



ارزیابی سمیت عصاره سیاه دانه (تایموکینون) در مقایسه با اثر تاموکسیفن بر سلول‌های سرطان پستان

محمد تقی جغتایی: استاد، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (* نویسنده مسئول)

mt.joghataei@yahoo.com

مرحانه معتقد: دانشجوی دکترا، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

فانزه فقیهی: دکترا، مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

تایموکینون،
تاموکسیفن،
سرطان پستان،
استروژن

زمینه و هدف: سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها بین زنان می‌باشد. حدود ۷۵ درصد سرطان‌های پستان حاوی گیرنده استروژن می‌باشند. هدف از انجام این مطالعه تعیین میزان کشندگی سلول سرطان پستان درمان شده با تاموکسیفن (داروی انتخابی در درمان سرطان پستان محتوی گیرنده استروژنی) در مقایسه با تایموکینون (ترکیب مشتق شده از سیاه دانه) می‌باشد. **روش کار:** رده سلولی ام سی اف- سون سرطان پستان مورد آزمایش قرار گرفت. تایموکینون با رقت ۱۰ تایی و تاموکسیفن با غلظت ۵ میکرومولار بعنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. میزان سمیت تایموکینون با آزمایش ام تی اس بدست آمد. درصد مرگ سلولی با استفاده از آنکسین-۵ بوسیله فلوسیتومتری گزارش شد. واکنش آر تی پی سی آر، تغییرات دو ژن *UGT1A8* و *CARD16* را نشان داد.

یافته‌ها: آزمون واریانس یک طرفه یا آنووا، اختلاف بین غلظت‌های مختلف را با ارزش پی کمتر از ۰,۰۰۱ نشان داد. تست آمار مقایسه‌ای توکی میزان قدرت کشندگی تایموکینون در غلظت ۱۰۰ میکرومولار را با اختلاف فاحشی با دیگر غلظت‌ها پیدا کرد. تعداد سلول‌های آپوتوتیک بعد از ۲۴ ساعت درمان در غلظت ۱۰۰ میکرومولار حدود ۸۲ درصد بودند در حالیکه تحت اثر تاموکسیفن ۵ میکرومولار حدود ۱۷,۵ درصد یافت شد. کاهش و افزایش بیان ژن‌های *UGT1A8* و *CARD16* بترتیب ۱۱ و ۹ فولد بدست آمد.

نتیجه‌گیری: تفاوت میزان سمیت غلظت‌های مختلف تایموکینون با رقت ۱۰ تایی حکایت از اثر درمانی وابسته به غلظت یا دوز را نشان داد. تایموکینون توانایی راندن سلول‌های سرطانی به چرخه مرگ سلولی یا آپوپتوزیس را دارد با مکانیزم وابسته به غلظت. تایموکینون با اثر بر کاهش *UGT1A8* در چرخه استروژن منجر به افزایش متوکسی استروژن شده که خاصیت ضد رگزائی دارد. همچنین کاهش این ژن در چرخه گلوکوروبیوسین باعث کاهش تبدیل فرم ترانس تاموکسیفن به فرم گلوکوروبیوسین شده و میزان استروژن انباشته شده در بدن کاهش می‌یابد. این یافته نشان دهنده توانائی تایموکینون در کاهش عوارض تاموکسیفن می‌باشد. از طرفی تایموکینون می‌تواند با افزایش ژن *CARD16* در چرخه کاسپازها اثر گذاشته از طریق مکانیزم کاهش التهاب. این اثر می‌تواند منجر به راه اندازی چرخه مرگ سلولی شود.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Joghataei MT, Motaghd M, Faghihi F. Cytotoxicity Assessment of Black Seed Compound (Thymoquinone) on Breast Cancer Cells in Comparison with Tamoxifen. Razi J Med Sci. 2025(11 Nov);32.127.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.



Cytotoxicity Assessment of Black Seed Compound (Thymoquinone) on Breast Cancer Cells in Comparison with Tamoxifen

- Mohammad-Taghi Joghataei:** Professor, Cellular and Molecular Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding Author) mt.joghataei@yahoo.com
Marjaneh Motaghd: PhD Student, Cellular and Molecular Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Faezeh Faghihi: Assistant Professor Cellular and Molecular Research Center, School of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: According to the reports from the International Agency for Research on Cancer, the incidence rate of cancer is rising equal to the growing rate of population. Cancer is a common problem that has been declared as the main cause of mortality among people and included 18.4% of mortality cases in 2018 equal to 9.6 million that has been reported by WHO (1). Tamoxifen is a non-steroid and anti-estrogen compound which serves as an option for breast cancer treatment and can reduce the risk of cancer to 50 percent but it shows some side effects (2). Till now, many natural components have been introduced as a remedy for cancer. Thymoquinone (TQ) is one of the known and bioactive component of the volatile oil of *Nigella sativa* seed (black seed) (3). Moreover, previous studies showed that TQ has different modes of action, such as; anti-cancer, anti-inflammatory effect, anti-oxidant, anti-bacterial, and modulator of the immune system (5). In this study, we tried to find the cytotoxicity effect of TQ on breast cancer cells and some of the genes those can be activated and involved in that mechanism.

Methods: To determine the percentage of viable cells following treatment with TQ, the 10-fold dilution of TQ was prepared to evaluate its effect on breast cancer cells, MCF-7. The range of concentrations was between 0–1000 μ M. TAM 5 μ M was considered as a positive control. The Cell Proliferation assay was used to determine the effect of TQ on cell proliferation. Differences between various concentrations of TQ were evaluated by Tukey multiple comparison test using SPSS V.16. The significant differences between 0, 1, 10, 100, and 1000 μ M were found by One-way ANOVA test. Annexin V-FITC apoptosis detection kit was used to quantitatively determine the percentage of apoptotic cells in treated and untreated MCF-7 breast cancer cells. Total RNA from each sample of TQ-treated and untreated MCF-7 cell line was isolated using the RNeasyPlus Mini kit. For the quantification of isolated RNAs, the protocol of the NanoDrop 2000C Spectrophotometer was followed. The NanoDrop 2000C Spectrophotometer revealed the sufficient yield and purity of RNA samples at OD230, OD260, and OD280 of wavelength. The ratio of A260 to A230 of samples was more than 2.0 and the ratio of A260 to A280 samples was more than 1.8. After preparing enough amount of RNA, two-step RT-qPCR, Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, was used which involves two reactions. In the first step, the high capacity RNA-to-cDNA Kit was used for reverse transcription of total RNA to a single-stranded cDNA. It was followed by step 2 in which the cDNA was amplified with a thermal cycler. RT-qPCR was used to detect small amounts of mRNA or gene expression levels. The level of gene expression was determined using comparative quantification and its relative expression to the level of internal control that was GAPDH which served to normalize the fluorescence signals relative to the gene of interest or its expression level in samples. The mixture of TaqMan gene expression assay contains a TaqMan probe and primer of the target gene was used to understand the optimal standard curve of each target gene. The Livak method was used to calculate the relative gene expression levels or RQ value in the expression level of the target genes. Therefore, the CT mean value of the target gene to that of the reference gene for both of the treated sample and untreated samples was normalized using the StepOnePlus Real-Time PCR Software v 2.1. In this study, the CT

Keywords

Thymoquinone,
Tamoxifen,
Breast Cancer,
Estrogen

Received: 02/08/2025

Published: 11/11/2025

value of the majority of target genes was found to be in the acceptable value of more than 18 but less than 35.

