

Association between Epstein-Barr Virus and Breast Carcinoma

Zahra Tahmasebi Fard¹,

Farzaneh Tafvizi²,

Leyla Khojareh³

¹ Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

² Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

³ Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received, January 11, 2012; Accepted, November 26, 2012)

Abstract

Background and purpose: Breast cancer is one of the most common malignancies in women and early diagnosis of this cancer is a key element for successful treatment. Breast cancer is a multistep disease in which a virus can play a role. Epstein-Barr Virus (EBV) is identified as an important factor in human cancer. This study investigated the relationship between EBV and breast cancer.

Materials and methods: Sixty seven paraffin-embedded tissue blocks of breast cancer were used and 53 paraffin blocks of non-cancerous breast tissue (26 fibroadenoma and 27 fibrocystic) were collected as the controls. DNA was extracted using the Roche kit, then all samples were analyzed for the presence of beta-globin gene and suitable samples were evaluated for the existence of DNA-EBV through Polymerase Chain Reaction (PCR). χ^2 test of homogeneity and SPSS ver.15 were used to analyze the data.

Results: Two cases negative for beta-globin gene in paraffin-embedded tissue blocks of breast cancer were excluded from the study. EBV was detected by PCR in 23 (35.38%) cases of breast cancer specimens and in 11 (20.75%) cases among the control samples (7 fibroadenoma and 4 fibrocystic). From the total of 118 samples 34 cases (81.28%) were found positive.

Conclusion: This study found significant correlation between EBV infection and breast cancer. Further epidemiological, biological and molecular assessments are needed to confirm the possible association between this virus and the process of carcinogenesis.

Keywords: Breast cancer, Epstein-Barr Virus, Polymerase Chain Reaction

رابطه ویروس اپشتن بار با سرطان پستان

زهرا طهماسبی فرد^۱

فرزانه تفویضی^۲

لیلا خجاره^۳

چکیده

سابقه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع ترین بدخیمی زنان در جهان می باشد. تشخیص زود هنگام این سرطان عامل کلیدی برای درمان آن است. سرطان پستان یک بیماری چند مرحله ای است که ویروس می تواند در آن نقش بازی کند. EBV به عنوان یک عامل مهم در ایجاد سرطان های انسان شناخته شده است. این مطالعه با هدف تعیین رابطه بین EBV و سرطان پستان انجام شد.

مواد و روش ها: ۶۷ بلوک پارافینی از بافت سرطان پستان و ۵۳ بلوک پارافینی بافت غیر سرطانی پستان (۲۶ نمونه فیبروآدنوما و ۲۷ نمونه فیروسیتیک) به عنوان شاهد جمع آوری شدند. پس از استخراج DNA با کیت (شرکت Roche)، همه نمونه ها برای حضور ژن بتاگلوین بررسی شدند و نمونه های مناسب برای وجود DNA-EBV با روش PCR (Polymerase Chain Reaction) مورد ارزیابی قرار گرفتند و داده ها با آزمون های آماری آنالیز شدند.

یافته ها: از ۶۷ نمونه بافت سرطان پستان ۲ مورد برای ژن بتاگلوین منفی بودند و کنار گذاشته شدند. سایر نمونه ها از ۶۵ نمونه سرطان پستان ۲۳ مورد (۳۵/۳۸ درصد) و از ۵۳ نمونه شاهد ۱۱ مورد (۲۰/۷۵ درصد) (فیبروآدنوما ۷ مورد (۲۶/۹۲ درصد) و فیروسیتیک ۴ مورد (۱۴/۸۱ درصد) برای DNA-EBV مثبت بودند. در مجموع از ۱۱۸ نمونه بررسی شده ۳۴ مورد (۲۸/۸۱ درصد) مثبت مشاهده شد از لحاظ آماری شاخص کرامر برای عفونت EBV در نمونه های سرطانی و شاهد ۰/۴۶ بود که نشان دهنده رابطه معنی دار است ($p=0/01$).

