

## بررسی اثر عصاره الکلی گیاه سیاهدانه (*Nigella sativa L*) بر القای مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های سرطانی رده HL-60

مریم رحیمی <sup>\*</sup>Ph.D.، آرش بابایی Ph.D.

- دانشگاه ملایر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، ملایر، ایران

\* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.rahimi @malayeru.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۴

### چکیده

**هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره الکلی سیاهدانه بر روی سلول‌های سرطانی HL-60 بود.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی غلظت‌های ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره الکلی سیاهدانه در محیط کشت، روی سلول‌های سرطانی HL-60 به مدت ۲۴ ساعت اثر داده شد. برای بررسی درصد سلول‌های زنده از آزمون MTT استفاده شد. همچنین برای تعیین این‌که آیا عصاره الکلی سیاهدانه تکثیر سلول‌های HL-60 را از طریق تنظیم پیشرفت چرخه سلولی و آپوپتوزیس مهار می‌کند، ابتدا با استفاده از رنگ‌آمیزی PI فلوسایتومتری انجام شد، سپس رنگ‌آمیزی AO/EB سلول‌های HL-60 برای تشخیص الگوهای آپوپتوزیس و نکروزیس انجام شد.

**نتایج:** آزمون MTT نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، عصاره الکلی سیاهدانه در غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌های HL-60 شد و در غلظت‌های بالاتر وابسته به غلظت باعث مرگ بیشتر سلول‌ها شد، همچنین افزایش معنی‌داری در سلول‌های فاز G0/G1 از ۱۵/۲ درصد در گروه کنترل به ۵۱/۶۵ درصد در گروه تیمار شده با غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر باعث مشاهده شد. به علاوه مشخص شد که غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های HL-60 شد در حالی که در غلظت‌های بالاتر باعث نکروزیس سلول‌های HL-60 نسبت به گروه کنترل شدند.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که داروی تاموکسیفن از طریق افزایش بیان ژن CTNNBIP1 بر روی مسیر سیگنالی Wnt و پروتئین بتا کاتنین اثر مهاری دارد.

