

تعیین اثرات سیتوتوکسیک، ضد پرولیفراسیون و ضد مهاجرتی تیموکوئینون بر رده سلولی سرطان پروستات PC3

ایرج خدادادی، غلامرضا شفیعی*

گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۱۶

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۱/۲۹

چکیده

زمینه و هدف: امروزه گیاهان دارویی و ترکیبات آن‌ها به‌طور گسترده‌ای برای اهداف درمانی مختلف بکار گرفته می‌شوند. در این مطالعه اثرات مهارتی تیموکوئینون (TQ) به‌عنوان بخش فعال سیاه‌دانه، بر تکثیر، مهاجرت و بقای سلول‌های سرطانی PC3 پروستات طراحی گردیده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی غلظت‌های ۰، ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار از تیموکوئینون بر روی سلول‌های PC3 پروستات اثر داده شد و میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت ارزیابی گردید. میزان IC50 تیموکوئینون با استفاده از تست MTT به دست آمد. مهاجرت سلولی با تست مهاجرت سلولی، میزان تکثیر سلولی با تست تشکیل کولونی سلولی و همچنین بررسی تغییرات مورفولوژیک سلولی توسط رنگ‌آمیزی گیمنسا انجام شد. **نتایج:** تیموکوئینون به‌طور معنی‌داری باعث مهار میزان رشد سلولی، مهاجرت و کولونی‌زایی سلول‌ها می‌شود. مقدار IC50 تیموکوئینون در درمان با غلظت ۴۰ میکرومولار و در زمان ۲۴ ساعت به دست آمد. نتایج نشان داد تیموکوئینون به‌طور معنی‌داری باعث مهار مهاجرت و کولونی‌زایی در دوز ۴۰ میکرومولار می‌شود. همچنین این ترکیب به‌طور معنی‌داری باعث ایجاد تغییرات در هسته و سیتوپلاسم سلول‌ها می‌شود که منجر به آپوپتوز می‌گردد. **نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که تیموکوئینون دارای اثرات مهارتی معنی‌داری بر روی سلول PC3 پروستات است و شاید بتواند راه جدید مهار سرطان پروستات باشد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات، تیموکوئینون، مهاجرت، کولونی‌زایی

مقدمه

سرطان مرگ‌زا در دنیا بشمار می‌رود. سرطان پروستات رشد بیش‌ازحد سلول‌های غده پروستات است که معمولاً در سنین بالای ۶۵ سال رخ می‌دهد که با علائمی نظیر مشکل دفع ادرار، خون در ادرار و درد لگن همراه بوده و به عواملی نظیر سن، چاقی، مصرف زیاد داروهای ضدالتهاب و بیماری‌های مقاربتی بستگی دارد (۴). ایجاد و شیوع سرطان پروستات به ریسک فاکتورهای متعددی وابسته است به‌طوری‌که گفته می‌شود سرطان پروستات یک بیماری هتروژنی بوده و به فاکتورهایی نظیر سن، جنس، نژاد، تغذیه، وزن بدن، تنظیم هورمون‌ها، موقعیت جغرافیایی، ژنتیک و نحوه زندگی بستگی دارد (۵). نخستین و پایه‌ای‌ترین ویژگی بافت‌های سرطانی بزرگ شدن دائمی آن توسط توانایی

سرطان اصطلاحی است عمومی که در مورد بیماری‌های بدخیم بکار رفته و توسط تکثیر کنترل نشده و غیرطبیعی سلول‌ها مشخص می‌گردد و تا جایی پیش می‌رود که باعث مرگ می‌شود (۱). امروزه سرطان دومین عامل مرگ‌ومیر پس از بیماری‌های قلب و عروق شناخته شده است (۲). پنج سرطان شایع در ایران به ترتیب شامل سرطان‌های معده (۲۶/۱ درصد)، سینه (۱۷/۱ درصد)، کولون (۸/۰۳ درصد)، مثانه (۸/۰ درصد) و پروستات (۷/۸ درصد) می‌باشند (۳). سرطان پروستات جزء شش

*نویسنده مسئول: غلامرضا شفیعی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
Email: g_r_shafiee@yahoo.com
https://orcid.org/0000-0003-2183-5122

هیدروکینون است. اثرات ضد سرطانی سیاه‌دانه به علت ایجاد القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی به وجود می‌آید (۱۳). تیموکوئینون بانام شیمیایی ۲-ایزوپروپیل-۵-متیل-۱- و ۴-بنزوکوئینون است که در روغن دانه‌های سیاه‌دانه یافت می‌شود (۱۴). تیموکوئینون مشتق از روغن سیاه‌دانه مؤثرترین ترکیبی است که برای هر بیماری، آلرژی یا حساسیت و حتی بیماری‌هایی مانند نفس‌تنگی (آسم)، دیابت، اختلالات در سیستم دفاعی بدن، یرقان، ایدز و حتی سرطان مفید است (۱۵). تیموکوئینون یک آلکالوئید دی‌ترین است که همچنین دارای اثرات قلبی عروقی (۱۶) و تحریک پاسخ ایمنی، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضد میکروبی و ویروسی است. به‌این ترتیب که تیموکوئینون قادر است به‌واسطه افزایش اینترلوکین-۶ و کاهش تعداد پلاکت‌ها سبب کاهش فشارخون سیستولی و هم‌زمان کاهش احتمال ایجاد لخته خون شود. همچنین مشخص شده است که تیموکوئینون می‌تواند با کاهش سایتوکاین‌های التهابی خون نظیر اینترلوکین-۱-TNF α و سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز اثرات ضدالتهابی ایجاد کند (۱۷). در مطالعات متعددی مشخص شده است که تیموکوئینون می‌تواند اثرات مهار بر سرطان‌ها از طریق فعال کردن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر گلوکوتاتیون پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و مهار مسیرهای استرس اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژنی باشد (۱۸). همچنین تیموکوئینون بر روی انباشت چربی در نفیتهای حاصل از دوکسروبین تأثیر مثبت دارد (۱۹). اثرات ضد درد (CNS) و تسکینی که بر سیستم اعصاب مرکزی در اثر مصرف اسانس سیاه‌دانه به وجود آمده به علت وجود ترکیبات اپیوئیدی در آن است (۲۰). با توجه به اهمیت پزشکی سرطان پروستات و اثرات بالقوه ضد سرطانی تیموکوئینون، در مطالعه حاضر که نسبت به مطالعات دیگر بررسی این ترکیب با این روش‌ها به‌طور جامع صورت گرفته است، اثر این ترکیب بر رده سلولی سرطان پروستات (PC3) بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد: رده سلولی سرطان پروستات 3 (PC3) Prostate Cancer از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پودر لیوفیلیزه تیموکوئینون و DMSO از شرکت سیگما (Sigma, Steinheim-Germany) و محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، FBS، پنی سیلین-استرپتومایسین

سلول سرطانی برای رشد خارج از قوانین و نیازهای برنامه‌ریزی‌شده سلول طبیعی است (۶). نامیرایی از ویژگی‌های اصلی سلول‌های سرطانی است. کاهش نیاز به عوامل رشد، عدم توانایی در توقف رشد، عدم نیاز به چسبندگی به ظرف محیط کشت که برای رشد لازم است، افزایش انتقال گلوکز، آزاد کردن فاکتورهایی برای رشد بیشتر در فرآیند نامیرایی مشاهده می‌شود (۷).