استنتاج: از لحاظ آماری ارتباط معنی داری بین عفونت EBV و سرطان پستان وجود دارد. برای اثبات رابطه احتمالی اپشتن بار ویروس با سرطان پستان نیاز به بررسی های اپیدمیولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی است تا مکانیسم دخالت این ویروس در فرایند سرطان زایی روشن شود.

واژه های کلیدی: سرطان پستان، اپشتن بار ویروس، واکنش زنجیره ای پلیمرز

مقدمه

مبتلا به سرطان پستان می باشد که در اغلب اوقات منجر به برداشتن کامل بافت پستان، شیمی درمانی، پرتو درمانی و هورمون درمانی می گردد (۲). سرطان پستان، یک نوع سرطان به وجود آمده از بافت پستان است که

در حال حاضر سرطان پس از بیماری های قلبی - عروقی، دومین علت مرگ را به خود اختصاص داده است (۱). سرطان پستان دومین عامل مرگ ناشی از سرطان ها به شمار می رود تقریباً از هر ۸ زن، یک نفر

E-mail: Ztahmasebi@riau.ac.ir

مؤلف مسئول: زهرا طهماسبی فرد - رودهن: بلوار امام، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، رودهن، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

۳. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۰/۱۲/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۹/۶

عمدتاً لایه درونی غده‌های شیر یا لوبول‌ها (مجاری برای انتقال شیر) را درگیر می‌کند (۳). فاکتورهای اولیه خطر برای ایجاد سرطان شامل، سن (۴)، عدم باروری یا شیردهی (۵)، سطوح بالای هورمون‌ها (۶، ۷)، نژاد، وضعیت اقتصادی و کمبود ید در رژیم غذایی گزارش شده است (۸-۱۰). محققین به دنبال مشخص کردن سایر مسیرهای ایجاد کننده بیماری هستند.

سرطان پستان یک بیماری چند مرحله‌ای است که ویروس‌ها می‌توانند در یکی از این چند مرحله از فرایند بیماری‌زایی، نقش داشته باشند (۱۱). ویروس‌ها در گسترش انواع سرطان‌های مختلف، نقش دارند (۱۲). اخیراً تئوری اتیولوژی ویروسی در مورد فیزیوپاتولوژی سرطان پستان مطرح شده است. به علاوه نظریاتی در مورد القاء سرطان به وسیله عوامل عفونی متعدد با سرکوب کردن سیستم ایمنی از طریق انتقال از حیوان به انسان یا تأثیر مستقیم یا غیر مستقیم بر انکوژن‌ها مطرح شده است (۱۳). مهم‌ترین DNA ویروس‌هایی که به عنوان انکوژنیک در انسان‌ها شناخته شده‌اند شامل ویروس هپاتیت B، پاپیلوما ویروس‌ها و EBV می‌باشند (۱۱). EBV یکی از هشت هرپس ویروس انسانی است که اولین بار به وسیله Epstein و Barr در سال ۱۹۶۴ شناسایی شد. محققین آن را عامل لنفوما که در بخش‌های خاصی از آفریقای شرقی شایع بود، می‌دانستند. علایم بالینی این لنفوما نیز توسط Dennis Burkitt بیان شد (۱۴). علاوه بر لنفومای بورکیت آفریقایی در لنفومای مرتبط با ایدز و لنفومای هوچکین در بیماران پیوندی نیز شناسایی شد. این DNA ویروس انکوژنیک، مرتبط با سایر بدخیمی‌ها نظیر سرطان ریه، سرطان معده (۱۱) سرطان‌هایی شبیه لنفوآپی تلایل در غدد بزاقی و تیموس (۱۵، ۱۶) و لنفومای T-cell نیز شناخته شده است (۱۶).