**واژگان کلیدی:** سیاهدانه، مرگ برنامه‌ریزی شده، سلول‌های HL-60، فلوسایتومتری، رنگ‌آمیزی AO/EB

## مقدمه

لوسمی حاد پرومیلوسیتیک از زیر گروه‌های لوسمی حاد میلوپیدی است که طبق آمار سایت سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۸ درصد افراد مبتلا به این بیماری در مردها ۶/۱ درصد و در خانمها ۴/۳ درصد همه سنین جمعیت جهان است (International Agency for Research on Cancer 2018). در این بیماری ابتدا اختلال در سلول‌های پیش‌ساز خونی به وجود آمده و باعث مشکلات فراوانی در عمل‌کرد سایر اعضای بدن نیز می‌شود و در نهایت عوارض بسیار وخیمی در بیمار ایجاد می‌شود (۱، ۲). در سال‌های اخیر پروتکل‌های درمانی مطرح شده و در مراکز تحقیقاتی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفته است. یکی از پروتکل‌های درمانی که تا به امروز مورد استفاده قرار گرفته است شیمی درمانی می‌باشد. استفاده از داروهای سیتوتوکسیک جهت از بین بردن سلول‌های بلاست بدخیم در طیف وسیعی استفاده می‌شود. اما مهمترین نقص این روش استفاده از داروهای شیمی درمانی است که دارای اثرات جانبی زیادی هستند. عوامل سیتوتوکسیک کیفیت زندگی بیماران سرطانی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بنابراین بهبود کیفیت زندگی بیماران سرطانی بستگی به داروهای شیمی درمانی با کارایی بالا و سمیت پایین روی سلول‌های سالم دارد (۳). در سال‌های اخیر استفاده از عصاره گیاهان به‌عنوان مواد طبیعی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی و جلوگیری از عود سرطان بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله این گیاهان، گیاه سیاه‌دانه است که تاریخچه غنی طبی و مذهبی دارد (۴، ۵). این گیاه بومی اروپای جنوبی، آفریقای شمالی و آسیا است. گیاه سیاه‌دانه با نام علمی *Nigella sativa* L. از خانواده *Ranunculaceae* است با گل‌های سفید یا آبی کم‌رنگ تا آبی پررنگ دارای دانه‌های سفید شیری رنگ که در تماس با هوا سیاه رنگ می‌شوند (۵، ۶). اثرات فارماکولوژیک سیاه‌دانه شامل اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانته (۷، ۸) کاهش قند (۹، ۱۰)، چربی (۱۱) و فشارخون بالا (۱۲)، محافظت بافت‌های کبد و کلیه (۱۶-۱۳) و قلب و عروق (۱۷) و همچنین اثرات ضد میکروبی (۱۸) و ضدانگلی (۱۹) از این گیاه گزارش شده است. همچنین مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی خواص ضد سرطانی سیاه‌دانه و ترکیبات کینونی آن مثل تیموکینون بر روی سرطان‌های مختلف از جمله کولون (۲۰)، سینه (۲۱ و ۲۲)، سارکوما (۲۳)، معده (۲۴، ۲۵)، خون (۲۶، ۲۷)، ریه (۲۸) و رحم (۲۹) صورت گرفته است. در مورد مقایسه این که ترکیب اصلی عصاره سیاه‌دانه (تیموکینون) روی کدام یک از انواع سرطان‌ها فعال‌تر بوده است تا به حال مقایسه کاملی انجام نگرفته است و بیشتر در مورد مسیرهای سیگنالینگ که باعث از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شود بحث شده است. اما در سال ۱۹۹۲، Salomi و همکارانش نشان دادند که در شرایط آزمایشگاهی غلظت‌های ۱/۵، ۳ و ۱/۵ میکروگرم از عصاره سیاه‌دانه باعث کشته شدن ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی Ehrlich ascites carcinoma (EAC)، Dalton's lymphoma ascites (DLA) و Sarcoma-180 (S-180) به ترتیب شد در حالی که روی سلول‌های K-562 اثر بسیار کمی داشت. همچنین مطالعات *in vivo* آن‌ها نشان داد که خوردن ۲ میلی‌گرم از عصاره سیاه‌دانه به مدت ۱۰ روز در موش‌های (EAC)، رشد این تومور را مهار کرد (۳۰). تاکنون در مورد اثرات آپوپتوتیک و سیتوتوکسیک عصاره الکلی سیاه‌دانه بر سلول‌های سرطانی HL-60 گزارشی منتشر نشده است، لذا در این مطالعه اثر عصاره الکلی سیاه‌دانه بر رشد سلول‌های سرطانی HL-60 مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**کشت سلول و آماده سازی غلظت های مختلف مواد:** برای انجام آزمایش رده سلولی HL-60 را از موسسه پاستور تهیه و در محیط کشت RPMI1640 همراه با FBS ۱۰ درصد و ۱۰۰ واحد/میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر استرپتومایسین در فشار ۵ درصد CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه کشت داده شد. در این مطالعه تجربی عصاره‌گیری با استفاده از روش شناخته شده سوکسله انجام شده برای این منظور ۱۰۰ گرم از پودر سیاه‌دانه با ۴۹۰ میلی‌لیتر الکل ۶۹ درصد با دستگاه

سوکسله عصاره‌گیری شد. عصاره از فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری عبور داده تا استریل شود. برای تعیین وزن خشک عصاره استریل، ۰۱ میلی‌لیتر از آن در پلیت با وزن معلوم ریخته و روی بن‌ماری ۰۷ درجه سانتی‌گراد الکل آن تبخیر شد و سپس با ترازوی دیجیتال بادقت ۰/۱۰۰۰ گرم توزین شد. با استفاده از محیط کشت استریل از عصاره سیاه‌دانه غلظت‌های ۰/۵۳، ۰/۵۶، ۰/۵۹ و ۰/۵۲۱ میکروگرم/میلی‌لیتر تهیه شد.

**بررسی درصد سلول‌های زنده:** برای بررسی درصد سلول‌های زنده از آزمون MTT استفاده شد. به‌طور خلاصه، روش MTT به‌این صورت انجام گرفت: ابتدا، تعداد مناسب  $5 \times 10^5$  سلول در هر میلی‌لیتر و غلظت مواد مورد نظر در خانه‌های یک پلیت ۲۴ خانه تنظیم شد و برای هر غلظت از ماده مورد نظر سه خانه در نظر گرفته شد. بعد از ۲۴ ساعت به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه ۲۰۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Sigma) افزوده شد و سپس ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از این مرحله، پلیت‌ها برای ۵ دقیقه با دور ۸۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. سپس، محیط رویی با احتیاط خارج شد و بعد به هر خانه ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Merck) اضافه شد پس از گذشت ۳۰ دقیقه، محتوای خانه‌ها چندین بار مخلوط شد تا رسوب داخل سلول‌ها بیرون بریزد. سرانجام میزان جذب نوری (OD) در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر (BioTek, Germany) ثبت شد. سپس، درصد سلول‌های زنده در هر چاهک از تقسیم OD آزمون بر OD کنترل ضرب درصد به‌دست آمد.