خطرناک‌ترین جنبه سرطان، تمایل برای گسترش در سراسر بدن، متاستاز است. سلول‌های توموری که وارد بافت یا اندام جدید می‌شوند، شروع به تکثیر کرده و یک کلنی سلولی جدید ایجاد می‌کنند (۸). ویژگی مهم دیگر سرطانی شدن سلول‌ها، فرار از مرگ یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است که در پاسخ به برخی محرک‌ها و همچنین در طی فرآیند تمایز مرفولوژیکی و بیوشیمیایی رخ می‌دهد. سلول‌های طبیعی که متحمل مرگ آپوپتوزی می‌شوند تغییرات مورفولوژیک متعددی نشان می‌دهند از جمله کوچک و جمع شدن سلول، تراکم کروماتین، ازهم‌گسیختگی سازمان‌دهی شده هسته، جوانه زدن غشای پلاسمایی و سرانجام قطعه‌قطعه شدن سلول و ایجاد اجسام آپوپتوتیک که به‌سرعت بلعیده می‌شوند (۹).

روش‌های اصلی درمان سرطان عبارت‌اند از: شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، جراحی، ژن‌درمانی، آنتی‌آنژیوژنیزس، درمان بیولوژیکی یا ایمونولوژیک، درمان فوتودینامیک و سوزاندن ضایعه بدخیم با اشعه لیزر، اما همه این روش‌های درمانی عوارض جانبی خود را روی دیگر بافت‌های سالم بدن دارند (۱۰). به دلیل عوارض جانبی شدید روش‌هایی نظیر داروهای شیمی‌درمانی و مقاومت‌های دارویی، دستیابی به گیاهان دارویی با اثرات جانبی کمتر که بتواند تأثیرات داروهای سیتوتوکسیک و داروهای تمایزدهنده را افزایش دهد مورد توجه قرار گرفته است. داروهای گیاهی منبع باارزشی برای تولید انواع محصولات دارویی از جمله داروهای شیمی‌درمانی می‌باشند (۱۱). از جمله این گیاهان گیاه سیاه‌دانه است که تاریخچه غنی طبی و مذهبی دارد. این گیاه توسط مصریان باستان و پزشکان یونانی در درمان آسم، سردرد، درد دندان، ناراحتی‌های گوارشی و افزایش شیر مادر مورد استفاده قرار می‌گرفت. این گیاه بومی اروپای جنوبی، آفریقای شمالی و آسیا به‌ویژه خاورمیانه است (۱۲). خواص مفید سیاه‌دانه به علت وجود ترکیبات کینونی آن مثل تیموکوئینون و دی

¹. Immortalization

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{100 \times OD \text{ Test}}{OD \text{ Control}}$$

و IC_{50} از رسم نمودار درصد سلول‌های زنده برحسب غلظت تیموکوئینون و محاسبه شیب نمودار به دست آمد.

تست مهاجرت سلولی^۲

پس از حصول تراکم سلولی ۸۰٪، با سر سمپلر کریستالی خراشی به قطر ۵ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد و سلول‌ها دو بار با PBS شستشو داده شدند. از لحظه صفر یعنی قبل از درمان هر نمونه عکس‌برداری کرده و سپس به نمونه‌ها دوزهای به‌دست‌آمده از روش MTT (۰، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومول در میلی‌لیتر) محلول تیموکوئینون تیمار داده شد و پس از گذشت ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت، پلیت‌ها با گیمسا رنگ‌آمیزی گردیدند (۲۲). لازم به ذکر است که به دلیل کنده شدن سلول‌ها از کف فلاسک و مرگ سلولی در دوزهای بالای IC_{50} (بالای ۴۰ میکرومولار) از دوز ۴۰ میکرومولار و دو دوز پایین‌تر یعنی ۱۰ و ۲۰ میکرومولار تیموکوئینون در مقایسه با کنترل استفاده شد. درنهایت از سلول‌ها عکس‌برداری شده و تصاویر با نرم‌افزار image j1.14 مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها

ابتدا سلول‌های PC3 در محیط کشت حاوی RPMI-1640 همراه با ۱۵٪ FBS و حاوی ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. وقتی تراکم سلول‌ها به‌اندازه ۸۰٪ رسید، توسط تریپسین-EDTA 0.25٪ تریپسینه و از کف فلاسک جدا شده و جهت تکثیر بیشتر به فلاسک‌های بیشتری تقسیم شدند. پس از رسیدن به تراکم ۸۰٪ سلول‌ها با PBS دو بار شستشو داده شدند و با غلظت‌های ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میکرومول در میلی‌لیتر تیموکوئینون به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و پس‌از آن با گیمسا رنگ‌آمیزی گردیدند و بررسی مورفولوژیک زیر میکروسکوپ معکوس و عکس‌برداری از سلول‌ها انجام گرفت (۲۳).

تست تشکیل کولونی^۳

ابتدا بایستی تعداد دقیق سلول‌هایی که به هر چاهک برده می‌شوند محاسبه گردد زیرا که باید کولونی‌ها به‌گونه‌ای باشند که موقع رنگ‌آمیزی به همدیگر نرسند و از هم فاصله داشته باشند و همچنین این اعداد در فرمولاسیون خاصی قرار داده

و تریپسین-EDTA از شرکت Gibco (Gibco, Life Technologies-USA) خریداری گردید. وسایل کشت سلول از قبیل فلاسک، پلیت، فالکون، میکروتیوب، پیپتور و سرنگ از شرکت آرک زکریا (آرک زکریا-ایران) تهیه گردید و شرکت نور (نور-ایران)، اتانول موردنیاز اجرای طرح را تأمین نمود.

کشت سلولی: ابتدا سلول‌های PC3 در محیط کشت حاوی RPMI-1640 همراه با ۱۵٪ FBS و حاوی ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند. وقتی تراکم سلول‌ها به‌اندازه ۸۰٪ رسید، توسط تریپسین-EDTA 0.25٪ تریپسینه و از کف فلاسک جدا شده و جهت تکثیر بیشتر به فلاسک‌های بیشتری تقسیم شدند (۲۱).

تهیه غلظت‌ها: در ساخت غلظت‌های موردنیاز از ماده، از استوک اصلی برداشته و غلظت‌های موردنظر بر اساس آن تهیه گردید. اکنون پس از ساخته‌شدن دوز اصلی با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتر استریل، دارو را فیلتر و سپس مقدار موردنیاز از آن را برداشته تا با به حجم رساندن توسط محیط کشت غلظت‌های موردنظر تهیه گردد. دوزهای مورد استفاده در تحقیق حاضر به ترتیب ۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومول در میلی‌لیتر بود.

MTT: ابتدا با شمارش سلول‌های تریپسینه و جدا شده با استفاده از لام نوبار تعداد 10^4 سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه با ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640، FBS ۱۵٪ و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، ۵۰ میکرولیتر با دوزهای مختلف (۱۰، ۳۰، ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومول در میلی‌لیتر) محلول تیموکوئینون تیمار گردید و پس از گذشت ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت، ۱۵ میکرولیتر از MTT اضافه شد و سلول‌ها به همراه محلول آن به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و پس‌از آن پلیت از انکوباتور خارج کرده و ۱۵۰ میکرولیتر از محیط و دارو را خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از DMSO به آن اضافه گردید و توسط دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ پلیت‌ها خوانده شد (۲۱). میزان سیتوکسیتی و بقاء سلول‌ها در هر نمونه با نمونه کنترل مقایسه و غلظتی که در آن تیموکوئینون منجر به کاهش ۵۰ درصدی بقای سلولی شد به‌عنوان IC_{50} انتخاب گردید. درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۱):

^۲ Cell Migration Assay

^۳ Colony Formation Assay

عکس‌برداری از سلول‌ها انجام گرفت (۲۴). آنالیز کولونی‌های سلولی با نرم‌افزار image j1.14 انجام گرفت.

