

تأثیر عصاره الکلی سیاهدانه بر میزان پرولیفریشن و آپوپتوزیس سلول های سرطانی کلیه رده ACHN

نقیسه السادات طبسی*، دکتر ابوالفضل خواجهی راد**، دکتر محمود محمودی***، دکتر جواد بهارآرا†، دکتر مریم راستین††، دکتر مجتبی حسین پور مشهدی†††، اکرم شیخ♦، شهرزاد زمانی تقی زاده رابع♦، آریتا آقایی♦♦، بی بی مرضیه احدی♦♦♦

*کارشناس ارشد فیزیولوژی - مرکز تحقیقات ایمونولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، **استادیار گروه فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ***استاد گروه ایمونولوژی - مرکز تحقیقات ایمونولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، †استادیار گروه زیست شناسی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ††مرکز تحقیقات ایمونولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، †††استادیار گروه علوم دامی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، ♦کارشناس ارشد ایمونولوژی - مرکز تحقیقات ایمونولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ♦♦کارشناس ارشد فیزیولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ♦♦♦کارشناس زیست شناسی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۴ تاریخ تایید: ۸۹/۴/۷

چکیده:

زمینه و هدف: سیاه دانه (*Nigella sativa*) گیاهی از تیره آلاله، علفی، یک ساله یا پایا است. ترکیبات این گیاه دارای خواص ضد سرطانی هستند. این مطالعه با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر روی رشد سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN و سلول های غیر سرطانی سالم رده L929 انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی غلظت های مختلف عصاره الکلی سیاهدانه در محیط کشت، روی سلول های ACHN و L929 اثر داده شد. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده با میکروسکوپ معکوس ارزیابی گردید. با آزمون MTT اثر غلظت های عصاره بر درصد سلول های زنده هر دو رده سلولی در زمان های مذکور، از نظر کمی بررسی شد. بررسی میزان آپوپتوز با کیت فسفاتیدیل سرین با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری مشخص گردید. داده ها با استفاده از آنالیز آماری واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی Tukey آنالیز شد.

یافته ها: نتایج آزمون MTT نشان داد که غلظت های ۷۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و بالاتر عصاره بر سلول های رده ACHN و غلظت های ۱۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و بالاتر عصاره بر روی سلول های رده L929 موجب کاهش معنی دار تعداد سلول های زنده ACHN و L929 می گردد ($P < 0/05$). نتایج بدست آمده از فلوسیتومتری نشان داد که حداکثر میزان آپوپتوز در رده سلولی ACHN در غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ بوده که این میزان برابر ۹۲٪ بود و حداکثر میزان آپوپتوز در سلول های رده L929 در غلظت ۱۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دیده شد که این میزان برابر ۸۹٪ و هر دو در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد ($P < 0/001$).

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این پژوهش عصاره الکلی سیاهدانه دارای اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک بر سلول های سرطانی رده ACHN در مقایسه با سلول های سالم L929 است. لذا می توان عصاره الکلی سیاهدانه را به عنوان ترکیبی با اثرات سایتوتوکسیک روی سلول های سرطانی در درمان سرطان کلیه پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی: آپوپتوتیک، سلول های ACHN، سلول های L929، سایتوتوکسیک، سیاهدانه، عصاره الکلی، فلوسیتومتری.

مقدمه:

ریه ها، استخوان، کبد، مغز و کلیه طرف مقابل متاستاز می دهند و یک سوم بیماران در زمان تشخیص دچار متاستاز شده اند درمان تومورهای کلیوی توسط جراحی

شایع ترین نوع تومور کلیه آدنوکارسینوم سلول های کلیه است که ۸۵ درصد کل تومورهای کلیوی را به خود اختصاص می دهد. این تومورها به طور اولیه به

^۱ نویسنده مسئول: مشهد - پردیس دانشگاه - بلوار وکیل آباد - گروه فیزیولوژی - تلفن: ۰۹۱۵۳۰۱۱۴۶۸ - E-mail: khajavirada@mums.ac.ir

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی عصاره گیری با استفاده از روش شناخته شده سوکسله انجام شده برای این منظور ۱۰۰ گرم از بودر سیاهدانه با ۴۹۰ cc الکل ۹۶ درصد توسط دستگاه سوکسله عصاره گیری شد. عصاره از فیلتر سرنگی $0.2 \mu\text{m}$ عبور داده تا استریل شود. برای تعیین وزن خشک عصاره استریل، ۱۰ میلی لیتر از آن در پلیت با وزن معلوم ریخته و روی بن ماری ۷۰ درجه سانتی گراد الکل آن تبخیر شد و سپس با ترازوی دیجیتال سارتروس با دقت 0.0001 گرم توزین گردید.