**تجزیه و تحلیل چرخه سلولی:** سلول‌های HL-60 با غلظت‌های مختلف ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر عصاره الکلی سیاه‌دانه برای ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها در اتانول ۷۰ درصد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در طول یک شب تا صبح ثابت شدند. سلول‌های ثابت با ۵۰ میکرولیتر PI (۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به‌مدت ۰۲ دقیقه روی یخ در تاریکی رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت، فلورسانس ساطع شده توسط مجموعه AND-IP در ۸۸۴ نانومتر مورد آزمایش قرار گرفت. درصد سلول‌ها در مراحل مختلف چرخه سلول، یعنی، 0G، 1G، S، و M/2G، با استفاده از فلوسایتومتری و توسط نرم‌افزار tseuQ Ilec مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**رنگ‌آمیزی AO/EB:** رنگ‌آمیزی AO/EB سلول‌های HL-60 برای تشخیص الگوهای آپوپتوزیس و نکروزیس انجام شد، همان‌طور که قبلاً گزارش شده است (۳۱) به‌طور خلاصه، سلول‌های HL-60 به‌مدت ۲۴ ساعت تحت تاثیر عصاره سیاه‌دانه با غلظت‌های ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قرار گرفتند و سپس سه بار با بافر فسفات (PBS) شسته شدند. سلول‌ها با ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر BE/OA به‌مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. حداقل ۰/۰۲ سلول در زیر میکروسکوپ فلورسانس مشاهده شد. سلول‌ها به‌شرح زیر طبقه‌بندی شدند: زنده، آپوپتوزیس یا نکروزیس. درصد سلول‌های آپوپتوتیک با استفاده از فرمول: درصد سلول‌های آپوپتوزیس (٪) = (تعداد سلول آپوپتوزیس/کل سلول مورد بررسی) ۰۰۱ درصد محاسبه شد.

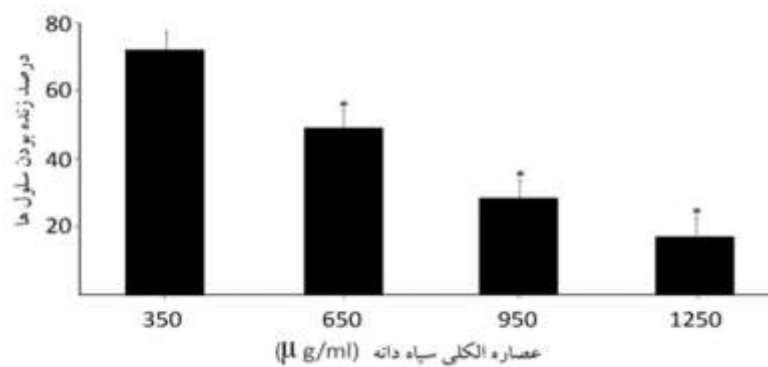
### تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار INSTAT-3 و آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شده و نمودارها از طریق برنامه EXCEL رسم شدند.  $p < 0/05$  معنی‌دار بودن داده‌ها تلقی شد و هر آزمایش دست‌کم سه مرتبه تکرار شد. داده‌ها نشان‌دهنده  $means \pm SD$  از سه آزمایش جداگانه است.

### نتایج

#### اثر ضد تکثیر عصاره الکلی سیاه‌دانه بر سلول‌های HL-60

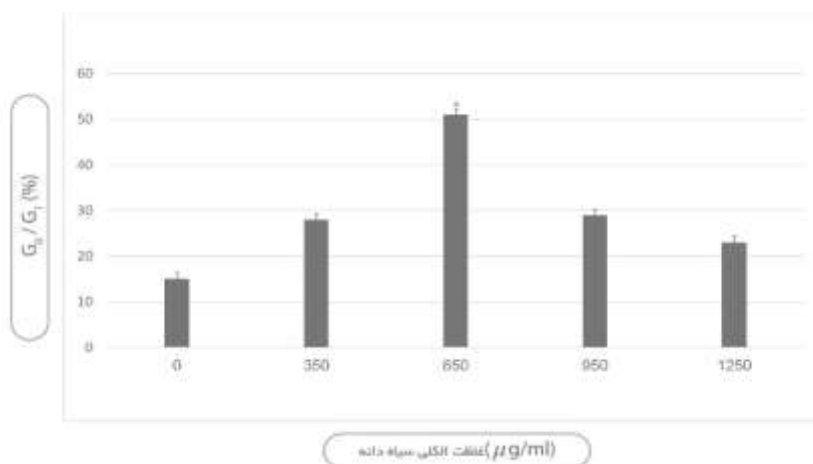
آزمون MTT نشان داد که در مقایسه با گروه کنترل، عصاره الکلی سیاه‌دانه در غلظت  $IC_{50}$  ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌های HL-60 شد در حالی که در این غلظت رو سلول‌های سالم تاثیری نداشت. در غلظت‌های بالاتر وابسته به غلظت باعث مرگ بیشتر سلول‌ها شد، در حالی که در غلظت ۳۵۰ میکروگرم/میلی لیتر نسبت به گروه کنترل تاثیر معنی‌داری روی تکثیر سلول‌های 06-LH نداشت (شکل ۱).