آزمون‌های آماری

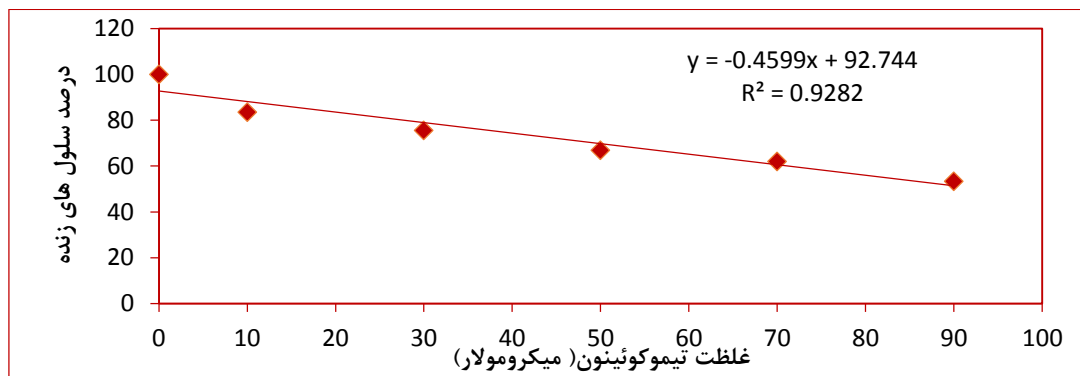
به‌منظور تجزیه و تحلیل آماری یافته‌ها نرم‌افزار آماری SPSS (SPSS Inc. Chicago-USA) 16 مورد استفاده قرار گرفت. برای مقایسه نتایج بین گروه‌های تیمار شده و کنترل از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه One Way ANOVA و آزمون Tukey استفاده شد و $p\text{-Value} \leq 0.05$ به‌عنوان تفاوت معنی‌دار در میانگین‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج

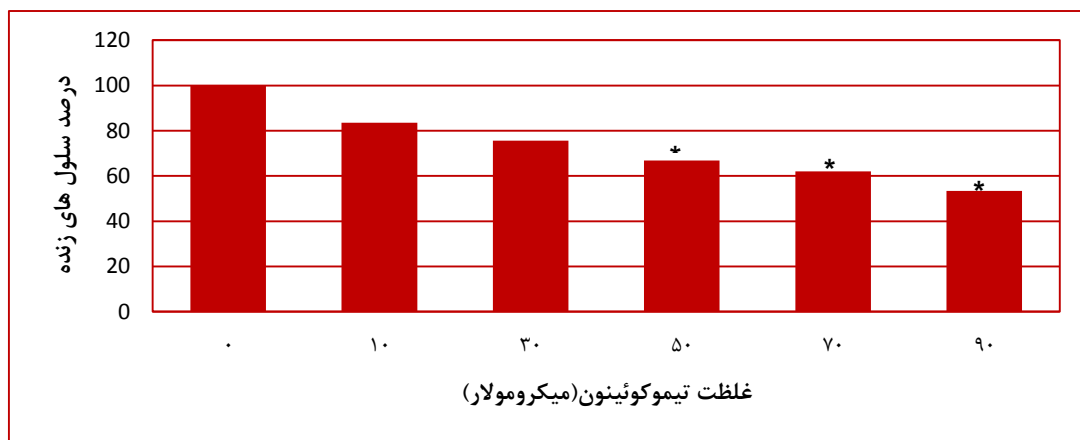
نتایج حاصل از اثر تیموکوئینون بر روی بقای سلولی (روش MTT)

نتایج حاصل از اثر تیموکوئینون بر روی بقای سلول‌های سرطانی رده PC3 نشان داد که در مدت‌زمان ۲۴ ساعت میزان

می‌شوند تا درصد کولونی‌های درمان شده با کنترل قابل‌محاسبه باشند. برای این منظور به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ عدد سلول به هر چاهک اضافه شد و تعداد ۱۰۰ عدد سلول به ازای هر چاهک مناسب شناخته شد. اکنون تعداد ۱۰۰ سلول در پلیت‌های ۶ خانه با ۲ سی‌سی محیط کشت RPMI-۱۶۴۰، ۱۵٪ FBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شد. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، دوزهای زیر IC50 یعنی به ترتیب ۰، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومول در میلی‌لیتر تیموکوئینون به‌صورت دو بار تکرار در چاهک‌ها تزریق گردید. پس از طی ۵ روز و قبل از رسیدن کولونی‌ها به همدیگر، محیط به‌طور کامل خارج گردید و با PBS دو بار شستشو داده شد و سلول‌ها با کریستال و بوله ۰/۵ درصد با متانول به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس و رنگ‌آمیزی شدند. سپس فرآیند شستشو و خارج کردن محلول فیکساتیو و رنگ انجام گرفت و پس از مدت ۲۴ ساعت بررسی مورفولوژیک زیر میکروسکوپ معکوس و



A



B

نمودار ۱- اثر تیموکوئینون بر روی بقای سلولی در مدت‌زمان ۲۴ ساعت. نمودار نقطه‌ای با معادله خط و رگرسیون (بالا) و نمودار ستونی (پایین). علامت * نشانگر مقایسه هر گروه با کنترل است که اختلاف معنی‌دار $p\text{-value} < 0.05$ است.

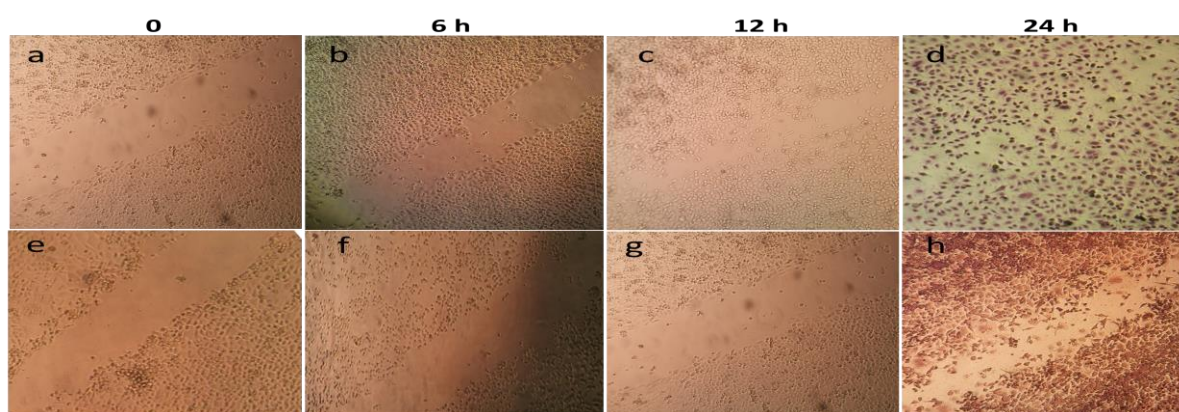
انتخاب می‌شوند اما بایستی اشاره نمود با توجه به این که در دوزهای بالای IC50 یعنی بالای ۴۰ میکرومولار بسیاری از سلول‌ها مرده و کنده می‌شدند لذا برای انجام تست‌های موردنظر یعنی بررسی مهاجرت سلولی، تشکیل کلونی و بررسی مورفولوژیک سلول‌ها از سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار تیموکوئینون مورد درمان طی ۲۴ ساعت استفاده گردید.