بررسی مورفولوژیک: ابتدا هر دو رده سلولی از تانک ازت خارج و مرحله یخ زدایی سلول ها انجام شد. پس از انجام یک دوره پاساژ سلولی و تعیین Viability سلول ها با استفاده از تست تریان بلو، ۳ فلاسک کشت ۲۵ میلی لیتری برای سلول های ACHN و سه فلاسک کشت مشابه نیز برای سلول های L929 در نظر گرفته شد. محیط کشت فلاسک ها از نوع DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ۱ درصد پنی سیلین - استرپتومایسین بود (۱۷). فلاسک ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت که سلول ها به کف فلاسک کشت چسبیدند مرحله اثر دادن عصاره بر سلول ها به این ترتیب انجام شد: از پلیت ۹۶ خانه برای انجام آزمایش استفاده شد. برای سلول های ACHN سه پلیت و برای هر غلظت، سه خانه در نظر گرفته شد برای سلول های L929 نیز به همین صورت عمل شد. در هر خانه ۵۰۰۰ سلول به همراه ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه کرده (۱۶) و ۲۴ ساعت بعد زمانی که سلول ها به کف خانه ها چسبیدند محیط کشت هر خانه خالی گردید. با استفاده از محیط کشت استریل از عصاره غلظت های 0 ، 50 ، 250 ، 750 ، 1250 و 1750 تهیه شد و با توجه به اینکه تست به صورت سه تایی انجام شد به هر سه خانه $200 \mu\text{l}$ از هر غلظت اضافه گردید. برای سلول های L929 نیز به همین ترتیب عمل کردیم. سپس همه پلیت ها

همراه شیمی درمانی، هورمون درمانی و اشعه درمانی انجام می شود. از دیر باز تاثیر عصاره های مختلف گیاهی در درمان بیماری ها شناخته شده بود (۱). گیاه سیاهدانه (*Nigella Sativa*) گیاهی از تیره علفی آلاله و دارای گل هایی به رنگ سفید شیری می باشد. دانه های آن تیره و سه گوش و له شده آن بویی شبیه زیره دارد (۲). کاربردهای درمانی سیاهدانه از قرن ها پیش شناخته شده است (۳). از این گیاه به طور گسترده به خاطر اثرات آنتی بیوتیکی، اختلالات گوارشی و کبدی، درمان انگل های گوارشی، تحریک متابولیسم و درمان افسردگی استفاده می شده است (۴،۵). در پژوهش های متعدد مشخص شده که سیاهدانه و ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون (۶،۷) دارای اثرات ضد سرطانی در کولون، سینه، پوست، رحم و کبد می باشد (۸،۹). همچنین سیاهدانه دارای اثرات قلبی عروقی (۱۰،۱۱) و تحریک پاسخ ایمنی (۸) و اثرات آنتی اکسیدانی و ضد التهابی (۱۲) می باشد. مطالعات مختلف نشان داده که ترکیبات سیاهدانه می تواند میزان قند خون را در خرگوش ها کاهش دهد (۱۳). همچنین تیموکینون هم بر روی انباشت چربی در نفرت های حاصل از دوکسرویین تاثیر مثبت دارد (۱۴). اثرات ضد دردی و تسکینی که بر سیستم اعصاب مرکزی (CNS) در اثر مصرف اسانس سیاهدانه بوجود آمده به علت وجود ترکیبات اپیوئیدی در آن است (۱۰). خواص مفید سیاهدانه به علت وجود ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون و دی هیدروکینون می باشد. اثرات ضد سرطانی (۱۵) سیاهدانه به علت ایجاد القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی بوجود می آید (۱۶). تاکنون در مورد اثرات آپوپتوتیک و سایتوتوکسیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی کلیه گزارشی منتشر نشده است، لذا در این مطالعه اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر رشد سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN و نیز سلول های فیروبلاست موشی رده L929 به عنوان سلول غیر سرطانی مورد بررسی و با یکدیگر مقایسه گردید.