Results: Initially, the percentage of viable cells at 100 μM concentration, mean \pm SD = 40 ± 4.2 was almost similar to the percentage of viable cells at 1000 μM concentration, mean \pm SD = 29 ± 3.8 . One-way analysis of variance, ANOVA was done to compare the differences between untreated cells versus TQ treated and TAM treated cells. A great reduction in the number of viable cells was found with 100 μM TQ versus untreated cells and TAM treated cells which indicated the highly toxic effect of TQ 100 μM concentration. Then, Tukey multiple comparison test was selected to determine whether there are significant differences between different concentrations. The results showed there were no significant differences between untreated versus 1 μM and 10 μM concentrations. However, there were significant differences between untreated versus 100 and 1000 μM . Similarly, the differences between 1 versus 100 and 1000 μM concentrations were found to be significant. These showed concentrations of less than 1000 μM would be sufficient for further analysis. The number of apoptotic cells after 24 hours of treatment of cells with TQ 100 μM was about 82 percent, however, it was 17.5 percent with TAM 5 μM . UGT1A8 and CARD16 were the genes decreased and increased, respectively obtained by RT-qPCR method.

Conclusion: Up until now, there has been reported much evidence regarding the therapeutic effect of TQ. The results obtained from this experiment showed that TQ is an active compound of black seed that can reduce the side effects of TAM. Studies showed that Trans-4-tamoxifen-glucuronide is an active metabolite of TAM that has a high affinity to the estrogen receptors. In fact, if the compound can prevent the accumulation of estrogen inside the body, therefore it can reduce the side effect of estrogen. The results revealed that low expression of the gene UGT1A8 by 11-fold due to TQ can reduce the conversion of trans-4-hydroxy-tamoxifen to trans-tamoxifen-4-o-glucuronide. TQ can activate the glucuronidation process which is one of the processes of xenobiotic and drug metabolism whereby, the trans-tamoxifen would be transferred to glucuronide form and the level of accumulated estrogen would be reduced. UGT1A8, Glucuronosyltransferase Family 1 Member A8, is a gene involved in the family of Cytochrome P450 and active in the metabolism of estrogen. The UGT1A8 protein can maintain the methoxy form of estradiol which the non-cancerous form of TQ (31). The decrease in the level of this gene in this study suggested the activation and overexpression of 2-methoxy estradiol. This finding highlighted the anti-apoptotic effect of TQ and also, anti-cancer and anti-angiogenesis of this compound. On the other hand, an increase in the expression of CARD16, Caspase Recruitment Domain Family, member 16, about 9-fold suggested the ability of TQ in triggering apoptosis mechanism or cell death through caspase activation, because of the relation between CARD16 with CASP1. CASP1 is involved in inflammation (16). CASP1 showed an important role in pathological cell death or programmed cell death (32).

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Joghataei MT, Motaghd M, Faghihi F. Cytotoxicity Assessment of Black Seed Compound (Thymoquinone) on Breast Cancer Cells in Comparison with Tamoxifen. *Razi J Med Sci.* 2025(11 Nov);32:127.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

***This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.**

مقدمه

طبق گزارشات آژانس بین المللی تحقیقات سرطان، به موازات رشد جمعیت میزان بروز سرطان پستان هم در حال افزایش می باشد. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی مرگ‌های ناشی از سرطان در سال ۲۰۱۸ حدود ۹٫۶ میلیون نفر می باشد. سرطان پستان از شناخته شده ترین نوع سرطان بین زنان است که سالانه منجر به مرگ افراد زیادی می شود. تقریباً ۷۵٪ سلولهای سرطان پستان دارای گیرنده استروژن هستند (۱). تاموکسیفن یک تعدیل کننده گیرنده استروژن است و بعنوان یکی از داروهای موثر در درمان سرطان پستان شناخته شده است که خطر ابتلا به سرطان پستان را تا ۵۰٪ کاهش می دهد (۲). با وجود پیشرفت در درمان، نیاز به بکارگیری از داروهای جدید به منظور تعدیل بیان و جلوگیری از انتشار بیش از حدگیرنده استروژن احساس می شود. تاکنون مواد دارویی مختلفی با منشاء گیاهی برای درمان سرطان معرفی شده اند. تایموکینون (۲-ایزوپروپیل-۵-متیل-۱-بنزوکینون) بعنوان یک دارو با منشاء طبیعی شناخته شده است و فعالترین ترکیب مشتق شده از گیاه نیجلا ساتیوا می باشد و برای اولین بار در سال ۱۹۶۳ توسط داخاخانی از سیاه دانه استخراج شد (۳). منشاء سیاه دانه از کشورهای حاشیه دریای مدیترانه گزارش شده است (۴). تاکنون از تایموکینون اثرات زیادی من جمله اثرات ضد سرطانی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد باکتریایی و تنظیم کننده سیستم ایمنی گزارش شده است (۵). مطالعات اخیر اثر تایموکینون در کاهش سلولهای زنده و پیشبرد مرگ سلولی از طریق فعال کردن کاسپازهای ۳ و ۹ در سرطان ریه را گزارش کرده اند (۶). رخداد آپوپتوزیس بعد از افزایش فعالیت پروتئین ۵۳ بر اثر تایموکینون در سلولهای ام سی اف- سون نشان داده شده است (۷). فعالیت کاسپازهای ۳ و ۷ که از گروه کاسپازهای تاثیرگذار هستند در اثر تایموکینون در سلولهای سرطان کبد افزایش یافته و سلولها را به چرخه مرگ وارد می کنند (۸). توقف سیکل رشد در سلولهای ام سی اف- سون پس از درمان با تایموکینون و بدنبال آن مرگ سلولها رخ داده است (۹). همچنین اثرات وابسته به دوز در سرطان پستان از نوع بدون گیرنده استروژنی

مطالعه شده است که موثر در توقف رگرزائی های جدید نواحی دیگر بدن بوده است (۱۰). در سرطان پروستات و سرطان مغز باعث کاهش شمارش سلولها شده و از طریق فعال کردن کاسپاز ۹ و بصورت وابسته به دوز منجر به مرگ سلولی می شود (۱۱). تایموکینون بعنوان یک داروی گیاهی شیمیائی شناخته شده است که توانائی افزایش غلظت آنزیم های آنتی اکسیدان را دارد (۱۲). همچنین با اثرات ضد التهابی در التهاب حاد لوزالمعده از طریق کاهش رادی کالهای آزاد و افزایش اثرات آنتی اکسیدانی نقش دارد (۱۳). تایموکینون باعث مهار مسیره های مختلف سلولی می شود مانند مسیر سلولی پی آی تری کی/ ای کی تی در سلولهای سرطان دهان (۱۴). اثر سمیت تایموکینون در سلولهای ملانومای موش منجر به تخریب دی ان ای، کاهش پروتئین است-۳ و مرگ سلولی می شود (۱۵).