نتایج حاصل از اثر تیموکوئینون بر مهاجرت سلول‌های PC3

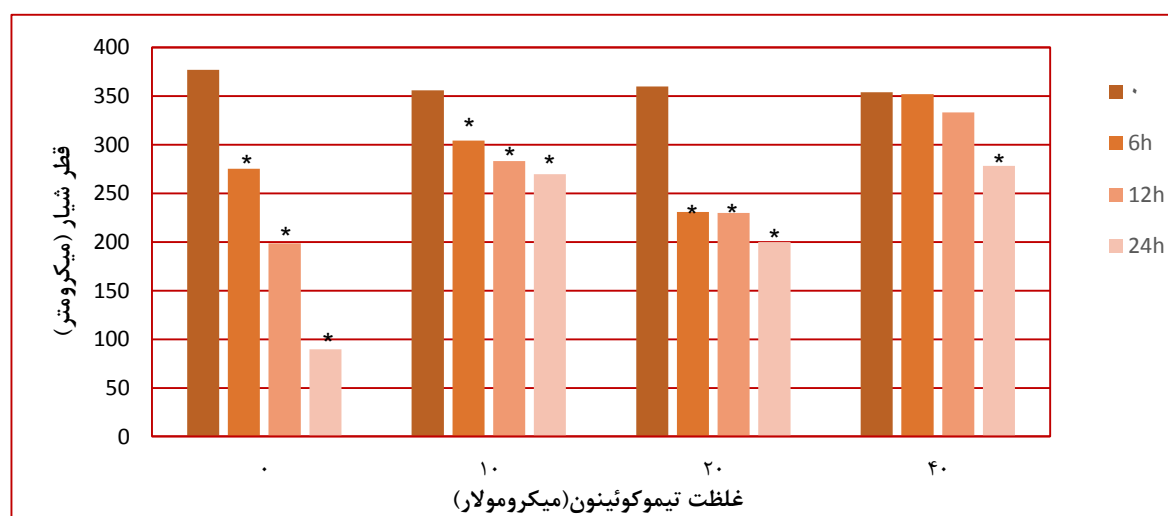
در شکل ۱ و همچنین نمودار ۲ نتایج سنجش توانایی مهاجرت سلول‌های سرطانی پس از گذشت ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت اختلاف

تکثیر سلولی در تمام گروه‌های آزمون نسبت به گروه کنترل با ضریب رگرسیون ۰/۹۲۸۲ کاهش پیدا کرده است (نمودار A-۱) و در ۲۴ ساعت نسبت به زمان‌های ۱۲ و ۴۸ ساعت باعث اثرات معنی‌داری در کاهش بقای سلول‌ها شده است. لذا در غلظت‌های ۵۰، ۷۰ و ۹۰ میکرومولار تیموکوئینون تفاوت معناداری با گروه کنترل ($p \text{ Value} \leq 0/05$) مشاهده گردید (نمودار B-۱).

مطابق فرمولی که در بخش مواد و روش‌ها بیان شد IC50 محاسبه گردید همچنین محاسبه دوز مؤثر یا IC50 با نرم‌افزار Graph pad Instat3 انجام شد که در هر دو روش عدد ۴۰ به دست آمد. معمولاً دو دوز بالا و پایین برای تست‌های موردنظر



شکل ۱- تأثیر تیموکوئینون بر میزان مهاجرت سلولی. میزان مهاجرت سلولی در گروه کنترل در زمان‌های ۰، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت (a-d) و میزان مهاجرت سلولی در گروه درمان شده با دوز ۴۰ میکرومولار در زمان‌های مختلف (e-h). مشاهده می‌شود که در دوز بالای درمان شکاف ایجاد شده با افزایش زمان به‌خوبی پر نشده است یعنی میزان مهاجرت به‌طور معنی‌داری نسبت به کنترل کاهش یافته است.



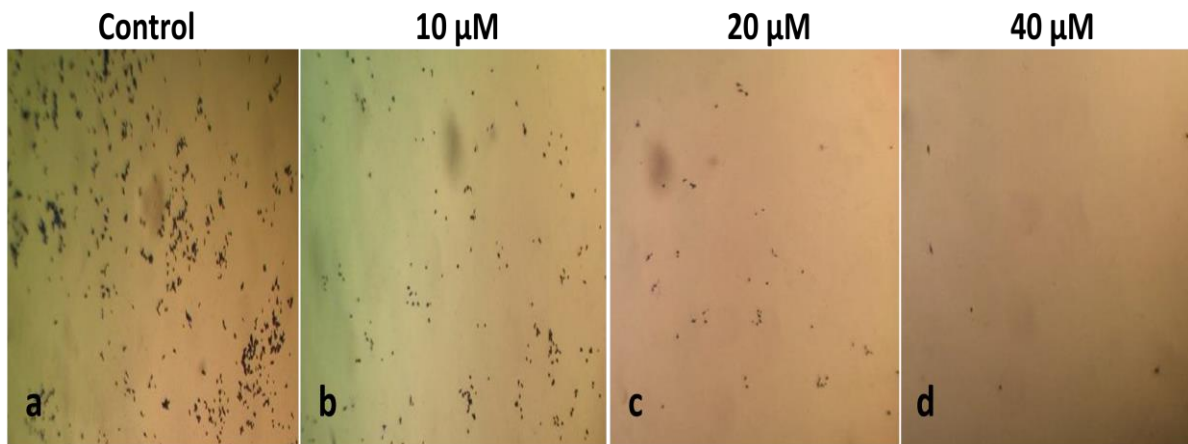
نمودار ۲- تأثیر تیموکوئینون بر مهاجرت سلولی در غلظت‌های مختلف. قطر شمار در گروه کنترل با افزایش زمان کاهش معنی‌داری دارد اما این مهاجرت در گروه با دوز ۴۰ در زمان ۲۴ ساعت کاهش معنی‌داری نشان نمی‌دهد. علامت * نشانگر مقایسه هر گروه با کنترل است که اختلاف معنی‌دار $p\text{-value} < 0/05$ است.

معنی داری را میان گروه‌های تیمار شده با دوز ۴۰ میکرومولار نشان می‌دهد به گونه‌ای که با افزایش زمان به‌ویژه در زمان ۲۴ ساعت، قابلیت مهاجرت سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند و میزان مهاجرت سلولی در دو گروه کنترل و دوز بالا یعنی ۴۰ میکرومولار نشان داده شده است که $p\text{-Value} \leq 0.05$ است.

