human murine mammary tumour virus-like agents are genetically distinct from endogenous retroviruses and are not detectable in breast cancer cell lines or biopsies. Virology 2004; 318(1): 393-404.
24. Bindra A, Muradrasoli S, Kisekka R, Nordgren H, Warnberg F, Blomberg J. Search for DNA of exogenous mouse mammary tumor virus-related virus in human breast cancer samples. J Gen Virol 2007; 88(Pt 6): 1806-9.
25. Callahan R, Drohan W, Tronick S, Schlom J. Detection and cloning of human DNA sequences related to the mouse mammary tumor virus genome. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(18): 5503-7.
26. Westley B, May FE. The human genome contains multiple sequences of varying homology to mouse mammary tumour virus DNA. Gene 1984; 28(2): 221-7.
27. Ono M, Yasunaga T, Miyata T, Ushikubo H. Nucleotide sequence of human endogenous retrovirus genome related to the mouse mammary tumor virus genome. J Virol 1986; 60(2): 589-98.
28. Pogo BG, Melana SM, Holland JF, Mandeli JF, Pilotti S, Casalini P, et al. Sequences homologous to the mouse mammary tumor virus env gene in human breast carcinoma correlate with overexpression of laminin receptor. Clin Cancer Res 1999; 5(8): 2108-11.
29. Melana SM, Picconi MA, Rossi C, Mural J, Alonio LV, Teyssie A, et al. Detection of murine mammary tumor virus (MMTV) env gene-like sequences in breast cancer from Argentine patients. Medicina (B Aires) 2002; 62(4): 323-7. [In Spanish].
30. Holland JF, Melana S, Wang Y, Fernandez-Cobo M, Jiang JD, Pogo BG., Human mammary tumor virus (HMTV) is horizontally, not vertically transmitted, Proc. Am Soc Clin Oncol 2003; 22: 873.
31. Ford CE, Tran D, Deng Y, Ta VT, Rawlinson WD, Lawson JS. Mouse mammary tumor virus-like gene sequences in breast tumors of Australian and Vietnamese women. Clin Cancer Res 2003; 9(3): 1118-20.
32. Levine PH, Pogo BG, Klouj A, Coronel S, Woodson K, Melana SM, et al. Increasing evidence for a human breast carcinoma virus with geographic differences. Cancer 2004; 101(4): 721-6.
33. Luo T, Wu XT, Zhang MM, Qian K. Study of mouse mammary tumor virus-like gene sequences expressing in breast tumors of Chinese women. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2006; 37(6): 844-6, 851. [In Chinese].
34. Etkind P, Du J, Khan A, Pillitteri J, Wiernik PH. Mouse mammary tumor virus-like ENV gene sequences in human breast tumors and in a lymphoma of a breast cancer patient. Clin Cancer Res 2000; 6(4): 1273-8.
35. Motamedifar M, Saki M, Ghaderi A. Lack of association of mouse mammary tumor virus-like sequences in Iranian breast cancer patients. Med Princ Pract 2012; 21(3): 244-8.
36. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. JAMA 1991; 265(4): 472-7.
37. Hachana M, Trimeche M, Ziadi S, Amara K, Gaddas N, Mokni M, et al. Prevalence and characteristics of the MMTV-like associated breast carcinomas in Tunisia. Cancer Lett 2008; 271(2): 222-30.
38. Fukuoka H, Moriuchi M, Yano H, Nagayasu T, Moriuchi H. No association of mouse mammary tumor virus-related retrovirus with Japanese cases of breast cancer. J Med Virol 2008; 80(8): 1447-51.
39. Park DJ, Southey MC, Giles GG, Hopper JL. No evidence of MMTV-like env sequences in specimens from the Australian Breast Cancer Family Study. Breast Cancer Res Treat 2011; 125(1): 229-35.
40. Pogo BG, Melana SM, Moran H, Holland JF. Presence of MMTV-like env gene sequences in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2011; 125(1): 295-7.
41. Stewart TH, Sage RD, Stewart AF, Cameron DW. Breast cancer incidence highest in the range of one species of house mouse, Mus domesticus. Br J Cancer 2000; 82(2): 446-51.

**Journal of Isfahan Medical School** Received: 30.12.2012

**Vol. 31, No. 227, 1st Week, May 2013** Accepted: 05.03.2013

# Relation between the Presence of Mouse Mammary Tumor Virus-Like Sequences in Breast Tissues and Human Breast Cancer in Iranian Patients

Seyed Shervin Shariatpanahi MSc[1], Mohammad Soleimani Darjagh PhD[2], Rasoul Salehi PhD[3]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Mouse mammary tumor virus (MMTV), a milk-transmitted retrovirus, is considered to be involved in the development of breast tumors in mice. Although several previous studies have identified MMTV-like sequences in human breast cancer, the presence of human endogenous retrovirus (HERs) makes these results controversial, i.e. the role of MMTV in breast cancer has never been definitely proven. In addition, various results have been reported in this regard from different countries. We selected MMTV envelope (env) gene sequences to eliminate the effects of HERs.

**Methods:** In this case-control study, DNA was extracted from 59 paraffin-embedded malignant tumor tissues and 59 normal control samples. Nested polymerase chain reaction (PCR) was then used to detect MMTV Env-like sequences.

**Findings:** MMTV genome was detected in 19 malignant breast samples (32%) and three normal control samples (5%) ($P < 0.001$).

**Conclusion:** Based on our findings, MMTV can play a major role in the development of breast cancer in Iranian women. According to PCR results, the obtained sequences had 99% homology with BR6 strain of MMTV and 100% homology with GR and C3H strains.

**Keywords:** Mouse mammary tumor virus, Breast cancer, Malignant tumors, Risk factors, Nested polymerase chain reaction

**Citation:** Shariatpanahi SS, Soleimani Darjagh M, Salehi R. **Relation between the Presence of Mouse Mammary Tumor Virus-Like Sequences in Breast Tissues and Human Breast Cancer in Iranian Patients.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(227): 208-17

1- Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
3- Associate Professor, Pediatric Diseases Research Center AND Department of Anatomy and Molecular Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
**Corresponding Author:** Rasoul Salehi PhD, Email: r_salehi@med.ac.ir