ژن *CARD16* (عضو ۱۶ از خانواده کاسپازها) یک ملکول آداپتور است که در تنظیم کاسپاز ۱ نقش دارد. کاسپاز ۱ از جمله فاکتورهای دخیل در ایجاد التهاب است (۱۶). علاوه بر این ژن *UGT1A8* (عضو ۸ از خانواده گلوکورونیزیل ترانسفراز) ژنی است با پروتئین فعال که در متابولیزم داروها، در فعالیتهای خانواده سیتوکروم پی ۴۵۰ و متابولیزم استروژن نقش دارد. در مرحله دوم سم زدائی از بدن ترکیبات زائد با مکانیزم گلوکورونیداسیون و با کمک این ژن تبدیل به ادرار یا صفرا شده و از بدن دفع می شوند. این ژن یک آنزیم از چرخه گلوکورونیداسیون را به رمز در می آورد که در انتقال استروئیدها و هورمونها به فرم قابل حل در آب موثر هستند (۱۷).

در این مطالعه سعی بر آن شد تا غلظت موثر در سمیت تایموکینون در مقایسه با تاموکسیفن بر سلولهای ام سی اف- سون سرطان پستان بررسی شود و میزان بیان ژن *UGT1A8* (دخیل در متابولیزم تایموکینون) و اثرات آن بر چرخه تاموکسیفن و همچنین میزان بیان ژن *CARD16* (دخیل در مکانیزم مرگ سلولی) تحت اثر تایموکینون بررسی گردد.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی بوده که به منظور بررسی ترکیبی از عصاره سیاه دانه (تایموکینون) روی سلول‌های سرطان پستان انسان رده سلولی ام سی اف-سون انجام شد. از تاموکسیفن بعنوان کنترل مثبت استفاده شد.

کشت سلولی: رده سلولی ام سی اف-سون از ای تی سی سی (آمریکن تایپ کالچر کالکشن) خریداری شد و در محلول کشت سلولی آر پی ام آی ۱۶۴۰ (اینویتروژن، آمریکا) که حاوی ال-گلو تامین، سرم گاو جنین غیر فعال شده با غلظت ۱۰٪ (اینویتروژن، آمریکا) و ۱ واحد پنی سیلین / استرپتومایسین (هایکولون، آمریکا) بود کشت داده شد. از این سلولها حدود 1×10^4 سلول برداشته و به مدت دو شبانه روز در محیط انکوباتور نگهداری و کشت داده شدند. بر طبق دستورالعمل مرکز تحقیقات دانشگاه علوم مالزی، استفاده از سلولهای خریداری شده از ای تی سی سی نیازی به تأیید کمیته اخلاق نداشت.

آماده کردن غلظت‌های مورد نظر تایموکینون و تاموکسیفن: به منظور تهیه محلول مادر یا پایه از تایموکینون، در حدود ۰,۰۰۱۶ گرم از پودر تایموکینون (سیگما-آلدریخ، فرانسه) در ۵ میکرولیتر دی ام اس ئی ریخته شده و ورتکس انجام گرفت، سپس ۱۰ میلی لیتر آب میلی کیو واتر اضافه و با فیلتر سرنگ ۰,۰۲ میکرومولار فیلتر شد. با استفاده از محلول پایه، غلظت های ۱۰ تا ۱ (صفر، یک، ده، صد و هزار میکرومولار) تهیه شد. برای تهیه تاموکسیفن، با افزودن ۰,۰۰۸۱ میلی گرم از پودر تاموکسیفن (سیگما-آلدریخ، فرانسه) به ۵ میکرولیتر دی ام اس او، محلول ۵ میکرومولار تاموکسیفن تهیه و بعنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

درمان سلول‌ها: زمانی که تعداد سلول‌های ام سی اف-سون کشت داده شده به حدود ۸۰ درصد رسید (فضای فلاسک به ۸۰ درصد رسید)، دو بار با ۵ میلی لیتر پی بی اس شستشو داده شده تا تمام آثار سرم از بین برود. در مجموع ۰,۸ میلی لیتر محلول محتوی (وزنی) تریپسین ۰,۲۵٪ / اتیلن دی آمین تترا استیک

اسید (تی دی تی ای) ۰/۵۳٪ میلی مولار و گرم شده به داخل فلاسک حاوی سلولها اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از اطمینان از جدا شدن سلولها از سطح فلاسک با استفاده از میکروسکوپ معکوس، سلول ها به لوله های فالكون ۱۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت گردش ۳۰۰ آر پی ام جمع آوری شد. پس از سانتریفیوژ، سلولهای شسته شده با ۱ میلی لیتر آر پی ام آی ۱۶۴۰ رقیق شدند. از این سلولها حدود 1×10^6 سلول در ۶ میلی لیتر محلول آر پی ام آی ۱۶۴۰ رقیق شده و به مدت یک شب اجازه داده شد تا سلولها انکوبه شده و به فلاسک بچسبند و روز بعد با تایموکینون و تاموکسیفن درمان شدند. دوز درمانی با تایموکینون با رقت های ۱۰ تایی شروع شد (۰ میکرومولار، ۱ میکرومولار، ۱۰ میکرومولار، ۱۰۰ میکرومولار و ۱۰۰۰ میکرومولار) تا دوز موثر و نسبتا ثابت آن پیدا شود و سپس با تاموکسیفن با غلظت ۵ میکرومولار برای تیمار سلولها مورد مقایسه قرار گرفته شد. این رده سلولی محتوی گیرنده‌های استروژنی می باشد.