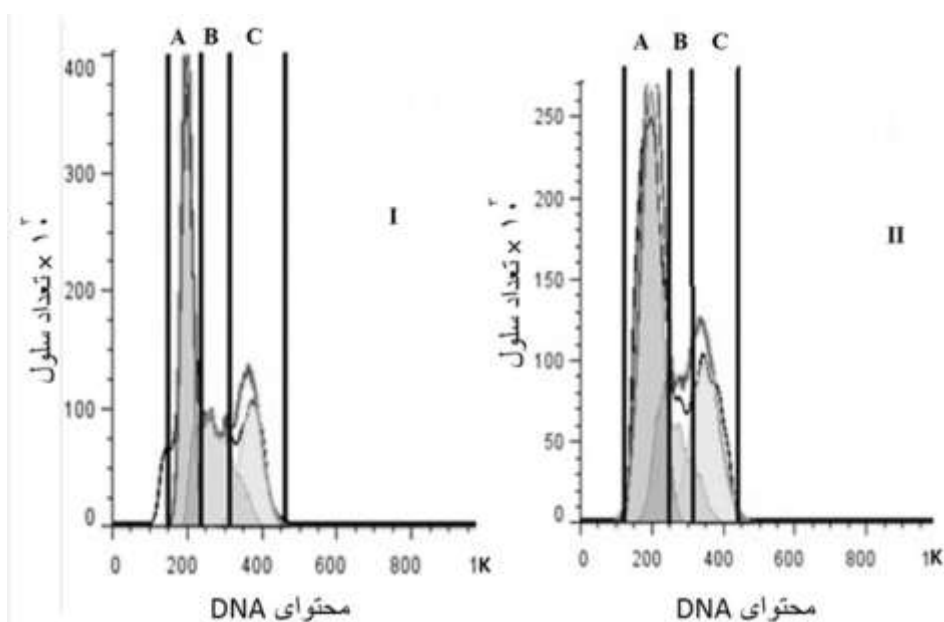
شکل ۱: سلول‌های HL-60 با غلظت‌های مختلف ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر تحت تیمار قرار گرفتند و درصد زنده بودن سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت با روش MTT بررسی شد. این آزمایش بیش از ۳ بار تکرار شد.  $p < 0.001$  \* در مقایسه با نمونه کنترل

#### اثر عصاره الکلی سیاه‌دانه بر سیکل سلول‌های HL-60

برای تعیین این‌که آیا عصاره الکلی سیاه‌دانه تکثیر سلول‌های HL-60 را از طریق تنظیم پیشرفت چرخه سلولی و آپوپتوزیس مهار می‌کند، ابتدا با استفاده از رنگ‌آمیزی PI فلوسایتومتری انجام شد. ما افزایش معنی‌داری در سلول‌های  $G_0/G_1$  از ۱۵/۲ درصد در گروه کنترل به ۵۱/۶۵ درصد گروه تیمار شده با غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر مشاهده کردیم. با این حال، در غلظت‌های ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر نسبت سلول‌ها در فاز  $1G/0G$  افزایش معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل نداشت (شکل ۲، ۳). این اثرات نشان می‌دهد که عصاره الکلی سیاه‌دانه قادر به ایجاد توقف سیکل سلولی در فاز  $1G/0G$  است.



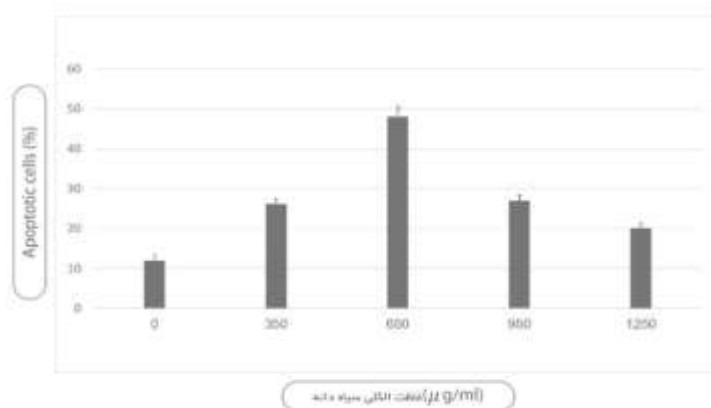
شکل ۲: سلول‌های HL-60 با استفاده از غلظت‌های مختلف ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و نسبت سلول‌های فاز  $G_0/G_1$  بر اساس فلوسایتومتری محاسبه شد.  $p < 0.001$  \* در مقایسه با نمونه کنترل