داده، سپس ۱۰ میکرولیتر از Annexin V را با ۱۰۰ میکرولیتر سلول مخلوط کرده، ۲۰ دقیقه در تاریکی و روی یخ انکوبه شد، سپس سلول‌ها را شسته و ۱۰ میکرولیتر رنگ پروپیديوم ایوداید (PI) به آن اضافه و ۱۰ دقیقه در تاریکی روی یخ انکوبه کردیم و نمونه‌ها با فلوسیتومتری مدل (Becton Dickinson. Facs caliber-USA) آنالیز شدند. در این روش سلول‌هایی که دچار آپوپتوز اولیه شده بودند فقط رنگ Annexin V را گرفتند و سلول‌هایی که دچار آپوپتوز ثانویه شدند و دیواره سلولی آنها اندکی نفوذ پذیر شده با دو رنگ Annexin V و رنگ PI رنگ شده و سلول‌هایی که دچار نکروز شده فقط رنگ PI را به خود گرفتند و هر کدام در Plot فلوسیتومتری جداگانه قرار گرفته و به این ترتیب دسته‌های مختلف سلولی جدا شدند. (در این تست دامنه غلظت‌ها وسیع‌تر در نظر گرفته شد).

داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه، آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $P < 0.05$ معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها:

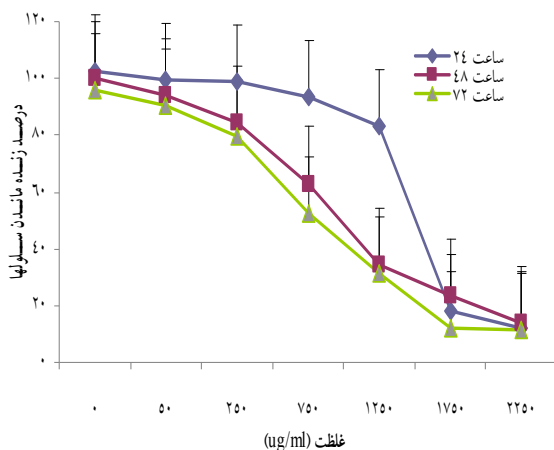
نتایج بررسی مورفولوژی: بر اساس مشاهده سلول‌های ACHN با میکروسکوپ، پس از ۲۴ ساعت عصاره الکلی سیاهدانه با غلظت‌های ۷۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و بالاتر در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل ACHN باعث شد که سلول‌ها از کف بستر خود کنده شده و از حالت دوکی شکل به صورت گرد درآیند.

ارزیابی مورفولوژی سلول‌های L929 یعنی سلول‌های غیر سرطانی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت اثر عصاره الکلی سیاهدانه با غلظت ۱۲۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و بالاتر سبب غیر طبیعی شدن مورفولوژی سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل L929 گردید. در غلظت ۷۵۰ $\mu\text{g/ml}$ از عصاره الکلی سیاهدانه سلول‌های رده L929 تغییر چندانی نشان ندادند. ضمناً مقایسه سلول‌های رده ACHN با رده

در انکوباتور قرار داده شد و پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس بررسی و مشاهدات ثبت گردید. این گونه ارزیابی مورفولوژیک سلولی، برای هر غلظت از عصاره ۳ بار تکرار شد تا اطمینان کافی از نتایج بدست آمده حاصل گردد.

آزمون MTT از هر رده سلولی ACHN و L929، پس از انجام پاساژ و تعیین Viability یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت با همان ویژگی‌های قبلی تهیه شد که در هر میلی‌لیتر آن $2/5 \times 10^4$ سلول وجود داشت. برای این آزمون ۳ پلیت ۹۶ خانه‌ای برای هر رده سلولی در نظر گرفته شد در هر خانه $0.2 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون سلولی مزبور در نظر گرفته شد. بنابراین هر خانه حاوی ۵۰۰۰ سلول بود. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها به بستر خود بچسبند پس از طی این مدت مرحله مجاور کردن سلول‌ها با عصاره به این ترتیب انجام شد: با استفاده از محیط کشت استریل از عصاره غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۲۵۰، ۱۵۰۰، ۱۷۵۰ و ۲۰۰۰ تهیه شد و با توجه به اینکه تست به صورت سه تایی انجام می‌شود به هر سه خانه $200 \mu\text{l}$ از هر غلظت اضافه می‌شود. برای سلول‌های L929 نیز به همین ترتیب عمل شد. محیط کشت این پلیت‌ها را پس از ۲۴ ساعت خالی کرده و ۲۰۰ میکرولیتر محیط تازه همراه با ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT (4,5-dimethyl diphenyl tetrazolium bromide) اضافه و ۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ MTT خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) جایگزین آن شد و جذب نوری هر خانه توسط دستگاه Eliza reader و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۱۸).