تعیین درصد سمیت سلولی و میزان تکثیر

سلول‌ها بوسیله آزمایش ام تی اس: بمنظور تعیین پاسخ سلولها به درمان با تایموکینون، روش تعیین درصد سمیت سلولی ام تی اس با استفاده از کیت (سل-تیترا-۹۶ آکوآس پرومگا، آمریکا) انجام شد. طبق پروتکل سازندگان، کیت حاوی ترکیب تترازولیوم (محلول های ام تی اس و پی ام اس) بود. مکانیزم این روش بر اساس کاهش نمک تترازولیوم و تولید محصولات فرمازون رنگی شناخته شده است. پس از مرگ سلولی، سلول ها دیگر قادر به کاهش نمک تترازولیوم نیستند و محصول تولید شده رنگی فرمازون نشان دهنده نسبت تعداد سلول های زنده می باشد، یا عبارتی نسبت جذب با تعداد سلولهای زنده در محیط کشت متناسب خواهد بود. بطور کلی این تست میزان فعالیت متابولیکی سلول ها را نشان می دهد (چه سلولها مرده باشند و چه زنده). به مقدار تقریبی ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه (سلولهای درمان شده با

نگرفته اند. در حالیکه سلول‌هایی که برای هر دو ماده تشخیصی اف آی تی سی و پی آی مثبت هستند یعنی از قبل مرده اند و در مرحله آخر مرگ سلولی یا نکروزیس هستند. همچنین سلول‌هایی که اف آی تی سی مثبت و پی آی منفی هستند، یعنی تحت اثر فرآیند مرگ سلولی یا آپوپتوزیس قرار گرفته اند (بطور کلی حرکت سلولها از ناحیه سلولهای زنده بسمت آپوپتوزیس و سپس بسمت نکروزیس می باشد). سلولهای رنگ آمیزی شده با فلو سیتو متری (بی دی فاکس کانتو ۲) تجزیه و تحلیل شدند. در تعیین تفاوت بین در صد مرگ سلولها، تیمار سلولهای ام سی اف-سون با تایموکینون (غلظت ۱۰۰ میکرومولار در نظر گرفته شد بدلیل نتایج حاصل از آزمون ام تی اس که دلالت بر تاثیر عمده این غلظت در مقایسه با غلظت های دیگر دارد) و تاموکسیفن (با غلظت ۵ میکرومولار) انجام گرفته شد. برای هر نمونه سه تکرار زیستی مستقل تهیه شد. درصد سلولهای آپوپتوتیک با استفاده از برنامه کامپیوتری فاکس دیوا تعیین شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی یا آر تی-کیو

پی سی آر: بمنظور بررسی بیشتر در مکانیزم تایموکینون، بررسی میزان سطح بیان ام آر ان ای ژنهای مورد نظر سلولهای ام سی اف-سون با غلظت ۵۰ میکرومولار تایموکینون درمان شده (بدلیل سمیت زیاد ۱۰۰ میکرومولار) و در آزمایش آر تی-کیو پی سی آر بکار گرفته شدند. از جمله ژنهای دخیل در مکانیزم اثر تایموکینون بر آپوپتوزیس یا مرگ سلولهای سرطان پستان، ژن *UGT1A8* و ژن *CARD16* می باشند. ژن *GAPDH* یا گلیسر آلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز انسانی بعنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد تا سیگنالهای فلوروسانس را تنظیم کند. آر ان ای از سلولهای ام سی اف-سون درمان شده با تایموکینون و درمان نشده استخراج شد. غلظت کل آر ان ای و نسبت خلوص نمونه ها (درمان شده و درمان نشده) بوسیله اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترموساینترفیک، آمریکا) بدست آمد. نسبت جذب در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر میزان خلوص آر ان ای را نشان داد. به منظور ارزیابی کیفیت آر ان ای بدست

تایموکینون و سلولهای درمان نشده) در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ای ریخته شد. با در نظر گرفتن الگوی استاندارد سه چاهک در هر سه پلیت، به غلظت های مختلف اختصاص داده شد (از نمونه آزمایش و نمونه کنترل). سلولها با تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک بودند و سه بار تکرار انجام شد. محلول مغذی کشت سلولی آر پی ام آی از بین سلولها برداشته و به میزان ۱۰۰ میلی لیتر از آر پی ام آی تازه به سلولها اضافه شد. سپس حدود ۲۰ میکرولیتر مخلوطی از محلول ام تی اس و پی ام اس با نسبت ۲۰ به ۱ به هر چاهک افزوده شد. میکروپلیت ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ در جه سانتی گراد در انکوباتور مرطوب محتوی دی اکسید کربن ۵٪ قرار داده شدند. با استفاده از دستگاه الایزا (الایزا میکرو پلیت، آمریکا) میزان جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. نتایج حاصل از این آزمون مورد آنالیز آماری قرار گرفت. بمنظور تعیین دوز موثر و درمانی تایموکینون، نتایج حاصل از این آزمون (ام تی اس)، میزان تکثیر سلولی در غلظت های مختلف را نشان داد.

رنگ آمیزی سلولها به منظور تعیین درصد

مرگ سلولی با فلو سیتومتری: برای تعیین درصد مرگ سلولی در اثر تایموکینون و تفاوت آن با تاموکسیفن از کیت تشخیص سلولهای آپوپتوتیک حاوی آنکسین-۵ (اف آی تی سی، بی دی-بیو ساینس، آمریکا) استفاده شد. آنکسین-۵ کشش زیادی به فسفاتیدیل سرین (پی اس) موجود در غشاء سلول دارد و چنانچه سلول مرده باشد این ماده به خارج از غشای پلاسمائی ریخته می شود. ماده دیگر موجود در کیت تشخیص یدید پروپیدیم (پی آی) است که مانند یک پروپ استاندارد سیتومتریک عمل می کند و برای تشخیص سلولهای زنده از غیر زنده بکار می رود. سلولهای زنده با غشای دست نخورده، پی آی را حذف می کنند، در حالیکه غشای سلولهای مرده و آسیب دیده، به پی آی نفوذ پذیراند. در نتیجه سلول‌هایی که برای هر دو ماده تشخیصی اف آی تی سی و پی آی منفی هستند یعنی هنوز زنده مانده اند به این معنی است که تحت پرو سه آپوپتوزیس یا مرگ سلولی قرار

زیستی از هر نمونه درمان شده و درمان نشده تهیه شده بود. در این آزمایش با استفاده از روش نسبی یا مقایسه‌ای، میزان سطح بیان ام آر ان ای ژنهای مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت.

آنالیز آماری: آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار اس پی اس نسخه ۱۶ انجام گرفت. فرمول میانگین \pm انحراف معیار برای هر یک از تکرارها، میزان داده‌ها را مشخص کرد. آزمون آماری تحلیل واریانس یا آنووا با پی-ویو کمتر از ۰,۰۰۰۱، معنادار در نظر گرفته شد. آزمون مقایسه‌ای توکی تفاوت بین غلظت‌های مختلف و معنادار بودن آنها را نشان داد. به منظور آنالیز میزان بیان ژنها، روش مقایسه‌ای انتخاب شد تا میزان اسید نوکلئیک ژن هدف در هر نمونه درمان شده در مقایسه با نمونه درمان نشده تعیین شود. بمنظور تعیین مقدار بیان ژن‌ها یا تعیین میزان تغییر چین یا فولد ژن‌ها (دو به توان منفی دلتا دلتا سی تی یا روش لیووک)، دلتا سی تی سلولهای درمان شده (سی تی بدست آمده از ژن‌ها در نمونه درمان شده منهای سی تی بدست آمده از ژن کنترل داخلی) از دلتا سی تی سلولهای درمان نشده (سی تی بدست آمده از ژن‌ها در نمونه درمان نشده منهای سی تی بدست آمده از ژن کنترل داخلی) کسر شد.