اپشتن بار ویروس در شیر انسان وجود داشته، می‌تواند پس از انتقال DNA-EBV رشد سلول‌های شیری انسان را تحریک کند از طرف دیگر سلول‌های

اپی تلایل نرمال پستان نیز با تماس مستقیم با این ویروس، آلوده می‌شوند (۱۷). ظاهراً مکانیسم‌های انکوژنیک EBV در سلول‌های لنفاتیک (منتهی به لنفوما می‌شوند) و سلول‌های اپی تلایل (که منجر به سرطان بینی- حنجره و سایر سرطان‌ها می‌شوند) از یکدیگر متفاوت است (۱۷). بیش از ۹۰ درصد جمعیت جوان دنیا به این ویروس آلوده می‌باشند. افراد آلوده مدت طولانی از زندگی خود، حامل این ویروس هستند. EBV از طریق تماس بزاقی منتقل شده، در طی عفونت حاد، اپی تلایوم سنگ‌فرشی مطابق حنجره را آلوده می‌کند اما بعد در طی عفونت پنهان در درون لنفوسیت‌های B قرار می‌گیرد (۱۸). ارتباط بین EBV و سرطان پستان هنوز مورد بحث است. برخی گزارشات شیوع EBV در سرطان پستان را تا بیش از ۲۱-۵۱ درصد مطرح می‌کنند در حالی که سایر محققین قادر به شناسایی آن در نمونه‌های بافت سرطانی پستان نبوده‌اند (۱۸). ارتباط اتیولوژیکی بین EBV و بیماری تاکنون مشخص نشده است و نقش آن در ایجاد تغییر شکل سلول‌ها ناشناخته باقی مانده است. در این مطالعه، شناسایی ویروس در نمونه‌های سرطان پستان و نمونه‌های طبیعی بافت پستان به روش PCR انجام شده است تا مشخص شود که آیا ویروس در اتیولوژی سرطان پستان بیماران ایرانی نقش دارد یا خیر؟ تا در صورت مثبت بودن نتایج از آن بتوان برای پیشگیری، تشخیص و درمان نیز استفاده کرد.

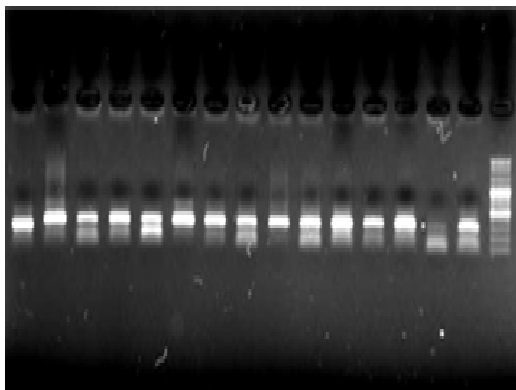
مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و استخراج DNA

۶۷ نمونه بلوک پارافینه سرطان پستان و ۵۳ نمونه بلوک پارافینه بافت غیر سرطانی پستان (فیروآدنوما و فیروسیستیک) به عنوان شاهد از بیمارستان‌های امام خمینی (ره)، بوعلی و ۱۳ آبان در تهران جمع‌آوری شدند. نمونه‌های غیر سرطانی مربوط به افرادی بودند که به هیچ نوع بدخیمی در هیچ جای بدن مبتلا نبودند. بلوک‌های انتخاب شده مربوط به سال‌های ۱۳۸۴ تا

تکثیر ژن بتا گلوبین

پس از استخراج DNA، تمامی نمونه‌ها با پرایمرهای GH20, PCO4, ژن بتا گلوبین با ترادف‌های 5'-GCTCGGTGCCTTTAGTGATGG-3' و 5'-CGATCCTGAGACTTCCACACTG-3' PCR شدند تا قطعه‌ای به طول ۲۵۰ جفت بازی بر روی ژل مشاهده شود. نمونه‌های مناسب برای انجام تکثیر PCR از روی تکثیر ژن بتا گلوبین تعیین شدند. تکثیر قطعات این ژن مناسب بودن محیط واکنش را برای انجام PCR نشان می‌داد. برای انجام واکنش، مخلوط ۲۰ میکرو لیتری برای هر نمونه تهیه شد. ابتدا در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه گرم شدند و سپس برای ۴۵ چرخه تحت فرایند PCR شامل تخریب در ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها در ۶۶ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و طولیل شدن قطعه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه قرار گرفتند سپس در انتها برای یک چرخه نیز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شدند. محصولات PCR جهت تأیید، بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند تا باند ۲۵۰ جفت بازی مشاهده شود (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: نشان دهنده تکثیر بتا گلوبین در نمونه‌های سرطانی و شاهد: چاهک ۱ تا ۱۰ نمونه‌های سرطانی، چاهک ۱۱ تا ۱۵ نمونه‌های غیر سرطانی (شاهد)، چاهک ۱۶ مارکر