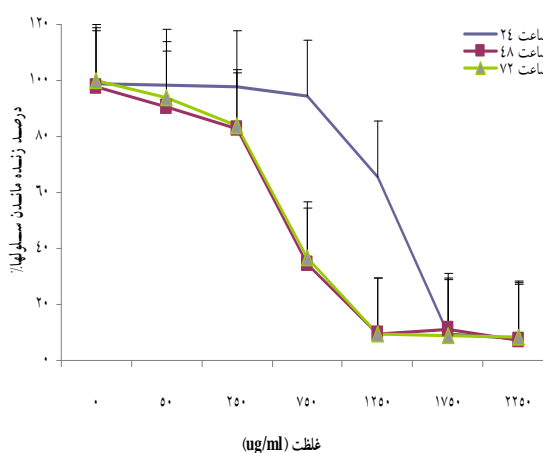
فلوسیتومتری: طبق دستور کیت (Phosphatidyl serine Detection- IQP-116F) ساخت کشور هلند از پلیت‌های ۲۴ خانه و تعداد 3×10^5 سلول استفاده شد و به همان روشی که در تست MTT بیان شد سلول‌ها را در پلیت کشت دادیم، سپس سلول‌ها را پس از ۴۸ ساعت (۱۶) با EDTA-Tripsin از کف خانه‌ها جدا کرده و ۲ بار با بافر کلسیم شستشو



نمودار شماره ۲: تاثیر عصاره الکلی سیاه دانه در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول های L929

($P < 0.05$). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش معنی دار درصد سلول های زنده L929 نسبت به گروه کنترل از غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۷۵۰ به بالاتر عصاره مشاهده شد ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲). تاثیر افزایش غلظت عصاره الکلی سیاهدانه و همچنین افزایش زمان در هر دو رده سلولی ACHN و L929 بر کاهش درصد زنده ماندن سلول ها در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۷۵۰ و بالاتر عصاره در رده سلولی ACHN و در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱۲۵۰ و بالاتر عصاره در رده L929 نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) آنها مشخص است ($P < 0.05$). همچنین مقایسه اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر روی هر دو رده سلولی نشان داد، در زمان های مشابه تیمار با عصاره الکلی سیاهدانه در غلظت های ($\mu\text{g/ml}$) ۷۵۰ و بالاتر عصاره رده سلولی ACHN نسبت به رده سلولی L929 در همین غلظت ها دارای کاهش بیشتری در درصد زنده ماندن سلول ها بود ($P < 0.05$).

نتایج فلوسیتومتری: میزان آپوپتوز اولیه در زمان ۴۸ ساعت در سلول های ACHN در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱۰ و بالاتر از عصاره الکلی سیاهدانه نسبت به گروه کنترل (بدون تیمار) ACHN و نسبت به رده سلولی L929 افزایش معنی داری داشت ($P < 0.001$). حداکثر درصد آپوپتوز اولیه در سلول های ACHN در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱۲۵۰ که برابر ۹۲/۹۶ درصد بود. در سلول های L929 حداکثر درصد آپوپتوز اولیه در



نمودار شماره ۱: تاثیر عصاره الکلی سیاه دانه در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر سلول های رده ACHN

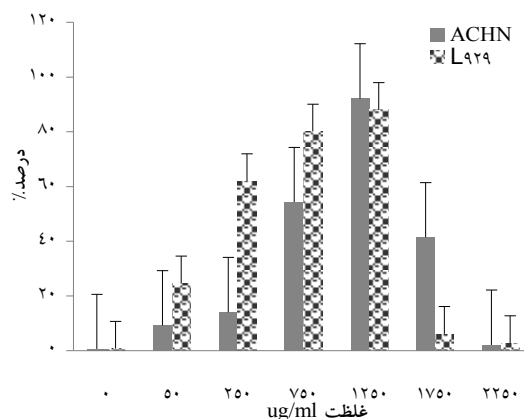
L929 در هر غلظت نیز بیانگر تاثیر شدیدتر عصاره سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN بود. نتایج آزمون *MTT* جذب نوری ثبت شده از خانه های حاوی سلول هایی که در مجاورت عصاره بودند، با جذب نوری خانه هایی که تحت تاثیر عصاره نبودند (خانه های کنترل) مقایسه گردید و درصد سلول های زنده با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{جذب نوری سلولهای تحت تاثیر عصاره در هر خانه}}{\text{درصد سلول های زنده نسبت به سلولهای کنترل میانگین جذب نوری خانه های حاوی سلولهای کنترل}}$$