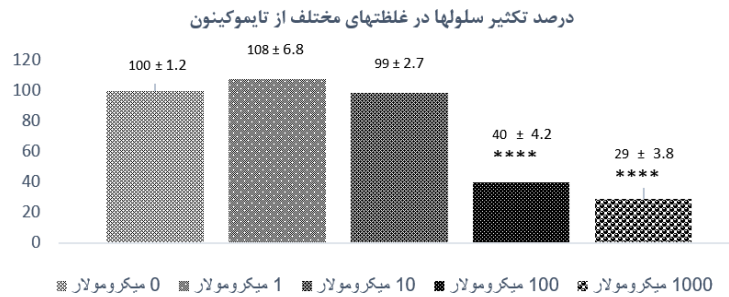
یافته‌ها

درصد تکثیر سلول‌های زنده سرطانی پس از درمان با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تایموکینون حدود ۴۰ درصد و با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار حدود ۲۹ درصد مشاهده شد. در غلظت‌های یک و ده میکرومولار از تایموکینون درصد سلولهای زنده تغییر چندانی نداشت و تقریباً مشابه با غلظت صفر بدست آمد (تصویر ۱).

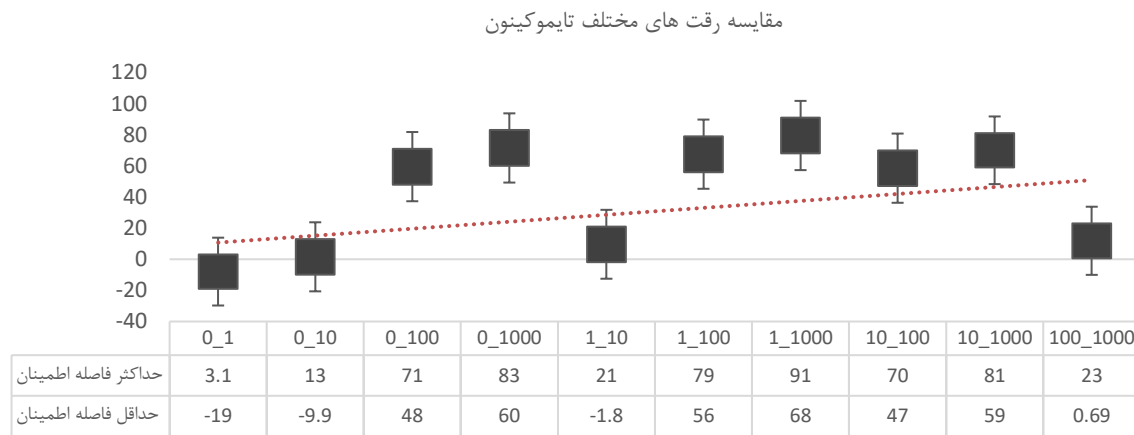
آزمون آماری تحلیل واریانس یا آنووا نشان داد که میانگین همه غلظت‌ها برابر نبوده و نتایج، اختلاف معناداری بین غلظت‌ها را نشان میدهند. اما اینکه این اختلاف معنادار ناشی از کدام دو جفت از غلظت‌ها می‌باشد، آزمون آماری توکی انجام گرفت و نشان داد که بین غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار تفاوت زیادی دیده نمی‌شود. بین ۰ میکرومولار، ۱۰۰ و ۱۰۰۰

آمده و میزان یکپارچی آن، از کیت آر ان ای ۶۰۰۰ نانو لب چیپ براساس دستورالعمل سازنده و دستگاه بیوآنالیزر (آجیلنت، آمریکا) استفاده شد. همچنین بمنظور بدست آوردن سی دی ان ای، نمونه آر ان ای تخلیص شده در واکنش دو مرحله‌ای رونویسی برعکس (تبدیل آر ان ای به سی دی ان ای) مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول بر طبق دستورالعمل سازنده کیت، تبدیل آر ان ای به سی دی ان ای انجام گرفت. سپس سی دی ان ای بدست آمده بوسیله واکنش آر تی-کیو پی سی آر و با استفاده از محلول تگ من فسفادونس مستر میکس (لایف تکنولوژی، آمریکا) تشدید بیان شد در حضور پرایمرهای خاصی برای *UGT1A8* (پرایمر آغازگر: GCTCTAAAAGCAGTCATCAATGAC پرایمر معکوس: GTGCCTCATCACAACTCCACC)، برای *CARD16* (پرایمر آغازگر: ATTCCGAAAGGGGCACAGGCAT و پرایمر معکوس: TCTGCCTTCTGGGCTTGAGCAT) و برای *GAPDH* (پرایمر آغازگر: GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG و پرایمر معکوس: ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA).

که طراحی و خریداری شد (بی دی بیوساینس، آمریکا). لازم بذکر است که محلول تگ من فسفادونس مستر میکس محتوی پلیمراز، نوکلئوتید تری فسفات و یک پروپ بود. دستگاه اپلاید بیوسیستم استپ وان پلاس ریل تایم پی سی آر برای انجام این آزمایش بکار گرفته شد. به منظور تعیین تاثیر پرایمر، منحنی استاندارد براساس دستورالعمل سازنده کیت (اپلاید بیوسیستم، آمریکا) و نمودار تشدید یا افزایش بیان برای هر ژن هدف و کنترل داخلی ترسیم شد. واکنش آر تی-کیو پی سی آر برای ۴۰ سیکل رانده شد (هر سیکل شامل: مرحله دناتوره شدن در ۹۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه، مرحله چسبیدن پرایمرهای ساخته شده روی دی ان ای در ۶۵ درجه سانتیگراد بمدت ۳۰ ثانیه و مرحله استفاده از دی ان ای پلیمراز برای رونویسی از قطعه مورد نظر در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱,۵ دقیقه بود). چهار تکرار



تصویر ۱- درصد تکثیر سلولی بعد از درمان با تایموکینون: داده ها به عنوان میانگین \pm انحراف معیار از سه آزمایش مستقل نشان داده شده است. آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه (آنووا) نشان داد که اختلاف معنی داری بین غلظت های مختلف (۰ میکرومولار، ۱، ۱۰، ۱۰۰ میکرومولار، ۱۰۰۰ میکرومولار و ۱۰۰۰۰ میکرومولار) در پی-ولید > 0.0001 (***) وجود دارد.