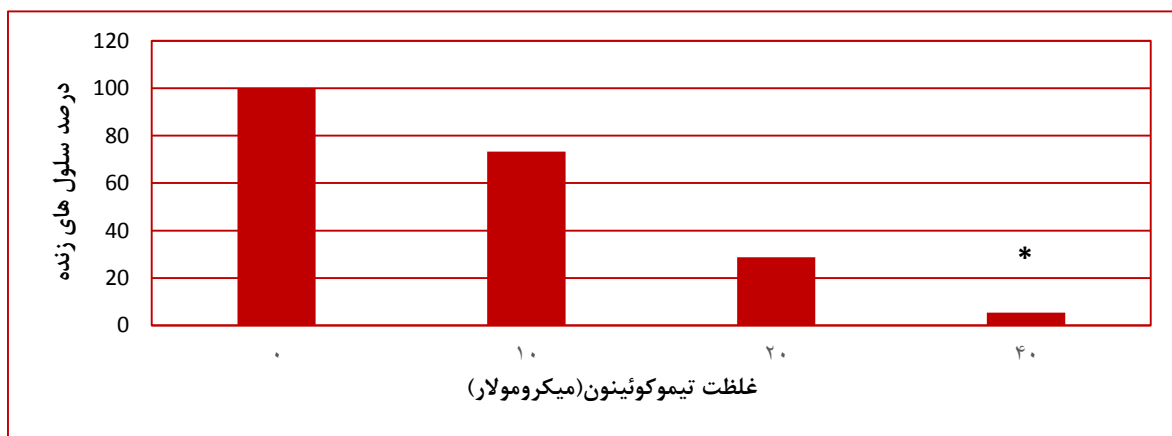
نتایج حاصل از اثر تیموکوتینون بر روی میزان تشکیل کولونی سلول‌های PC3 از آنجایی که بایستی اتصال میان کولونی‌ها برقرار نگردد بنابراین تعداد سلول هر چاهک شمارش گردید که تعداد ۱۰۰ سلول به دست آمد. دو عدد در محاسبات میزان تشکیل کولونی بکار می‌روند (۲۵):

معنی داری را میان گروه‌های تیمار شده با دوز ۴۰ میکرومولار نشان می‌دهد به گونه‌ای که با افزایش زمان به‌ویژه در زمان ۲۴ ساعت، قابلیت مهاجرت سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند و میزان مهاجرت سلولی در دو گروه کنترل و دوز بالا یعنی ۴۰ میکرومولار نشان داده شده است که $p\text{-Value} \leq 0.05$ است.

شکل ۲ تعداد کولونی‌ها را در گروه‌های درمان شده با (کنترل)، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرومولار تیموکوتینون نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تعداد کولونی‌ها با افزایش دوز کاهش محسوسی دارند. در نمودار ۳ مقایسه میان گروه‌های درمان شده و کنترل نشان می‌دهد که توانایی کولونی زایی سلول‌های سرطانی اختلاف معنی‌داری را میان تمام گروه‌های تیمار شده با دوزهای مختلف تیموکوتینون نشان می‌دهد به گونه‌ای که با افزایش میزان دوز به‌ویژه در دوز ۴۰ میکرومولار،



شکل ۲- اثر تیموکوتینون بر روی میزان تشکیل کولونی سلول PC3. میزان تشکیل کولونی در این سلول‌ها با افزایش دوز کاهش نشان می‌دهد به طوری که در دو دوز ۲۰ و ۴۰ این کاهش معنی‌دار است.



نمودار ۳- اثرات تیموکوتینون بر میزان تشکیل کولونی در سلول‌های PC3. همان‌طور که مشاهده می‌شود دارو در دوزهای بالا به‌ویژه در دوز ۴۰ میکرومولار اثر مهاری بسیار معنی‌داری بر تشکیل کولونی دارد علامت * نشانگر مقایسه هر گروه با کنترل است که اختلاف معنی‌دار $p\text{-value} < 0.05$ است.

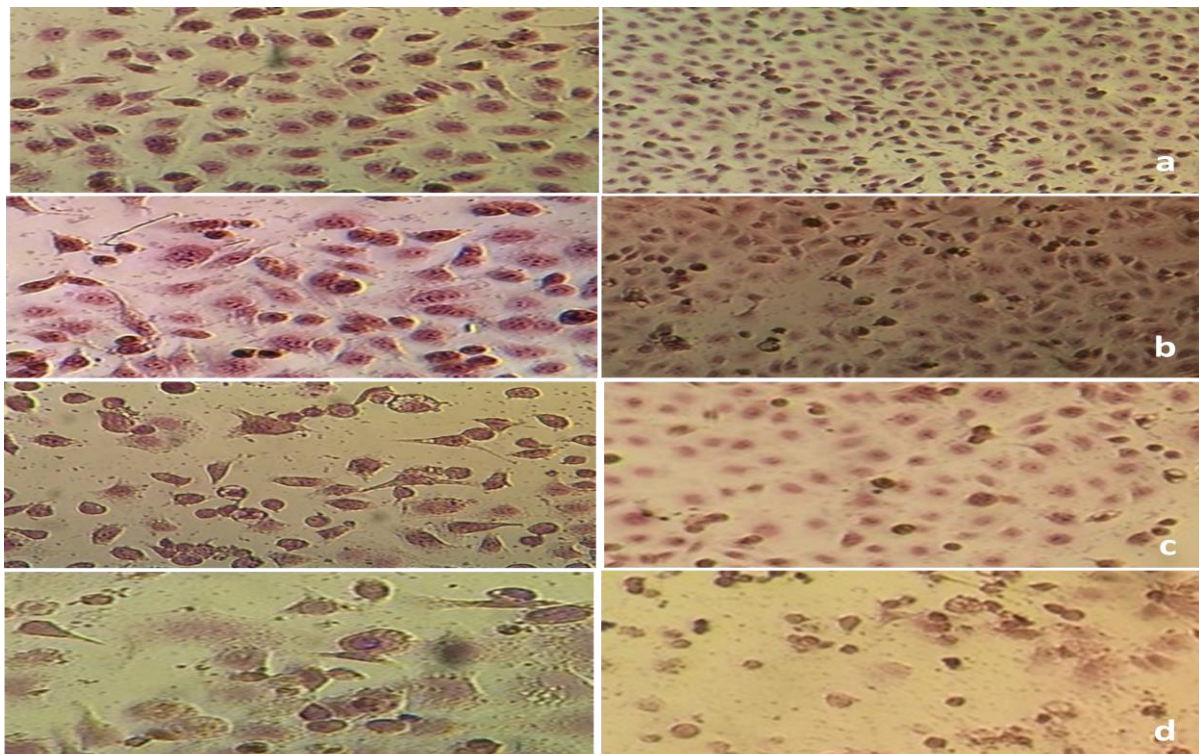


ماده بر روی سلول‌ها با استفاده از روش MTT و اثر آن بر میزان پرولیفراسیون سلولی از طریق colony formation assay، میزان تغییرات مورفولوژیک آن‌ها با مشاهدات میکروسکوپی فاز معکوس و توانایی آنتی متاستازیس تیموکوئینون با تست Cell migration Assay ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که تیموکوئینون اثرات ضد سرطانی معنی‌داری در تست‌های انجام‌شده بر روی سلول‌های سرطان پروستات دارد به‌گونه‌ای که توانست به‌طور معنی‌داری مانع پرولیفراسیون سلولی و کولونی زایی این سلول‌ها شود. همچنین نتایج نشان دادند که تیموکوئینون قادر است میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی را در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری

قابلیت تشکیل کولونی سلول‌ها کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند و $p\text{-Value} \leq 0.05$ است.

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سلول‌ها

همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود هسته‌ها در گروه کنترل (a) طبیعی بوده و هسته‌ها در داخل آن قرار گرفته‌اند. در گروه‌های دریافت‌کننده تیموکوئینون (b, c و d) با افزایش دوز هسته‌ها تغییر شکل دادند و هسته برخی از سلول‌ها به‌صورت بیضی، متورم شده و در برخی سلول‌ها به‌صورت متراکم تغییر یافتند. همچنین سیتوپلاسم متراکم شد و سلول چروکیده گردید و در نتیجه فواصل بین سلولی افزایش یافت و این امر نشان‌دهنده بروز آپوپتوزیس در آن‌ها است.