کاهش درصد سلول های زنده در رده ACHN نسبت به گروه کنترل سلول های ACHN در زمان ۲۴ ساعت در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۷۵۰ و بالاتر عصاره الکلی سیاهدانه مشاهده شد که این کاهش معنی دار بود ($P < 0.05$). پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش درصد سلول های زنده نسبت به گروه کنترل سلول های ACHN در غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۷۵۰ و بالاتر عصاره الکلی سیاهدانه مشاهده شد که این کاهش معنی دار بود ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱). پس از گذشت ۲۴ ساعت از تاثیر عصاره الکلی سیاهدانه، کاهش معنی دار درصد سلول های زنده رده L929 نسبت به گروه کنترل از غلظت ($\mu\text{g/ml}$) ۱۲۵۰ به بالاتر مشاهده شد که این اختلاف نسبت به گروه کنترل معنی دار بود.

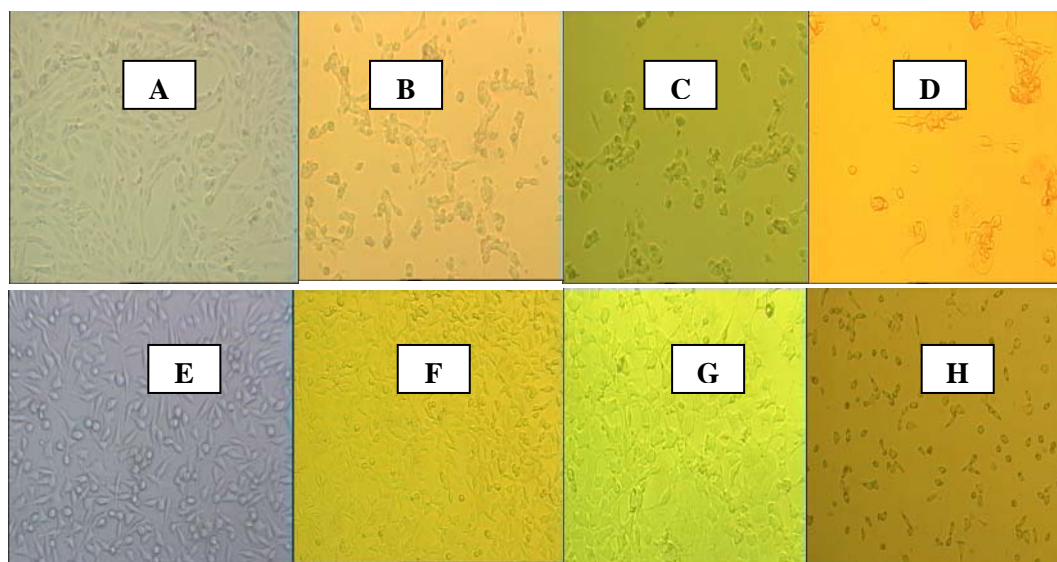
از مقداری که حداکثر درصد آپتوز اولیه را ایجاد می کند سلول های هر دو رده را به نحو تقریباً مشابهی به سمت نکروز سلولی پیش می برد (تصویر شماره ۱).

ضمناً در روش فلوسیتومتری درصد آپتوز اولیه سلول های رده ACHN در غلظت $10 \mu\text{g/ml}$ و سلول های رده L929 در غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ از عصاره الکلی سیاهدانه نسبت به سلول های کنترل همان رده افزایش معنی داری داشت ($P < 0.05$) که می تواند بیانگر دقت بیشتر روش فلوسیتومتری نسبت به روش های بررسی مورفولوژیک و آزمون MTT در مطالعات مشابه بوده و از طرفی ترجیح اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر روند آپتوز نسبت به نکروز سلولی را پیشنهاد نماید. همچنین با کمک این روش و استفاده از کیت فسفاتیدیل سرین و پرویدیم آیداید توانایی جداسازی سلول های حاصل از آپتوز اولیه و نکروز وجود داشت در حالی که در تست MTT و روش مورفولوژی این امکان وجود نداشت.