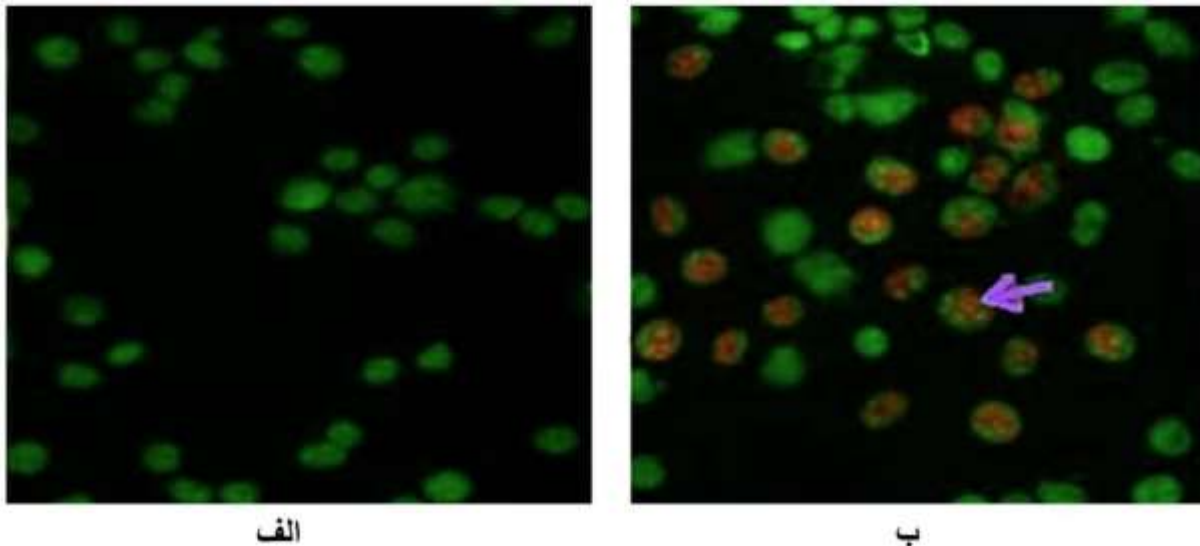
شکل ۳: نمودار مربوط به فلوسایتمتری با استفاده از رنگ PI جهت بررسی چرخه سلولی، A: میزان سلول‌های متوقف شده در فاز G0/G1 را نشان می‌دهد، B: سلول‌های متوقف شده در فاز S و C: سلول‌های متوقف شده در فاز G2/M را نشان می‌دهد. تصویر I سلول‌ها HL-60 را بدون تاثیر دارو، تصویر II سلول‌های HL-60 تیمار شده با غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۴۲ ساعت

### اثر عصاره الکلی سیاه دانه بر القا آپوپتوزیس در سلول‌های HL-60

رنگ‌آمیزی AO/EB نشان داد که سلول‌های زنده به‌طور یکنواخت با مورفولوژی طبیعی در سلول‌های کنترل HL-60 مشاهده می‌شوند، در حالی که سلول‌های آپوپتوزیس نارنجی با کروماتین تکه تکه شده و اجسام آپوپتیک در سلول‌های HL-60 تحت درمان با ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر عصاره الکلی سیاه‌دانه مشاهده شدند و در مقایسه با گروه کنترل، درصد سلول‌های آپوپتوتیک به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. با این حال، غلظت‌های ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر، بیشتر باعث نکروزیس سلول‌ها نسبت به آپوپتوزیس آن‌ها شدند این اثرات نشان می‌دهد که عصاره الکلی سیاه‌دانه در غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر می‌تواند باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های HL-60 شود (شکل ۴، ۵).



شکل ۴: سلول‌های HL-60 با استفاده از غلظت‌های مختلف ۳۵۰، ۶۵۰، ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و درصد سلول‌های آپوپتوزیس براساس رنگ‌آمیزی AO/EB برآورد شد.  $p < 0.001$  در مقایسه با نمونه کنترل



شکل ۵: سلول‌های HL-60 با استفاده غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند و رنگ‌آمیزی AO/EB سلول‌های HL-60 کنترل و تحت تیمار انجام شد (بزرگنمایی ۴۰۰). الف: سلول‌های کنترل، ب: سلول‌های تیمار شده با عصاره الکلی سیاه‌دانه - فلش نشان دهنده سلول‌های آپوپتوزیک است.