۱۳۸۹ شمسی بودند و افراد جراحی شده میانگین سنی ۴۸ سال (حداقل ۳۳ سال و حداکثر ۵۶ سال) را داشتند. دامنه سنی افراد شاهد انتخاب شده نیز، با موارد سرطانی مشابه بود. با استفاده از دستگاه میکروتوم برش‌های بسیار نازک ۱۰ میکرونی به تعداد ۴ عدد از بلوک‌های پارافینی تهیه شد و در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری اپندورف فاقد DNase/RNase ریخته شد. برای هر نمونه از دستکش یک‌بار مصرف، تیغ و اپلیکاتور نو استفاده گردید. بعد از پارافینه کردن با Xylene و اتانول مطلق، DNA با استفاده از کیت استخراج شرکت Roche مطابق با دستور کار ارائه شده توسط شرکت، استخراج گردید. روش استخراج به این ترتیب بود که ابتدا بافت‌های پارافینه در ۱۰۰ میکرو لیتر بافر لیز کننده بافت، ۱۶ میکرو لیتر SDS ۱۰ درصد و ۴۰ میکرو لیتر پروتیناز K در ۵۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند تا بافت کاملاً لیز شود. بعد از افزودن ۳۲۵ میکرو لیتر Binding Buffer و ۳۲۵ میکرو لیتر اتانول مطلق، مخلوط بر روی ستون برده شد. سپس سه بار شستشو برای برداشتن مواد اضافی به کمک بافر شستشو انجام گرفت. DNA چسبیده به ستون با ۵۰ میکرو لیتر بافر Eluted شستشو داده شد و تا زمان انجام PCR در فریز ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ارزیابی خلوص و کیفیت DNA/استخراج شده

مقدار و خلوص DNA استخراج شده با استفاده از فتونا نومتر (IMPLEN GmbH, Germany) تعیین شد. نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد و نمونه‌هایی که این نسبت را در حدود ۱/۷ تا ۲ داشتند برای انجام PCR استفاده شدند. از طرف دیگر حدود ۲ میکرو لیتر از هر نمونه بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد برده شد تا آلودگی‌های احتمالی مشاهده شوند.