نمودار شماره ۳: تاثیر عصاره الکلی سیاهدانه بر آپتوز اولیه سلول های L929, ACHN

غلظت های $1500 \mu\text{g/ml}$ که برابر $89/90$ درصد بود. میزان آپتوز اولیه در سلول های از غلظت $50 \mu\text{g/ml}$ نسبت به گروه کنترل L929 معنی دار بود ($P < 0.001$) (نمودار شماره ۳). اثر آپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN بیشتر و با سلول های سالم رده L929 قابل مقایسه است و ثانیاً افزایش غلظت عصاره بالاتر



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپی مقایسه سلول های ACHN و L929 پس از ۲۴ ساعت در مجاورت با عصاره غلظت های $0, 750, 1250$ و $2250 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه.

- A- سلول های ACHN در غلظت $0 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- B- سلول های ACHN در غلظت $750 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- C- سلول های ACHN در غلظت $1250 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- D- سلول های ACHN در غلظت $2250 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- E- سلول های L929 در غلظت $0 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- F- سلول های L929 در غلظت $750 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- G- سلول های L929 در غلظت $1250 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه
- H- سلول های L929 در غلظت $2250 \mu\text{g/ml}$ عصاره الکلی سیاهدانه

بحث:

نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره الکلی سیاهدانه بر رده ACHN دارای اثر آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک است ضمن اینکه شروع اثر و شدت اثر بین سلول های این رده و رده سالم L929 متفاوت است. ضمناً این نتایج پیشنهاد می کند که تاثیرات مناسب درمانی عصاره در محدوده غلظت و چهارچوب زمانی مشخصی بوده که نیاز به بررسی بیشتری در این زمینه وجود دارد. مقایسه نتایج حاصل از تست MTT و روش فلوسیتومتری نشان داد که غلظت هایی از عصاره که با درصد بالایی از آپوپتوز در فلوسیتومتری همراه بودند باعث کاهش معنی داری در میزان زنده ماندن سلول ها در نتایج حاصل از تست MTT نیز می شوند. با توجه به اینکه سلول های سرطانی انسانی ACHN از نوع اپی تلیال می باشد و سلول های رده L929 سلول های فیروبلست موشی است، این احتمال نیز وجود دارد که مقایسه سلول های ACHN با یک رده اپی تلیال سالم ما را به قضاوت بهتری در مورد نحوه اثر و غلظت موثر عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی رده ACHN برساند.

اثرات مهاری عصاره الکلی سیاهدانه و ترکیبات موثره آن مثل تیموکینون بر روی چندین رده از سلول های سرطانی در بافت های مختلف انسان و حیوان مانند سلول های کبدی (۱۹)، سلول های کولونی (۲۰)، سلول های سرطان سینه (۲۱)، سلول های فیبرین سارکوما (۲۲) دارای خاصیت ضد تکثیر سلول های سرطانی یا به عبارتی ضد سرطانی می باشد. همچنین در مورد سلول های معده (۲۳)، سلول های خونی و سلول های قلبی (۲۴) نیز دارای اثرات آپوپتوتیک و کاهنده اثرات سمی دارویی در درمان های متداول سرطان ها می باشد. برای توجیه اثرات ضد سرطانی عصاره الکلی سیاهدانه و ترکیبات کینونی موجود در آن، مکانیسم های مختلفی پیشنهاد شده است که بخشی از آن مربوط به تاثیر بر فعالیت آنزیم ها، دفع رادیکال های آزاد، مهار پرولیفراسیون سلولی، تغییر میزان گلوکوتایون داخل

سلولی، فعالیت آنتی اکسیدانی (۲۵) و شکار رادیکال های آزاد (۲۶) و نیز القا آپوپتوزیس در سلول های سرطانی از طریق مسیرهای وابسته به P53 و مسیر غیر وابسته به P53 می باشند (۲۹-۲۴).