شکل ۳- تأثیر تیموکوئینون بر مورفولوژی سلولی. سلول‌ها با گیمسا رنگ‌آمیزی شده‌اند و تصاویر هر گروه از راست به چپ با عدسی‌های $10\times$ و $20\times$ می‌باشند. گروه‌های کنترل، گروه درمان شده با دوز ۱۰ میکرومولار، گروه درمان شده با دوز ۲۰ میکرومولار و گروه درمان شده با دوز ۴۰ میکرومولار به نشان داده شده‌اند. مشاهده می‌شود که با افزایش دوز هسته‌ها متراکم‌تر شده و سیتوپلاسم ابتدا چروکیده و سپس سلول d و c، b، a ترتیب با حروف تغییر شکل داده، دچار آپوپتوز گردیده و متلاشی می‌شود.

کاهش دهد و نیز سبب تغییرات مورفولوژیک معنی‌داری در سلول‌های سرطانی و در نتیجه القاء و افزایش آپوپتوز و مرگ آن‌ها گردد.

داروهای گیاهی منبع باارزشی برای تولید انواع محصولات دارویی با عوارض کمتر و اثرات مؤثر می‌باشند (۲۶).

بحث

در مطالعه حاضر اثرات یک ترکیب مشتق از گیاه سیاه‌دانه یعنی تیموکوئینون بر رده سلولی سرطان پروستات (PC3) مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که اثرات سیتوتوکسیک این

تیمار شده در مقایسه با کنترل است. به گونه‌ای که نتایج محققین دیگر نیز در تائید این یافته‌ها نشان دادند که تیموکوئینون یا حتی عصاره‌های روغنی یا الکلی سیاه‌دانه که سرشار از تیموکوئینون می‌باشند قادرند اثر سمی و کشنده بر سلول‌های سرطانی مختلف هم در محیط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* داشته باشند (۳۵، ۳۶). مکانیسم مولکولی این اثرات سیتوتوکسیک و ضد سرطانی تیموکوئینون به خوبی مشخص نشده است اما به نظر می‌رسد که تیموکوئینون این اثرات را از طریق توقف فاز G1 چرخه سلولی انجام می‌دهد (۳۷). القای آپوپتوز و مهار رشد و کولونی زایی سلول‌های سرطانی توسط تیموکوئینون می‌تواند با افزایش بیان mRNA ژن‌هایی نظیر P21 و از طرف دیگر کاهش بیان ژن‌های آنتی آپوپتوتیک به ویژه کاهش میزان بیان ژن Bcl2 صورت گیرد (۳۷). برای توجیه اثرات ضد سرطانی تیموکوئینون، مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است که بخشی از آن مربوط به تأثیر بر فعالیت آنزیم‌ها، دفع رادیکال‌های آزاد، مهار پرولیفراسیون سلولی، تغییر میزان گلوتاتیون داخل سلولی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۳۸) و حذف رادیکال‌های آزاد (۳۹) و نیز القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی از طریق مسیره‌های حتی غیر وابسته به P53 می‌باشند (۴۰، ۴۱). تحقیق دیگری نشان داد که تأثیر ضد سرطانی عصاره *Nigella sativa* بر روی رده سلولی HT29 سرطان کولون با داروی شیمی‌درمانی ۵-فلوروراسیل تا حدودی مشابه است (۴۲).

نتایج ما در خصوص اثرات تیموکوئینون بر تغییرات مورفولوژیک سلول‌های سرطانی پروستات نشان داد که در گروه‌های تیمار شده با این ترکیب نسبت به گروه کنترل هسته‌ها تغییر شکل داده و به صورت متراکم و یا بیضوی دیده می‌شوند. همچنین سیتوپلاسم متراکم شده و سلول چروکیده می‌شود که نشان‌دهنده بروز آپوپتوزیس در آن‌ها است این نتایج هم‌راستا با یافته‌های مطالعاتی بود که نشان دادند تیموکوئینون سبب تغییرات مورفولوژیک معنی‌داری در سلول‌های سرطانی معده (۳۲) و کبد (۴۳) می‌گردد و به عبارت دیگر تشدید مکانیسم‌های منجر به افزایش آپوپتوز و در نهایت وقوع مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی سبب این تغییرات معنی‌دار در شکل و مورفولوژیک سلول می‌شود. همچنین تیموکوئینون می‌تواند با افزایش بیان PTEN، سبب مهار فسفریلاسیون AKT و القای

فیتوکمیکال‌ها مثل فلاونوئیدها، فنول‌ها و همچنین ویتامین‌های ترپن‌دار نظیر ویتامین‌های A، E و C از مهم‌ترین ترکیبات مؤثر موجود در میوه‌ها و سبزی‌ها هستند که دارای اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۲۷). به عنوان مثال در همین راستا اثرات هیپوگلیسمیک و آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه شوید (۲۸)، در مدل‌های حیوانی و یا اثرات پروآپتوزی و ضد پرولیفراسیون جنیستین مشتق از سویا بر روی رده‌های سلولی HT29 سرطان کولون و AGS سرطان معده مشاهده شده است (۳۰، ۳۱). مطالعات نشان می‌دهند که از مهم‌ترین علل ایجاد سرطان پروستات افزایش غلظت و تأثیر آندروژن‌ها است و ترکیبات گیاهی حاوی فلاون، ایزوفلاون و لیگنان و مشتقات آن‌ها به دلیل شباهت ساختار آن‌ها با آندروژن‌ها مشابه آن‌ها عمل کرده و با مهار اتصال آن‌ها به گیرنده‌های خود در بافت هدف از جمله پروستات مانع رشد و پیشرفت بافت پروستاتی می‌گردند. لذا داروهای گیاهی حاوی ترکیبات مشابه آندروژن‌ها می‌توانند منبع باارزشی برای کاهش اثرات آندروژن‌ها به ویژه در سرطان پروستات به حساب آیند (۳۲).

بر اساس تحقیقی که در سال ۱۹۹۹ به آنالیز شیمیایی گیاه سیاه‌دانه *Nigella sativa* با تکنیک‌های پیشرفته از جمله کروماتوگرافی لایه‌نازک، GC و HPLC پرداخت نشان داد که این دانه‌های سیاه دارای برخی مشتقات کینونی شامل تیموکوئینون، دی تیموکوئینون و تیموهیدروکوئینون می‌باشند که احتمالاً بسیاری از اثرات درمانی سیاه‌دانه‌ها مانند ضدالتهاب، کاهش فشارخون، آنتی‌هیستامین، ضد دیابت، ضد میکروبی و بالاخره آنتی‌توموری ناشی از این ترکیبات کینونی است (۳۳). مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ ترکیبات شیمیایی سیاه‌دانه *Nigella sativa* را با دستگاه GC مورد آنالیز قرار داد مشخص نمود که آلکالوئید تیموکوئینون بیشترین درصد این دانه‌ها را تشکیل می‌دهد و در درمان کیست هیداتیک بسیار مفید است. لذا خواص مفید سیاه‌دانه به علت وجود ترکیبات کینونی آن مثل تیموکوئینون و دی‌هیدروکینون است (۳۴).