انجام واکنش PCR برای شناسایی EBV

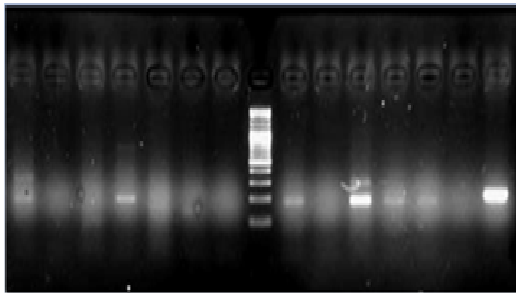
تمامی نمونه‌های بتاگلوبین مثبت، برای شناسایی EBV-DNA تکثیر شدند. برای هر نمونه، در یک میکرو تیوب ۰/۲ میلی لیتری، ۱۲/۵ میکرو لیتر Master mix (شرکت Ampliqon, Denmark)، ۱ میکرو-لیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت و ۱۱μg DNA استخراج شده ریخته شد، سپس با آب مقطر حجم نهایی واکنش به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد و پس از اطمینان از محکم بسته شدن درب تیوب‌ها، آن‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند. هر چرخه تکثیری با پرایمرهای اختصاصی EBV (F: 5'-AGT CTG GGA AGA CAA CCA CA-3' & R: 5'-CCC GCC TAC ACA CCA ACT AT-3') شامل، مرحله تخریب اولیه با دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای پنج دقیقه و ۴۰ چرخه شامل تخریب دو زنجیره در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و در انتها مجدداً در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۵ دقیقه باقی می ماندند تا اطمینان حاصل شود که کاملاً محصول طویل شده است. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد که به آن رنگ اتیدیوم پروماید نیز افزوده شده بود، الکتروفورز شدند تا قطعات ۲۱۰ bp بر روی ژل آشکار گردد. در تمامی مراحل برای شناسایی آلودگی‌های احتمالی از کنترل مثبت (ویروس جدا شده از رده سلولی Lymphoblastoid) و کنترل منفی (آب به جای DNA) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تکثیر ژن بتاگلوبین نشان داد که از ۶۷ نمونه سرطان پستان ۲ نمونه از لحاظ کیفی جهت تست PCR مناسب نبودند. تمامی DNA های مناسب، با پرایمرهای EBV تکثیر شدند. نتایج بیانگر این بود که از

۶۵ نمونه بافت سرطان پستان ۲۳ مورد (۳۵/۳۸ درصد) و از ۵۳ نمونه شاهد ۱۱ مورد (۲۰/۷۵ درصد) مثبت شدند. نمونه‌های شاهد در دو گروه فیروآدنوما و فیروسیتیک قرار داشتند. ۲۶ نمونه فیروآدنوما جمع آوری شده بود که از این تعداد ۷ مورد (۲۶/۹۲ درصد) مثبت شدند. از ۲۷ نمونه فیروسیتیک نیز ۴ مورد (۱۴/۸۱ درصد) حاوی DNA-EBV بودند. در مجموع از کل نمونه‌های بررسی شده که شامل ۱۱۸ نمونه بود ۳۴ مورد (۲۸/۸۱ درصد) با روش PCR مثبت شدند. در تصویر شماره ۲ تعدادی از نمونه‌های مثبت و منفی در کنار کنترل مثبت (ویروس جدا شده از رده سلولی Lymphoblastoid) و کنترل منفی (از آب به جای DNA استفاده شد) نشان داده شده‌اند.

برای آنالیز آماری داده‌ها، از آزمون χ^2 همگونی استفاده شد و با اطمینان ۹۹ درصد مشخص شد که بین ویروس اپشتن بار و سرطان پستان رابطه وجود دارد.



تصویر شماره ۲: نشان دهنده نتایج حاصل از تعدادی نمونه مثبت و منفی بیماران سرطانی و شاهد: از چاهک ۱ تا ۶: نمونه‌های شاهد (شماره ۱ و ۴ مثبت و بقیه منفی)، چاهک ۷: نمونه کنترل منفی، چاهک ۸: مارکر، از چاهک ۹ تا ۱۴ نمونه بیماران سرطانی (شماره ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۳ مثبت و بقیه منفی)، چاهک ۱۵: نمونه کنترل مثبت (DNA تخلیص شده ویروس)

بحث

احتمال این که ویروس‌ها بتوانند در اتیولوژی سرطان پستان نقش داشته باشند اولین بار به وسیله