به نظر می رسد که در میان این مکانیسم ها، القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی از مهمترین مکانیسم های موثر در فعالیت ضد سرطانی عصاره الکلی سیاهدانه می باشد (۲۴، ۱۸) که یافته های این بررسی نیز آن را تایید می کند.

همچنین مطالعات قبلی اثرات تیموکینون بر روی سلول های سرطانی کولون، شامل: مهار رشد سلول های سرطانی کولون، تغییرات مورفولوژیک سلول ها و نیز افزایش درصد آپوپتوز را نشان داد (۱۶). که این بررسی ها تایید کننده نتایج حاصل از مطالعه اخیر مربوط به اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر سلول های سرطانی کلیه رده ACHN می باشد.

نتیجه گیری:

این تحقیق برای اولین بار توانست نقش آپوپتوتیک و ضد تکثیر سلولی عصاره الکلی سیاهدانه را با تاثیر بر روی سلول های سرطانی کلیه رده ACHN در مقابل سلول های غیر سرطانی L929 نشان دهد که این تاثیر با مکانیسم آپوپتوزیس فعال و پیش می رود. تحقیقات بیشتر جهت شناختن مکانیسم سلولی و ملکولی عملکرد عصاره الکلی سیاهدانه بر مسیر آپوپتوزیس لازم می باشد.

تشکر و قدردانی:

بخشی از هزینه این پژوهش توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین گردید که به این وسیله تشکر و قدردانی می شود. همچنین از خانم ها بروک و قاسمی به خاطر همکاری های صمیمانه در انجام این پژوهش تشکر می گردد.

منابع:

1. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. J Ethnopharmacol. 2000 Apr; 70(1): 1-7.
2. Rojhan MS. Healing with medicine plants. Tehran: Alavi Pub; 2003. p: 157-9.
3. Zargari-Ali. Medicine plants. Tehran: University of Tehran Press; 1992. p: 43-5.
4. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seeds. Int Immunopharmacol. 2005 Dec; 5(13-14):1749-70.
5. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of *Nigella sativa* proteins fractionated by ion exchange chromatography. Int J Immunopharmacol. 1999 Apr; 21(4): 283-95.
6. Nergiz C, Otels S. Chemical composition of *Nigella sativa* seeds. Food Chem. 1993; 48: 259-61.
7. 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.). J Pharm Biomed Anal. 1999 Apr; 19(5): 757-62.
8. Salomi NJ, Nair SC, Javawardhanan KK, Varghese CD, Panikkar KR. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds. Cancer Lett. 1992 Mar; 63(1): 41-6.
9. Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The invitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. Anticancer Res. 1998 May-Jun; 18(3A): 1527-32.
10. Agarwal R, Kharya MD, Shrivastava R. Pharmacological studies of essential oil and unsaponifiable matter of seeds of *Nigella sativa*. Indian J Pharmacological Sci. 1979; 41: 248-510.
11. Aqel M. The relaxant effect of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds on vascular smooth muscle. Jordan Ser B. 1995; 19: 91-100.
12. Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. J Ethnopharmacol. 2001 Jun; 76(1): 45-8.
13. 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. J Vet Med Physiol Pathol Clin Med. 2001 Dec; 48(10): 593-9.
14. Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. Toxicology. 2000 Mar; 14(3): 219-26.
15. 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. Braz J Med Biol Res. 2007 Jun; 40(6): 839-47.
16. 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. Int J Oncol. 2004 Oct, 25(4): 857-66.
17. Freshnry RI. Culture of animal cell: manual of basic technique. 4th ed. New York: Wily-Liss Pub. 2000. p: 550-70.
18. Shoeib AM, Elgayyar M, Dudrich P, Bell J. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. Int J Oncol. 2003; 22: 107-13.
19. Daba MH, Abdel-Rahman MS. Hepatoprotective activity of thymoquinone in isolated rat hepatocytes. Toxicology Lett. 1998 Mar; 95(1): 23-9.
20. Salim EI, Fukushima S. Chemopreventive potential of volatile oil from black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. Nutr Cancer. 2003; 45(2): 195-202.