#### بحث

در این پژوهش مشخص شد که غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر عصاره الکلی سیاه‌دانه باعث القا آپوپتوزیس در سلول‌های HL-60 شد در حالی که در غلظت‌های بالاتر یعنی ۹۵۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر باعث نکروزیس سلول‌های HL-60 نسبت به گروه کنترل شدند. برای توجیه اثرات ضدسرطانی عصاره سیاه‌دانه ترکیبات موجود در آن استخراج شدند و مشخص شده که ترکیب اصلی که خاصیت ضدسرطانی دارد تیموکینون می‌باشد (۳۲). تا به امروز برای اثرات ضد سرطانی تیموکینون مکانیسم‌های مختلفی پیشنهاد شده است. yradaB و همکاران (۳۳) و همچنین stiruB و همکاران (۴۳) نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانتی عصاره الکلی سیاه‌دانه مانع تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شد. bisathuM-ilaG و همکاران (۵۳) بر روی سلول‌های کلورکتال نشان دادند که تیموکینون استخراج شده از سیاه‌دانه از طریق مکانیسم وابسته به 35P باعث القا آپوپتوزیس در این سلول‌ها شد (۵۳). ydhaM و همکاران (۶۳) نشان دادند که تیموکینون با غلظت ۰۰۱ میکرومولار از طریق فعال سازی 8-esapsac و رخدادهای میتوکندریایی در سلول‌های 06-LH باعث القا آپوپتوزیس می‌شوند. محمود الحسین و همکاران (۷۳) نشان دادند، تیموکینون تا غلظت ۰۰۱ میکرومولار بر روی سلول‌های لوکمی از طریق ژن‌های 35P و 37P باعث القا آپوپتوزیس می‌شوند (۷۳). که نتایج پژوهش ما نیز هم راستا با این تحقیقات و نشان دهنده القا آپوپتوزیس در سلول‌های 06-LH بود. itooK و همکاران (۸۳) خصوصیات فیتوشیمی، داروسازی و کاربردهای درمانی سیاه‌دانه (avitas allegiN) به‌ویژه خاصیت ضدسرطانی آن را از طریق القا آپوپتوزیس نشان دادند. heiwaladja و همکاران (۹۳) گزارش کردند در دو دهه گذشته عصاره سیاه‌دانه می‌تواند، به‌تنهایی یا همراه با داروهای شیمی درمانی، به‌عنوان عوامل موثر برای کنترل شروع تومور، رشد و متاستاز باشد و از این‌رو، می‌تواند در درمان گسترده‌ای از انواع سرطان‌ها موثر باشد. همچنین ایشان و همکاران (۰۴) نشان دادند که تیموکینون از طریق مسیرهای سیگنالینگ 35p, Bk-FN, γRAPP, 3TATS, dna KPAM, KA/K3IP عملکرد ضدسرطانی دارد. به‌نظر می‌رسد که در میان این مکانیسم‌ها، القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در فعالیت ضدسرطانی عصاره الکلی سیاه‌دانه می‌باشد که یافته‌های ما نیز آن را تایید می‌کند. از طرف دیگر مطالعات گسترده‌ای درباره این‌که سیاه‌دانه به‌عنوان یک افزایش دهنده فعالیت داروهای شیمی درمانی به‌کار رود نیز صورت گرفته است. regrebneffE و همکاران (۱۴) نشان دادند که ترپن همراه

با سیاه‌دانه اثر بیشتری در خاصیت ضدتکثیر سلول‌های سرطانی LH-06 از طریق القا آپوپتوزیس و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانتی دارد. همچنین در مطالعه ای دیگر هم نشان دادند که عصاره سیاه‌دانه اثر ضدسرطانی غلظت‌های پایین دوکسوروبیسین را افزایش می‌دهد (۲۴). در این پژوهش ما غلظت 05CI عصاره الکلی سیاه‌دانه را روی سلول‌های سرطانی به‌دست آورده تا در پژوهش‌های بعدی اثر هم‌افزایی آن را بر روی داروهای ضدسرطانی بررسی کنیم. البته مطالعات بیشتر در مورد عصاره سیاه‌دانه بر اساس آزمایشات بالینی برای کشف فواید آن در مدیریت سرطان بسیار لازم است.

### نتیجه‌گیری

یافته‌های ما برای اولین بار نشان داد که عصاره الکلی سیاه‌دانه در غلظت ۶۵۰ میکروگرم/میلی لیتر باعث توقف سیکل سلولی شد و در غلظت‌های بالاتر باعث ایجاد نکروزیس در این سلول‌ها شد.