۱. $\chi^2 = 25/15$ در سطح ۰/۰۱ بزرگتر از مقدار بحرانی با درجه آزادی ۱ بود

اساس آنالیز PCR بوده است. سکانس های EBV در ۱۸ مورد از این مطالعات شناخته شده است. ۵ مورد از این مطالعات بر اساس ایمنو هیستوشیمی IHC و تکنیک های In situ هیبریداسیون ISH بوده که EBV در هیچ کدام از این مطالعات شناسایی نشده است. فقط در سه مطالعه از بافت های نرمال پستان زنان به عنوان کنترل استفاده شده، EBV در دو مورد از این مطالعات شناسایی نشد و در یک مورد از آن ها ۲۳ درصد در نمونه های سرطانی و ۳۵ درصد نمونه های کنترلی تشخیص داده شده است. از آن جا که ارزیابی ویروس با تکنیک هایی که بر پایه شناسایی پروتئین های ویروسی است، به دو دلیل لود پایین ویروس و این که EBV در حالت نهفته حداقل بیان پروتئینی را دارد، مشکل می باشد (۱۷). بنابراین ما از روش PCR استفاده کردیم. نتایج به دست آمده از این تحقیق، مشابه نتایج به دست آمده توسط محققین دیگر نظیر Mazouni و همکاران (۲۰۱۱) که (۳۳/۲) درصد موارد مثبت شناسایی کردند (۲۳) Perkins و همکاران (۲۰۰۶) (۴۶) درصد مثبت گزارش کردند (۲۴) Bonnet و همکاران (۱۹۹۹) (در ۵۱ درصد از تومورها مثبت شناسایی شده) بوده و حتی در گزارش دیگری که توسط Arbach و همکاران (۲۰۰۶) ارائه شده، تعداد کپی های ژنوم EBV در نمونه های سرطان پستان محاسبه شده است (۱۶،۱۵). یافته های ما نشان می دهد که احتمالاً اِپِشْتَن بار ویروس را می توان به عنوان یکی از عوامل آلودگی موجود در بافت های پستان در نظر گرفت. بررسی های بیشتر اپیدمیولوژیکی، بیولوژیکی و مولکولی لازم است تا مکانیسم دخالت این ویروس در فرایند سرطان زایی روشن شود. با توجه به افزایش تعداد بیماری های مرتبط با عفونت EBV، تولید واکسن بر علیه این ویروس اهمیت زیادی پیدا می کند تا از این طریق از بیماری ها یا بدخیمی های مرتبط با این ویروس پیشگیری کرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی

Bittner و همکاران (۱۹۳۶) مطرح شد (۱۹). آن ها در شیر موش فاکتور ناشناخته ای را یافتند که می توانست سرطان پستان را در بزرگسالی به وجود آورد. این فاکتور ناشناخته بعدها تومور ویروس پستان موش (Mouse mammary tumor virus) نام گرفت (۱۷). نقش ویروس ها در سرطان پستان از زمان شناسایی این ویروس مطرح شد ولی توالی ژنوم ویروس هایی که در انسان ها یافت شدند، نشان نمی داد که بتوانند مستقیماً در سرطان زایی نقش داشته باشند (۱۲). در تحقیقی که توسط Speck و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد بر روی ۲۲ رده سلولی به دست آمده از سرطان پستان وجود EBV با روش PCR مورد بررسی قرار گرفت ولی در هیچ کدام از نمونه ها DNA ویروسی پیدا نشد (۲۰). آن ها دلیل منفی بودن نتایج خود را این گونه توجیه کردند که ویروس می تواند در انکوژنیستیه شرکت کند سپس آن جا را ترک نماید یعنی با مکانیسم Hit and Run عمل نماید. مشاهده EBV به شکل اپی زوم پایدار و کاهش ویروس در رده های سلولی تغییر شکل یافته بدون آن که فنوتیپ تغییر شکل یافتگی آنها کاهش یابد، نشان دهنده این است که نقش EBV را در بسیاری از تومورهای ویروس منفی، نمی توان نادیده گرفت (۲۰، ۲۱).