در مطالعه حاضر نتایج مربوط به اثرات سیتوتوکسیک تیموکوئینون بر روی سلول‌ها با استفاده از روش MTT و اثر آن بر میزان پرولیفراسیون سلولی با تست کولونی زایی نشان داد که تیموکوئینون دارای اثرات سیتوتوکسیک و ضد تکثیری معنی‌داری بر روی سلول‌های سرطانی پروستات میان گروه‌های

سرطان‌ها نظیر کولون و یا معده نیز کار شده‌اند و نتایجی هم‌راستا با نتایج این مطالعه داشته‌اند. لذا این نتایج سبب قوی‌تر شدن این فرضیه خواهد بود که تشخیص اثرات مهارتی تیموکوئینون بر سلول‌های سرطانی در سطوح مورفولوژیک و نه مولکولی و بدون استفاده از روش‌های پیچیده و هزینه‌بر امکان‌پذیر است. معمولاً از عیوب مطالعه عصاره‌های گیاهی یا ترکیبات مشتق از آن‌ها نوع روش‌ها و مسیر استانداردسازی و در نظر گرفتن تأثیر ترکیبات مداخله‌ای محیط کشت بر این ترکیبات است همچنین این مطالعات نیازمند تحقیقات بیشتر آزمایشگاهی در خصوص مکانیسم و چگونگی تأثیر تیموکوئینون بر روی مسیرهای درون‌سلولی، تأثیر بر انواع دیگر سرطان و مطالعه در مدل‌های حیوانی جهت مطالعات پیش‌کلینیکی است.

نتیجه‌گیری

همان‌طور که مشاهده می‌شود یافته‌های این پژوهش با یافته‌های دیگران در مورد اثرات ضد سرطانی ترکیب تیموکوئینون بر روی سلول‌های سرطانی تا حدی مشابه است. به نظر می‌رسد که در صورت شناسایی و مطالعات تکمیلی اثرات آن می‌توان در آینده از آن در درمان سرطان استفاده نمود. با توجه به نتایج حاصل، تیموکوئینون حاوی خواص سیتوتوکسیک، آپوپتوتیک و ضد مهاجرتی بوده و کاندید مناسبی جهت استفاده از آن در بهبود و درمان سرطان است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی دانشجویی به شماره نامه تأیید ۱۶/۳۵/۹/۳۵۲ پ است. بدین‌وسیله نویسندگان از مرکز پژوهش دانشجویان زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی همدان که اعتبار اجرای طرح را تأمین نموده است قدردانی می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

آپوپتوز و مرگ سلول سرطانی گردد (۴۴).

نتایج مربوط به مهاجرت سلولی نشان داد که تیموکوئینون قادر است میزان و قدرت مهاجرت سلول‌های سرطانی را در گروه‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش دهد و این امر با یافته‌های دیگر دانشمندان مطابقت داشت (۴۵). مشخص شده است که مسیرهای MAPK/ERK و PI3K/AKT نقش‌های بسیار مهم و کلیدی در تنظیم میزان رشد، تکثیر، آپوپتوز و نیز قدرت تهاجم و مهاجرت سلولی و در نهایت قدرت متاستاز سلول‌های سرطانی داشته باشند (۴۶، ۴۷). به نظر می‌رسد که تیموکوئینون قادر است از طریق بلاکینگ و مهار PI3K/AKT در سلول‌های سرطانی سبب کاهش محسوسی در میزان مهاجرت و قدرت متاستازی سرطان گردد (۴۸). از طرف دیگر تیموکوئینون می‌تواند با کاهش بیان MAPK/ERK باعث کاهش بیان گیرنده‌های آندروژنی در سرطان پروستات وابسته به آندروژن گردد (۴۹، ۵۰). تیموکوئینون می‌تواند در مسیرهای مختلف سیگنالینگ سرطان مؤثر بوده و به‌خوبی ایفای نقش می‌کند. به‌عنوان مثال مشاهده شده است که این ترکیب قادر است با بیان و فعال نمودن ژن‌های سرکوب‌گر تومور سبب مهار تکثیر و رشد سلول سرطانی و نیز مهار آنژیوژنز و کنترل سرطان گردد (۵۱، ۵۲)؛ بنابراین مطالعات متعدد نشان می‌دهند که تیموکوئینون نقش کلیدی در توقف و مهار سرطان داشته و این اثر را از مسیرهای مختلف سیگنالینگ سرطان اعمال می‌کند. نوآوری این تحقیق این است که در این تحقیق متدهای بکار رفته نظیر colony formation assay و Cell migration Assay برای اولین بار در سرطان پروستات بررسی شده‌اند و همچنین این توانایی را ایجاد می‌کنند تا اثرات ضد سرطانی یک ترکیب مانند تیموکوئینون بدون بررسی ابعاد اثرات آن در سطوح مولکولی و پروتئینی بررسی گردیده و نتایج مشاهده شوند. لازم به ذکر است که این متدها در برخی

References

1. Pecorino L. Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics. Third edition. Oxford: Oxford university press; 2012. P.10-38.
2. Yu S, Yang CS, Li J, You W, Chen J, Cao Y, et al. Cancer prevention research in China. Cancer Prevention Research. 2015;8(8):662-74.

3. Sadjadi A, Nouraie M, Ali M, Mohagheghi M A, Mousav A, Malekezadeh R, Donald P. Cancer occurrence in Iran in 2002, an international perspective. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2005;6(3):359.
4. Thompson IM. Chemoprevention of prostate cancer: agents and study designs. *The Journal of urology*. 2007;178(3):S9-S13.
5. Abeer M, Wancai Y, Maarten C. Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2014;140:116-32.
6. Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical research*. 2008;25(9):2097-116.
7. Radziszewska A, Karczmarek-Borowska B, Grądalska-Lampart M, Filip A. Epidemiology, prevention and risk morbidity factors for lung cancer. *Polski merkuriusz lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. 2015;38(224):113-8.
8. Zhao M, He X-L, Teng X-D. Understanding the molecular pathogenesis and prognostics of bladder cancer: an overview. *Chinese journal of cancer research*. 2016;28(1):92.
9. Fan R, Kumaravel TS, Jalali F, Marrano P, Squire JA, Bristow RG. Defective DNA strand break repair after DNA damage in prostate cancer cells: implications for genetic instability and prostate cancer progression. *Cancer Research*. 2004;64(23):8526-33.
10. Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(2):724-31.
11. Chen Z, Wang Z-Y, Chen S-J. Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacology & therapeutics*. 1997;76(1-3):141-9.
12. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013;3(5):337-52.
13. Neill AS, Ibiebele TI, Lahmann PH, Hughes MC, Nagle CM, Webb PM, et al. Dietary phyto-oestrogens and the risk of ovarian and endometrial cancers: findings from two Australian case-control studies. *British Journal of Nutrition*. 2014;111(8):1430-40.
14. Varela-López A, Bullón P, Giampieri F, Quiles JL. Non-nutrient, naturally occurring phenolic compounds with antioxidant activity for the prevention and treatment of periodontal diseases. *Antioxidants*. 2015;4(3):447-81.
15. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*. 2005;5(13-14):1749-70.
16. Salomi N, Nair S, Jayawardhanan K, Varghese C, Panikkar K. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds. *Cancer letters*. 1992;63(1):41-6.
17. Amin B, Hosseinzadeh H. Black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: an overview on the analgesic and anti-inflammatory effects. *Planta Medica*. 2016;82:8-16.
18. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, et al. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. *Nutrition and cancer*. 2010;62(7):938-46.
19. Meral I, Yener Z, Kahraman T, Mert N. Effect of *Nigella sativa* on glucose concentration, lipid peroxidation, anti-oxidant defence system and liver damage in experimentally-induced diabetic rabbits. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2001;48(10):593-9.
20. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Toxicology*. 2000;143(3):219-26.
21. Yu Z, Li W, Liu F. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer letters*. 2004;215(2):159-66.
22. Ji Q, Zheng G-Y, Xia W, Chen J-Y, Meng X-Y, Zhang H, et al. Inhibition of invasion and metastasis of human liver cancer HCCLM3 cells by portulacacerebroside A. *Pharmaceutical biology*. 2015;53(5):773-80.
23. Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairi AA, Siddiqui MA. Cytotoxicity of *Nigella sativa* seed oil and extract against human lung cancer cell line. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):983-7.
24. Zheng H-X, Wu L-N, Xiao H, Du Q, Liang J-F. Inhibitory effects of dobutamine on human gastric adenocarcinoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2014;20(45):17092.
25. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*. 2006;1(5):2315.
26. Subedi B, Balakrishna K, Joshua DI, Kannan K. Mass loading and removal of pharmaceuticals and personal care products including psychoactives, antihypertensives, and antibiotics in two sewage treatment plants in southern India. *Chemosphere*. 2017;167:429-37.
27. Haghgi A, Azimi H, Rahimi R. A Comprehensive Review on Pharmacotherapeutics of Three Phytochemicals, Curcumin, Quercetin, and Allicin, in the Treatment of Gastric Cancer. *Journal of gastrointestinal cancer*. 2017;48(4):314-20.
28. Goodarzi MT, Khodadadi I, Tavilani H, Abbasi Oshaghi E. The role of *Anethum graveolens* L. (Dill) in the management of diabetes. *Journal of tropical medicine*. 2016; 16: 1-11.