### منابع

1. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*. 2002; 108(2): 153-64.
2. Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD, Reed JC. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002; 21(21): 3459-74.
3. Ethier MC, Blanco E, Lehrnbecher T, Sung L. Lack of clarity in the definition of treatment-related mortality: pediatric acute leukemia and adult acute promyelocytic leukemia as examples. *Blood*. 2011; 118(19): 5080-5083
4. Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa L.* seeds. *J Ethnopharmacol*. 2000; 70(1): 1-7.
5. Ijaz H, Tulain UR, Qureshi J, Danish Z, et al. Review: *Nigella sativa* (Prophetic Medicine): A Review. *Pak J Pharm Sci*. 2017; 30(1): 229-234.
6. Zheng J, Zhou Y, Li Y, Xu DP, et al. Spices for Prevention and Treatment of Cancers. *Nutrients*. 2016;12: 8(8).
7. Amizadeh S, Rashtchizadeh N, Khabbazi A, Ghorbanihaghjo A, et al. Effect of *Nigella sativa* oil extracts on inflammatory and oxidative stress markers in Behcet's disease: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Avicenna J Phytomed*. 2020; 10(2): 181-189.
8. Bordoni L, Fedeli D, Fiorini D, Gabbianelli R. Extra Virgin Olive Oil and *Nigella sativa* Oil Produced in Central Italy: A Comparison of the Nutrigenomic Effects of Two Mediterranean Oils in a Low-Grade Inflammation Model. *Antioxidants (Basel)*. 2019; 9(1): 20.
9. Kaleem M, Kirmani D, Asif M, Ahmed Q, et al. Biochemical effects of *Nigella sativa L* seeds in diabetic rats. *Indian J. Exp. Biol*. 2006; 44(9): 745 - 8.
10. Mohebbati R, Abbasnezhad A. Effects of *Nigella sativa* on endothelial dysfunction in diabetes mellitus: A review. *J Ethnopharmacol*. 2020; 252: 112585.
11. Dahri AH, Chandiol AM, Rahoo AA, Memon R. AEffect of *Nigella sativa* (kalonji) on serum cholesterol of albino rats. *J. Ayub. Med. Coll. Abbottabad*. 2005; 17 (2): 72-4.
12. Dehkordi FR, Kamkhah A F. Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension. *Fundam. Clin. Pharmacol*. 2008; 22 (4): 447 - 52.

13. Tekbas A, Huebner J, Settmacher U, Dahmen U. Plants and Surgery: The Protective Effects of Thymoquinone on Hepatic Injury-A Systematic Review of In Vivo Studies. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(4):1085.
14. Eğılmez OK, Kökten N, Kalcıoğlu MT, Ekici AİD, et al. Investigation of the Protective Effect of *Nigella Sativa* Oil in Cisplatin Induced Oral Mucositis: An Experimental Study. *Turk Arch Otorhinolaryngol.* 2020; 58(1): 10-15.
15. Razmpoosh E, Safi S, Abdollahi N, Nadjarzadeh A, et al. The effect of *Nigella sativa* on the measures of liver and kidney parameters: A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Pharmacol Res.* 2020; 20(156): 104767.
16. Wang F, Lei X, Zhao Y, Yu Q, et al. Protective role of thymoquinone in sepsis-induced liver injury in BALB/c mice. *Exp Ther Med.* 2019; 18(3): 1985-1992.
17. El-Bahai MN, Al-Hariri MT, Yar T, Bamosa AO. Cardiac inotropic and hypertrophic effects of *Nigella sativa* supplementation in rats. *Int J Cardiol.* 2009; 131(3): 115 - 7.
18. Nawarathne NW, Wijesekera K, Wijayarathne WMDGB, Napagoda M. Development of Novel Topical Cosmeceutical Formulations from *Nigella sativa* L with Antimicrobial Activity against Acne-Causing Microorganisms. *Scientific World Journal.* 2019 ; 2019: 1-7.
19. Hamada FMA, Abdel-Aziz HA, Badr F, Moustafa A, et al. The mutagenic effect of praziquantel in *S. mansoni* infected mice. *Arab J Lab.* 1992; 18: 301-11.
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. Al-Mutairi A, Rahman A, Rao MS. Low Doses of Thymoquinone and Ferulic Acid in Combination Effectively Inhibit Proliferation of Cultured MDA-MB 231 Breast Adenocarcinoma Cells. *Nutr Cancer.* 2020; 28: 1-8.
23. Award EM. In vitro decreases of the fibrinolytic potential of cultured human fibrin sarcoma cell line, HT1080, by *Nigella sativa* oil. *Phytomedicine.* 2005; 12(2): 100-7.
24. 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 ; 72(1-2): 299-304.
25. Kanter M, Coskun O, Uysal H. The antioxidative and antihistaminic effect of *Nigella sativa* and its major constituent, thymoquinone on ethanol-induced gastric mucosal damage. *Arch Toxicol.* 2006; 80(4): 217-24.
26. AitMbarek L, Ait Mouse H, Elabbadi N, Bensalah M, et al. Antitumor properties of blackseed (*Nigella sativa* L.) extracts. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40(6): 839- 47
27. El-Mahdy M A, Zhu Q, Wang QE, Wani G, et al. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer.* 2005; 117(3): 409-417.
28. Pathirana VC, Thabrew I, Samarakoon SR, Tennekoon KH, et al. Evaluation of anticancer effects of a pharmaceutically viable extract of a traditional polyherbal mixture against non-small-cell lung cancer cells. *J Integr Med.* 2020;