در بررسی Sherman و همکاران ۱ مورد از ۱۱۵ مورد بررسی شده از سرطان پستان برای EBV مثبت شد. این یافته با نتایجی که تا ۴۸ درصد مثبت گزارش شده بود، مغایرت داشت. آن ها دو دلیل برای بالا بودن نتایج مثبت سایرین مطرح کردند که یکی آلودگی پنهان لنفوسیت ها به EBV بود زیرا که PCR نمی تواند بین سلول های نتوپلاستیکی و لنفوسیت های آلوده تمایز قائل شود و دیگری استفاده از چرخه های بالای تکثیر تا حد ۸۰ چرخه بود که سبب به وجود آمدن نتایج مثبت بیشتری می شود (۲۲). در مجموع شواهد خاصی از ارتباط بین EBV و سرطان پستان با شناسایی ژن های EBV در سرطان های پستان به دست آمده است. حدود ۲۷ مطالعه بر روی EBV و سرطان پستان انجام شده که ۲۲ مورد بر

خمینی(ره)، بوعلی و سیزده آبان تهران که در تهیه نمونه‌های آزمایشگاهی کمال همکاری را داشتند و کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌شود.

دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن و حمایت‌های ریاست محترم آن واحد جناب آقای دکتر حیدری انجام گرفت. ضمناً از معاونت محترم پژوهشی بیمارستان‌های امام

References

- Godazandeh GHA, Khani H, Khalilian AR, Âtarod Z, Firozjaee MA, Partovi A, et al. Knowledge and practice of above 15 years old females towards breast cancer prevention in Sari township, 2004. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2006; 16(52): 64-76.
- Heravi Karimovi M, Pourdehqan M, Jadid Milani M, Foroutan SK, Aieen F. Study of the effects of group counseling on quality of sexual life of patients with breast cancer under chemotherapy at Imam Khomeini Hospital. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2006, 16(54): 43-51.
- Sariego J. Breast cancer in the young patient. *Am Surg* 2010; 76(12): 1397-1400.
- Steiner E, Klubert D. Assessing Breast Cancer Risk in Women. *Am Fam Physician* 2008; 78(12): 1361-1366.
- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease. *Lancet* 2002; 360(9328): 187-95.
- Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* 2006; 354(3): 270-282.
- Santoro E, DeSoto M, Hong Lee J. Hormone Therapy and Menopause. National Research Center for Women & Families. 2009; Available from: <http://www.center4research.org>. Accessed September 29, 2012.
- Venturi S. Is there a role for iodine in breast diseases? *Breast* 2001; 10(5): 379-382.
- Aceves C, Anguiano B, Delgado G. Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005; 10(2): 189-196.
- Stoddard FR 2nd, Brooks AD, Eskin BA, Johannes GJ. Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine. *Int J Med Sci* 2008; 5(4): 189-196.
- Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 1995; 55(1): 39-45.
- Glaser SL, Hsu JL, Gully ML. Epstein-Barr virus and breast cancer: state of the evidence for viral carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(5): 688-697.
- Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone JM, et al. Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(2): 332-337.
- Lin JC. Antiviral Therapy for Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Tzu Chi Med J* 2005; 17: 1-10.
- Arbach H, Viglasky V, Lefeu F, Guinebretière JM, Ramirez V, Bride N, et al. Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol* 2006; 80(2): 845-853.
- Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in

- invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(16): 1376-1381.
17. Lawson JS, Heng B. Viruses and Breast Cancer. *Cancers* 2010; 2(2): 752-772.
18. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(3): 803-821.
19. Bittner JJ. Some possible effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 1936; 84: 162.
20. Speck P, Callen DF, Longnecker R. Absence of the Epstein-Barr virus genome in breast cancer-derived cell lines. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(16): 1253-1255.
21. Ambinder RF. Gammaherpesviruses and "Hit- and-Run" oncogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156(1): 1-3.
22. McCall SA, Lichy JH, Bijwaard KE, Aguilera NS, Chu WS, Taubenberger JK. Epstein-Barr virus detection in ductal carcinoma of the breast. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(2): 148-150.
23. Mazouni C, Fina F, Romain S, Ouafik L, Bonnier P, Brandone JM, et al. Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer* 2011; 104(2): 332-337.
24. Perkins RS, Sahm K, Marando C, Dickson-Witmer D, Pahnke GR, Mitchell M, et al. Analysis of Epstein-Barr virus reservoirs in paired blood and breast cancer primary biopsy specimens by real time PCR. *Breast Cancer Res* 2006; 8(6): 1-8.