تصویر ۲- مقایسه اثرات تایموکینون با رقت های ۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکرومولار روی سلولهای سرطان پستان

نتایج حاصله از آزمایش مرگ سلولی انجام شده بو سیله کیت انکسین-۵ نشان داد که تاموکسیفن ۵ میکرومولار بعد از ۲۴ ساعت می تواند حدود ۱۷ درصد از سلولهای ام سی اف-سون سرطان پستان را بسمت مرحله آخر مرگ سلولی هدایت نماید. و فقط حدود ۴ درصد از سلولها در مرحله اول مرگ سلولی قرار دارند. این در حالیست که تاثیر تایموکینون ۱۰۰ میکرومولار بر سلولهای تیمار شده بعد از ۲۴ ساعت بسیار آشکار و معنادار می باشد. یعنی در حدود ۱۰ درصد از سلولها در اوائل مرحله مرگ سلولی می باشند و حدود ۸۲ درصد از سلولها به مرحله آخر مرگ سلولی وارد شده اند. در گروه درمان نشده حدود ۱۶ درصد از کل سلولها بعد از ۲۴ ساعت بدست آمد.

مقایسه نتایج بدست آمده از سه گروه مورد نظر نشان دهنده تاثیر قوی تایموکینون در سلولهای درمان

میکرومولار تفاوت محسوس بود. همچنین بین ۱ میکرومولار، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار تفاوت معناداری وجود داشت. علاوه براین، بین غلظت ۱۰ میکرومولار، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نیز اختلاف معنادار بدست آمد. تفاوت اثر بین غلظت های ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار خیلی زیاد نبود (تصویر ۲).

نتایج آزمون توکی نشان میدهد که فاصله اطمینان بین دو گروه اول غلظت ها، گروه دوم، گروه پنجم و گروه دهم شامل نقطه صفر می باشد. یعنی مقدار میانگین بین این جفت گروه ها اختلاف معناداری ندارند. در حالیکه فاصله اطمینان بین گروه سوم غلظت ها، گروه چهارم، ششم، هفتم، هشتم و نهم بالای صفر می باشد. یعنی میانگین بین این جفت گروه ها اختلاف معناداری دارند.



تصویر ۳- کاهش درصد سلول‌های زنده بعد از ۲۴ ساعت درمان با تایموکینون ۱۰۰ میکرومولار در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده و تاموکسیفن ۵ میکرومولار. همچنین افزایش درصد سلول‌ها در اوائل مرگ سلولی و بطور معناداری در اواخر مرگ سلولی با نمونه تایموکینون دیده می‌شود.

جدول ۱- میزان ارزش میانگین سی تی \pm انحراف معیار برای ژن‌های مورد نظر

ژن	میانگین سی تی \pm انحراف معیار
GAPDH	0.19 ± 18.84
CARD16	0.69 ± 27.46
UGT1A8	0.52 ± 35.54

ارزش سی تی کمتر از ۲۹ بعنوان واکنش مثبت قوی تلقی می‌شود که نشان از میزان کافی از ژن هدف دارد. ارزش سی تی بین ۳۰-۳۷ بعنوان واکنش مثبت قلمداد می‌شود که حاکی از میزان متوسط ژن هدف می‌باشد.

بحث

مطالعات قبلی افزایش تعداد سلول‌های آپوپتوتیک در سلول‌های سرطان استخوان موش منتج از آزمایش با انکسین-۵ را نشان داده‌اند (۱۸). در مطالعه ای روی سلول‌های سرطان خون (لوسمی میلوبلاستیک) تعداد قابل اندازه گیری از سلول‌های آپوپتوتیک بدنال درمان با تایموکینون ۱۰۰ میکرومولار یافت شدند که حدود ۲۰ درصد، ۴۹ درصد و ۶۵ درصد بترتیب بعد از ۲، ۴ و ۶ ساعت بودند (۱۹). سمیت تایموکینون بوسیله آزمایش ام تی تی در سلول‌های سرطان مثانه تیمار شده و بدنال آن آپوپتوزیس سلول‌ها گزارش شده است (۲۰). درمان سرطان سلول‌های پوششی پوست نیز با تایموکینون، سمیت و مرگ سلولی را بوسیله آزمایش ام تی تی و فلوسیتومتری نشان داد (۲۱). تاکنون گزارش‌های فراوانی از اثر سمیت تایموکینون و شروع آپوپتوزیس در انواع مختلف سلول‌های سرطانی گزارش شده است. بطور مثال در سلول‌های سرطان معده (۲۲)،

شده در مقایسه با درمان نشده‌ها و تاموکسیفن دارد. روند تغییر مکان سلول‌ها به این معناست که اکثریت سلول‌ها دیگر زنده نیستند و به سمت آپوپتوزیس و در نهایت نکروزیس رفته‌اند. نتایج حاصل از استخراج آر ان ای از هر نمونه سلول‌های درمان شده با تایموکینون و درمان نشده، خلوص بالای نمونه‌ها و همچنین یکپارچگی در آر ان ای را نشان داد (۹،۸۰) خلوص، نسبت ای ۲۶۰ به ای ۲۳۰ بیشتر از ۲، نسبت ای ۲۶۰ به ای ۲۸۰ بیشتر از ۱،۸ و وجود دو رشته کامل آر ان ای ریبوزومی). میزان ارزش میانگین سی تی \pm انحراف معیار برای ژن‌های مورد نظر میزان کافی و قابل قبولی از واکنش پی سی آر را نشان داد (جدول ۱). در نهایت انجام آزمایش آر تی-کیو پی سی آر، میزان افزایش بیان ژن *CARD16* به میزان ۹ فولد و کاهش بیان ژن *UGT1A8* به میزان ۱۱ فولد را تحت اثر تایموکینون نشان داد.

سرطان کلیه (۲۳)، سرطان خون (۲۴)، لنفوم (۲۵)، سرطان روده (۲۶) و غیره.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار تایموکینون در مقایسه با دیگر غلظت‌ها اثر سمیت بسیار قوی بر سلولهای سرطان پستان دارند ولی با کمی تفاوت از یکدیگر. در غلظت ۱۰۰ میکرومولار تایموکینون حدود ۴۰ درصد از سلولها و در غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار حدود ۲۹ درصد از سلولها توانایی تکثیر داشتند. در نتیجه تعداد سلولهای زنده سرطانی در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرومولار تایموکینون بسیار کم خواهد شد.

تاموکسیفن (۴-TAM, 2) -۱- دی متیل آمینو اتوکسی (فنیل) -۱- و -۲- دی فنیل بوت -۱- (ene-Z) یک ترکیب غیر استروئیدی و ضد استروژن است که بعنوان درمان انتخابی سرطانهای پستان حاوی گیرنده استروژنی شناخته شده است (۲۷). در مطالعات قبلی تجویز همزمان با داروهای گیاهی بمنظور کاهش عوارض آن پیشنهاد شده است. از جمله این گیاهان دارویی، تایموکینون است که در تجویز همزمان با تاموکسیفن باعث کاهش بیان ژن *XIAP* شده و منجر به فعال شدن کاسپاز ۹، و باعث مهار در مسیر بقای سلولی و در نهایت به مرگ سلولی منتهی خواهد شد (۲۸). در مطالعه‌ای دیگر اثر هم افزایی این دو ترکیب دارویی بطور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش تعداد سلولهای زنده سرطانی شد (۲۹). علاوه بر این ترانس-تاموکسیفن-۴-او-گلوکورونید یکی از متابولیت‌های فعال تاموکسیفن است که تمایل زیادی به گیرنده‌های استروژنی دارد (۳۰). مطالعات گذشته افزایش بیان ژن *UGT1A8* در اثر درمان با تاموکسیفن را نشان داده است که می‌تواند منجر به افزایش تشکیل ترانس-تاموکسیفن-۴-او-گلوکورونید شود. اتصال متابولیت او-گلوکورونیداسیون به میزان قابل توجهی به گیرنده‌های استروژنی کاهش می‌یابد و این مسیر منتهی به انباشته شدن استروژن در بدن و بروز عوارض ناشی از زیادی استروژن می‌شود (۲۷). بنابراین اگر از تشکیل این متابولیت جلوگیری شود می‌توان از انباشته شدن استروژن در بدن و بدنبال آن از عوارض استروژن