29. Oshaghi EA, Khodadadi I, Tavilani H, Goodarzi MT. Aqueous extract of *Anethum Graveolens* L. has potential antioxidant and antiglycation effects. *Iranian journal of medical sciences*. 2016;41(4):328.
30. Shafiee G, Saidijam M, Tavilani H, Ghasemkhani N, Khodadadi I. Genistein induces apoptosis and inhibits proliferation of HT29 colon cancer cells. *International journal of molecular and cellular medicine*. 2016;5(3):178.
31. Ghiasvand T, Goodarzi MT, Shafiee G, Zamani A, Karimi J, Ghorbani M, et al. Association between seminal plasma neopterin and oxidative stress in male infertility: A case-control study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*. 2018;16(2):93.
32. Adlercreutz H. Phyto-oestrogens and cancer. *The lancet oncology*. 2002;3(6):364-73.
33. Ghosheh OA, Houdi AA, Crooks PA. High performance liquid chromatographic analysis of the pharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L.). *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1999;19(5):757-62.
34. Edris AE. The chemical composition and the content of volatile oil: potential factors that can contribute to the oxidative stability of *Nigella sativa* L. crude oil. *Journal of dietary supplements*. 2011;8(1):34-42.
35. Ait Mbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, Gamouh A, Aboufatima R, et al. Anti-tumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2007;40(6):839-47.
36. Swamy S, Tan B. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of ethnopharmacology*. 2000;70(1):1-7.
37. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, et al. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *International journal of oncology*. 2004;25(4):857-66.
38. Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug and chemical toxicology*. 2003;26(2):87-98.
39. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. 2000;14(5):323-8.
40. Musa D, Dilsiz N, Gumushan H, Ulakoglu G, Bitiren M. Antitumor activity of an ethanol extract of *Nigella sativa* seeds. *Biologia, Bratislava*. 2004;59(6):735-40.
41. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Wani AA. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *International journal of cancer*. 2005;117(3):409-17.
42. Maver T, Maver U, Stana Kleinschek K, Smrke DM, Kreft S. A review of herbal medicines in wound healing. *International journal of dermatology*. 2015;54(7):740-51.
43. Farah IO, Begum RA. Effect of *Nigella sativa* (*N. sativa* L.) and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. *Biomedical Sciences Instrumentation*. 2003; 39:359-364.
44. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly S. Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. *Journal of ethnopharmacology*. 2000;72(1-2):299-304.
45. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. *Toxicology Letters*. 1998;95(1):23-9.
46. Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, et al. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochemical pharmacology*. 2011;82(5):464-75.
47. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K-AKT pathway. *Clinical and Translational Oncology*. 2015;17(2):145-51.
48. Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, et al. The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *The EMBO journal*. 2000;19(23):6341-50.
49. Moon D-O, Lee K-J, Choi YH, Kim G-Y. β -Sitosterol-induced-apoptosis is mediated by the activation of ERK and the downregulation of Akt in MCA-102 murine fibrosarcoma cells. *International immunopharmacology*. 2007;7(8):1044-53.
50. Yoshimoto M, Cutz J-C, Nuin PA, Joshua AM, Bayani J, Evans AJ, et al. Interphase FISH analysis of PTEN in histologic sections shows genomic deletions in 68% of primary prostate cancer and 23% of high-grade prostatic intra-epithelial neoplasias. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2006;169(2):128-37.
51. Hong S-K, Kim J-H, Lin M-F, Park J-I. The Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway can mediate growth inhibitory and differentiation signaling via androgen receptor downregulation in prostate cancer cells. *Experimental cell research*. 2011;317(18):2671-82.
52. Arafa E-SA, Zhu Q, Shah ZI, Wani G, Barakat BM, Racoma I, et al. Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;706(1):28-35.

Original Article

The Evaluation of the Effects of Cytotoxic, Anti-proliferative and Anti-migrative Effects of the Thymoquinone on PC3 Prostate Cancer Cell Line

Khodadadi I, Shafiee Gh*

Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Received: 18 Apr 2018

Accepted: 07 Nov 2018

Abstract

Background & Objective: Herbal medicine and their composition are widely used for different therapeutic purposes. Therefore, this study was designed to evaluate of the anti-proliferation and anti-migration effects of Thymoquinone (TQ), an active part of *Nigella sativa*, on PC3 prostate cancer cells.

Materials & Methods: In this experimental study, PC3 prostate cancer cells were treated with 0, 10, 30, 50, 70 and 90 μM concentrations of thymoquinone for 12, 24 and 48 hours and cell viability was determined by MTT assay. IC50 concentration of thymoquinone was obtained as 40 μM concentration of thymoquinone and 24h incubation time. PC3 cell migration was studied using the cell migration assay. Colony formation assay was used to determine cell proliferation and Gimsa staining was performed to observe morphological changes of the cells.

Results: The IC50 of Thymoquinone was found in concentration of 40 μM at 24h treatment. Thymoquinone significantly ($p < 0.05$) inhibited cell growth and proliferation as well as cell migration. Treatment of PC3 cells with 40 μM thymoquinone showed significant changes in nucleus and cytoplasm of the cells which are representative of apoptosis and cell death.

Conclusion: Thymoquinone has significant anti-proliferative and anti-migrative effects on prostate PC3 cells and therefore may be used as a complementary agent for prevention of prostate cancer.

Keywords: Prostatic neoplasms, Thymoquinone, Migration, Colony formation

*Corresponding Author : Shafiee Gholamreza, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

Email: g.r_shafiee@yahoo.com

<https://orcid.org/0000-0003-2183-5122>