21. Farah IO, Begum RA. Effect of *Nigella sativa* L. and oxidative stress on the survival pattern of MCF-7 breast cancer cells. Biomed Sci Instrum. 2003; 39: 359-64.
22. Award EM. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrin sarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. Phytomedicine. 2005 Jan; 12(2): 100-7.
23. El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim MA, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil on gastric secretion and ethanol induced ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2000 Sep; 72(1-2): 299-304.
24. Muhtasib H, Roessner A, Schneider R. Thymoquinone: a promising anti-cancer drug form natural sources. Int J Bioche & Cell Biol. 2006 Nov; 38(8): 1249-53.
25. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent super oxide anion scavenger. Drug Chem Toxicol. 2003 May; 26(2): 87-98.
26. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa*. Pharm Bull. 2000; 24: 307-10.
27. Musa D, Dilsiz N, Gumushan H, Bitiren M. Antitumor activity of an ethanol extracts of *Nigella sativa* seeds. Biologia (Bratisl). 2004; 59(6): 735-40.
28. 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. Int J Cancer. 2005; 117: 409-17.
29. Abul-Nasr SM, El-Shafey MD, Osfor MM. Amelioration by *Nigella sativa* L. of methotrexate-induced toxicity in mail albino rate: a biochemical hematological and histological study. Scintia Agricul Bohem. 2001; 32: 123-60.

Received: 15/Sep/2009

Accepted: 28/Jun/2010

The effects of *Nigella sativa* ethanolic extract on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma ACHN cell line

Tabasi NS (MSc)*, Khajavi-Rad A (PhD)**¹, Mahmoudi M (PhD)***,
Bahar-Ara J (PhD)†, Rastin M (PhD)††, HosainPour-Mashhadi M (PhD)†††,
Shaikh A (MSc)◆, Zamani-Taghizade Rabe Sh (MSc)◆, Aghaei A (MSc)◆◆,
Ahadi BM (BSc)◆◆◆

*Immunology Research Center, Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran,

**Assistant professor, Physiology Dept., Mashhad Univ. of Med. Sci.

Mashhad, Iran, ***Professor, Immunology Dept., Immunology Research

Center, Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran, †Assistant professor,

Biology Dept., Islami Azad Univ Mashhad Branch, Mashhad, Iran,

††Immunology Research Center, Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran,

†††Assistant professor, Animal Science Dept., Islami Azad Univ, Mashhad Branch,

Mashhad, Iran, ◆Immunology Research Center, Mashhad Univ. of Med. Sci.

Mashhad, Iran, ◆◆Biophysics Dept., Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran,

◆◆◆Physiology Dept., Mashhad Univ. of Med. Sci. Mashhad, Iran..

Background and aims: Black seed (*Nigella sativa*), belongs to Ranunculaceae family. It has various functions, including immuno-modulatory, anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-neoplastic effects. Anticancer properties of NS compounds are related to their cytotoxic and apoptotic effects. In this study, cytotoxic and apoptotic effects of ethanol: extract of NS was investigated on human kidney cancer cell line (ACHN) and normal cell line (L929).

Methods: NS ethanolic extract at 0, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 and 2000µg/ml concentrations were prepared and studied in culture mediums of ACHN and L929 cells. After 24, 48 and 72h, morphologic changes and MTT assay were performed in both cell lines. Indeed, early and late apoptosis were studied by phosphatidyl serine kit employing flow cytometry technique.

Results: After 24h, NS extract at 750 µg/ml and higher concentrations caused morphological changes and also reduced percentage of alive cells significantly ($P<0.05$) in ACHN cells compared with L929 cells that showed similar changes at 1250µg/ml and higher concentrations. After 48 and 72h, these effects were more prominent. MTT assay results, showed that NS concentration of 750 µg/ml and higher doses reduce percentage of alive ACHN cells ($P<0.05$). L929 cells showed similar changes at 1250µg/ml and higher concentrations ($P<0.05$). Maximum apoptosis in ACHN cells was happened at 1000 & 1250µg/ml (92%) compared with L929 cells that showed maximum apoptosis at 1500µg/ml (89%). Indeed, both cell lines showed a significant increase in apoptosis compared with their control groups ($P<0.001$).

Conclusion: NS ethanolic extract can may be useful as a cytotoxic and chemotherapeutic agent in kidney cancer treatment.

Keywords: Apoptotic, ACHN cell line, Cytotoxic, Ethanolic extract, Flow cytometry, L929 cell line, *Nigella sativa*.

¹Corresponding author:

Physiology Dept., Mashhad
Univ. of Med. Sci. Vakilabad
St. Pardis, Mashhad, Iran.

Tel:

09153011468

E-mail:

khajavirada@mums.ac.ir