29. Ichwan SJ, Al-Ani IM, Bilal HG, Suriyah WH, et al. Apoptotic activities of thymoquinone, an active ingredient of black seed (*Nigella sativa*), in cervical cancer cell lines. *Chin J Physiol.* 2014; 57(5): 249-55.
30. Salomi NJ, Nair SC, Javawardhanan KK, Varghese CD, et al. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds. *Cancer Lett.* 1992; 63(1): 41-6.
31. Surh YJ, Hurh YJ, Kang JY, Lee E, et al. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer Letters.* 1999; 140(1-2): 1-10.
32. Almatroodi SA, Almatroudi A, Alsahli MA, Khan AA, et al. Thymoquinone, an Active Compound of *Nigella Sativa*: Role in Prevention and Treatment of Cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2020 [Epub ahead of print]
33. Badary OA, Taha RA, Gamal el-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent super oxide anion scavenger. *Drug ChemToxicol.* 2003; 26(2): 87-98.
34. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa*. *Pharm Bull.* 2000; 14(5): 323-8.
35. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, 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; 25(4): 857-66.
36. El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, et al. Thymoquinone induces apoptosis through activation of caspase-8 and mitochondrial events in p53-null myeloblastic leukemia HL-60 cells. *Int J Cancer.* 2005; 117(3): 409-17.
37. AlHossein M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, et al. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochemical Pharmacol.* 2010; 79(9): 1251-60.
38. Kooti W, Hasanzadeh-Noohi Z, Sharafi-Ahvazi N, Asadi-Samani M, et al. Phytochemistry, pharmacology, and therapeutic uses of black seed (*Nigella sativa*). *Chin J Nat Med.* 2016; 14(10): 732-745.
39. Majdalawieh AF, Fayyad MW. Recent advances on the anti-cancer properties of *Nigella sativa*, a widely used food additive. *J Ayurveda Integr Med.* 2016; 7(3): 173-180.
40. Majdalawieh AF, Fayyad MW, Nasrallah GK. Anti-cancer properties and mechanisms of action of thymoquinone, the major active ingredient of *Nigella sativa*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017; 57(18): 3911-3928.
41. Effenberger K, Breyer S, Schobert R. Terpene conjugates of the *Nigella sativa* seed-oil constituent thymoquinone with enhanced efficacy in cancer cells. *Chem Biodivers.* 2010; 7(1): 129-39.
42. Effenberger-Neidnicht K, Schobert R. Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011; 67(4): 867-74.

## Comparison of anti-inflammatory effects of dexamethasone and thiamine on Wallerian degeneration after sciatic nerve transection in rat

Rahimi M, Ph.D.<sup>\*</sup>, Babaei A, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Biology Department, Faculty of Science, Malayer University, Malayer, Iran

\* Email corresponding author: m.rahimi@malayeru.ac.ir

Received: 4 Jan. 2020

Accepted: 29 Feb. 2020

---

### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to investigate the apoptotic effect of the alcoholic extract of black seed on HL-60 cancer cells.

**Material and Methods:** In this study, concentrations of 350, 650, 950 and 1250  $\mu\text{gml}^{-1}$  of *Nigella sativa* alcoholic extract were added to HL-60 cancer cells for 24 h. MTT assay was applied to find out the portion of living cells. Likewise, PI staining for flow cytometry was performed to determine whether black seed extract inhibits the proliferation of HL-60 cells by modulating cell cycle progression and apoptosis, then AO/EB staining of HL-60 cells was performed to detect apoptosis and necrosis patterns.

**Results:** MTT assay showed that in comparison with the control group, alcoholic extract of black seed killed 50% of HL-60 cell in the concentration of 650  $\mu\text{gml}^{-1}$  and based on the concentration, more cell death was caused at the higher concentration. Also, a substantial increase in G0/G1 phase cells was observed from 15. 2% in the control group, up to 51. 65% in the group was treated with 650  $\mu\text{gml}^{-1}$ . It was also found that the concentration of 650  $\mu\text{gml}^{-1}$  induced apoptosis in HL-60 cells, while at higher concentrations of 950 and 1250  $\mu\text{gml}^{-1}$  caused HL-60 cells necrosis compared to the control group.

**Keywords:** Black seed, Apoptotic, HL-60 cells, Flow cytometry, AO/EB staining