اضافی جلوگیری کرد. کاهش بیان ژن *UGT1A8* در اثر تایموکینون، می‌تواند در فرایند گلوکورونیداسیون تاموکسیفن تاثیرگذار باشد و باعث کاهش تبدیل متابولیت‌های ترانس-۴-او-گلوکورونید به ترانس-تاموکسیفن-۴-او-گلوکورونید و در نتیجه کاهش میزان استروژن و عوارض آن گردد. بنابراین کاهش بیان ژن *UGT1A8* یافته ارزشمندی می‌تواند باشد که حاکی از کاهش تبدیل متابولیت‌های تاموکسیفن خواهد بود. از طرفی این ژن می‌تواند نوع متوکسی استروژن را در سلولها حفظ کند که البته ترکیب غیر سرطانی از استروژن است (۳۱). در این مطالعه کاهش در میزان ژن *UGT1A8* دلالت بر فعالیت و افزایش بیان ترکیب ۲-متوکسی استرادیول دارد. در نتیجه این یافته بر اثر ضد سرطانی و ضد رگزائی تایموکینون نیز تاکید می‌کند.

کاسپاز ۱ نقش مهمی در مرگ پاتولوژیک سلولی یا مرگ سلولی برنامه ریزی شده دارد، البته با مکانیزم ناشناخته (۳۲). یافته‌های مطالعه ما نشان داد که بعد از درمان سلولهای سرطان پستان با تایموکینون، بیان ژن *CARD16* به میزان ۹ فولد افزایش داشت. این یافته حکایت از توانایی تایموکینون در راه اندازی مکانیزم مرگ سلولی یا آپوپتوزیس دارد که می‌تواند از طریق فعال کردن کاسپازها خصوصاً کاسپاز ۱ تحت تاثیر این ژن انجام شود. در مطالعه‌ای دیگر افزایش بیان ژن *PTPRR* بدلیل تاثیر تایموکینون بر سلولهای سرطان پستان باعث فعال شدن پروتئین ۵۳ شده و منتهی به مرگ سلولی شد (۳۱). همچنین افزایش بیان لیگاند مرگ بعد از درمان با تایموکینون گزارش شده است که کاسپاز ۳ را فعال کرده و نهایتاً رخداد مرگ سلولی (۳۳). تایموکینون باعث القاء در افزایش بیان ژن پار-۴ در سرطان پروستات می‌شود، در نتیجه منجر به پیری سلولی و افزایش پروتئین ۵۳ و در نهایت منتهی به مرگ سلولی می‌گردد (۳۴). اثرات ضد سرطانی تایموکینون منجر به کاهش میزان فاکتور رشد اندوتلیال عروقی نیز شده و فعالیت کاسپاز ۳ را افزایش می‌دهد (۳۵).

2. Jordan VC. Chemoprevention of breast cancer with selective oestrogen-receptor modulators. *Nat Rev Cancer*. 2007;7: 46-53.

3. Khan MA, Tania M, Fu J. Epigenetic role of thymoquinone: impact on cellular mechanism and cancer therapeutics. *Drug Discovery Today*. 2019;24: 2315-22.

4. Ahmad A, Mishra RK, Vyawahare A, Kumar A, Rehman MU, Qamar W, et al. Thymoquinone (2-Isopropyl-5-methyl-1, 4-benzoquinone) as a chemopreventive/anticancer agent: Chemistry and biological effects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2019;27: 1113-26.

5. Bashmail HA, Alamoudi AA, Noorwali A, Hegazy GA, Ajabnoor GM, Al-Abd AM. Thymoquinone Enhances Paclitaxel Anti-Breast Cancer Activity via Inhibiting Tumor-Associated Stem Cells Despite Apparent Mathematical Antagonism. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2020;25: 426.

6. Samarghandian S, Azimi-Nezhad M, Farkhondeh T. Thymoquinone-induced antitumor and apoptosis in human lung adenocarcinoma cells. *J Cell Physiol*. 2019;234: 10421-31.

7. El-Far AH, Al Jaouni SK, Li W, Mousa SA. Protective roles of thymoquinone nanoformulations: potential nanonutraceuticals in human diseases. *Nutrients*. 2018;10: 1369.

8. Haron AS, Syed Alwi SS, Saiful Yazan L, Abd Razak R, Ong YS, Zakarial Ansar FH, et al. Cytotoxic Effect of Thymoquinone-Loaded Nanostructured Lipid Carrier (TQ-NLC) on Liver Cancer Cell Integrated with Hepatitis B Genome, Hep3B. Evidence-based complementary and alternative medicine: *Ecam*. 2018; 2018: 1549805.

9. Kommineni N, Saka R, Bulbake U, Khan W. Cabazitaxel and thymoquinone co-loaded lipospheres as a synergistic combination for breast cancer. *Chem Phys Lipids*. 2019; 224: 104707.

10. Shanmugam MK, Ahn KS, Hsu A, Woo CC, Yuan Y, Tan KHB, et al. Thymoquinone Inhibits Bone Metastasis of Breast Cancer Cells Through Abrogation of the CXCR4 Signaling Axis. *Front Pharmacol*. 2018; 9: 1294.

11. Kus G, Ozkurt M, Kabadere S, Erkasap N, Goger G, Demirci F. Antiproliferative and antiapoptotic effect of thymoquinone on cancer cells in vitro. *Bratislavske Lekarske Listy*. 2018; 119: 312-6.

12. Guan D, Li Y, Peng X, Zhao H, Mao Y, Cui Y. Thymoquinone protects against cerebral small vessel disease: Role of antioxidant and anti-inflammatory activities. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2018; 32: 225-31.

13. Dur A, Köse H, Koçyiğit A, Kocaman O, Ismayilova M, Sonmez FC. The anti-inflammatory

نتیجه‌گیری

تاکنون گزارش‌های مختلفی در سمیت و تاثیر درمانی تایموکینون گزارش شده است. این مطالعه محدود به کاربرد یک نوع از سلول‌های سرطانی بود و از طرفی بدلیل یافتن یک دوز درمانی موثر، فقط یک دوز از تایموکینون با تاموکسیفن مقایسه شد. با توجه به نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان بر توانایی تایموکینون در کاهش رشد سلول‌های سرطانی، فعال کردن کاسپاز ۱ و راندن سلول‌ها بسمت چرخه مرگ تاکید کرد. علاوه بر این تایموکینون با کاهش میزان بیان ژن *UGT1A8* بر چرخه گلوکورونیداسیون اثر گذاشته و باعث کاهش تولید فرآورده‌های تاموکسیفن شده و در نهایت میزان استروژن انباشته شده در بدن کاهش یافته و بدن‌بال آن عوارض ناشی از زیادی استروژن از بین می‌رود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه با کد طرح کوتاه مدت ۳۰۴/۳۳۱۱۰۳۳ دانشگاه علوم مالزی انجام شده است. بدینوسیله نویسندگان این مقاله نهایت تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه علوم مالزی برای در اختیار گذاشتن آزمایشگاه تحقیقاتی بعمل می‌آورند.

ملاحظات اخلاقی

تمامی ملاحظات اخلاقی در مطالعه رعایت شده است. بر طبق دستورالعمل مرکز تحقیقات دانشگاه علوم مالزی، استفاده از سلول‌های خریداری شده از ای تی سی سی نیازی به تأیید کمیته اخلاق نداشت. در بخش کشت سلولی توضیح داده شد.

مشارکت نویسندگان

تمامی نویسندگان در تمامی مراحل مشارکت داشته‌اند.

References

1. Rugo H. The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors. *Ann Oncol*. 2008;19: 16-27.

and antioxidant effects of thymoquinone on ceruleine-induced acute pancreatitis in rats; 2016.

14. Ren X, Luo W. Exploration of pro-apoptotic effect of Thymoquinone on oral squamous cell carcinoma cells through PI3K/Akt signaling pathway. *Cell Mol Biol.* 2019; 65: 61-4.

15. Hatiboglu MA, Kocyigit A, Guler EM, Akdur K, Nalli A, Karatas E, et al. Thymoquinone induces apoptosis in B16-F10 melanoma cell through inhibition of p-STAT3 and inhibits tumor growth in a murine intracerebral melanoma model. *World Neurosurg.* 2018; 114: e182-e90.

16. NCBI Resources. Gene. [Online]. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/114769>. Accessed on 16th May 2014.

17. Gene Database. The Human Gene Compendium [Online]. Available at: <http://www.genecards.org>. Accessed on 30th January 2020.

18. Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol.* 2003; 22: 107-13.

19. 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.

20. Zhang M, Du H, Huang Z, Zhang P, Yue Y, Wang W, et al. Thymoquinone induces apoptosis in bladder cancer cell via endoplasmic reticulum stress-dependent mitochondrial pathway. *Chemico-biol Interact.* 2018; 292: 65-75.

21. Park JE, Kim DH, Ha E, Choi SM, Choi J-S, Chun K-S, et al. Thymoquinone induces apoptosis of human epidermoid carcinoma A431 cells through ROS-mediated suppression of STAT3. *Chemico-biol Interact.* 2019; 312: 108799.

22. Lee SR, Mun JY, Jeong MS, Lee HH, Roh YG, Kim WT, et al. Thymoquinone-Induced Tristetraprolin Inhibits Tumor Growth and Metastasis through Destabilization of MUC4 mRNA. *Int J Mol Sci.* 2019; 20.

23. Liou YF, Chen PN, Chu SC, Kao SH, Chang YZ, Hsieh YS, et al. Thymoquinone suppresses the proliferation of renal cell carcinoma cells via reactive oxygen species-induced apoptosis and reduces cell stemness. *Environ Toxicol.* 2019; 34: 1208-20.

24. Diab-Assaf M, Semaan J, El-Sabban M, Al Jaouni SK, Azar R, Kamal MA, et al. Inhibition of Proliferation and Induction of Apoptosis by Thymoquinone via Modulation of TGF Family, p53, p21 and Bcl-2alpha in Leukemic Cells. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry.* 2018; 18: 210-5.

25. Soltani A, Pourgheysari B, Shirzad H, Sourani Z. Antiproliferative and Apoptosis-Inducing Activities of Thymoquinone in Lymphoblastic Leukemia Cell Line. *Indian journal of hematology &*

blood transfusion : an official journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion. 2017; 33: 516-24.

26. Khalife R, Hodroj MH, Fakhoury R, Rizk S. Thymoquinone from *Nigella sativa* Seeds Promotes the Antitumor Activity of Noncytotoxic Doses of Topotecan in Human Colorectal Cancer Cells in Vitro. *Planta Medica.* 2016; 82: 312-21.

27. Ogura K, Ishikawa Y, Kaku T, Nishiyama T, Ohnuma T, Muro K, et al. Quaternary ammonium-linked glucuronidation of trans-4-hydroxytamoxifen, an active metabolite of tamoxifen, by human liver microsomes and UDP-glucuronosyltransferase 1A4. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 1358-69.

28. Rajput S, Kumar BN, Sarkar S, Das S, Azab B, Santhekadur PK, et al. Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. *PLoS One.* 2013; 8: e61342.

29. Ganji-Harsini S, Khazaei M, Rashidi Z, Ghanbari A. Thymoquinone Could Increase The Efficacy of Tamoxifen Induced Apoptosis in Human Breast Cancer Cells: An In Vitro Study. *Cell J.* 2016; 18: 245-54.

30. Gajjar K, Martin-Hirsch PL, Martin FL. CYP1B1 and hormone-induced cancer. *Cancer Lett.* 2012; 324: 13-30.

31. Motaghd M, Muti Al-Hassan F, Hamid SS. Thymoquinone regulates gene expression levels in the estrogen metabolic and interferon pathways in MCF7 breast cancer cells. *Int J Mol Med.* 2014; 33: 8-16.

32. Tvrdík D, Skálová H, Dundr P, Povýšil C, Velenská Z, Berková A, et al. Apoptosis - associated genes and their role in predicting responses to neoadjuvant breast cancer treatment. *Med Sci Monit.* 2012; 18: BR60-BR7.

33. Helmy SA, El-Mesery M, El-Karef A, Eissa LA, El Gayar AM. Thymoquinone upregulates TRAIL/TRAILR2 expression and attenuates hepatocellular carcinoma in vivo model. *Life Sci.* 2019; 233: 116673.

34. Subburayan K, Thayyullathil F, Pallichankandy S, Rahman A, Galadari S. Par-4-dependent p53 up-regulation plays a critical role in thymoquinone-induced cellular senescence in human malignant glioma cells. *Cancer Lett.* 2018; 426: 80-97.

35. Ozturk SA, Alp E, Saglam ASY, Konac E, Menevse ES. The effects of thymoquinone and genistein treatment on telomerase activity, apoptosis, angiogenesis, and survival in thyroid cancer cell lines. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14: 328.