مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
پاییز ۱۳۹۲؛۵(۳):۵۹۱-۵۸۵

*Journal of North Khorasan University of Medical Sciences*
*Autumn2013;5(3):585-591*

**مقاله پژوهشی**

# بررسی اثر فراکسیون آبی سیاه دانه بر درصد زنده ماندن سلولهای سرطان کلیه انسان رده ACHN و سلولهای اپیتلیال سالم کلیه انسان رده ۲۹۳– GP

*سمیرا شهرکی[۱]، ابوالفضل خواجوی[۲]، محمود محمودی[۳]، نفیسه السادات طبسی[۴]، شهرزاد هواه خواه[۵]، سارا حسینیان[۵]، صغری پرهیزگار[۱]، محمد ناصر شافعی[۶*]*

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۲]استادیار مرکزتحقیقات فیزیولوژی کاربردی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۳] استاد مرکز تحقیقات ایمونولوژی و گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۴]کارشناس ارشد فیزیولوژی – مرکز تحقیقات ایمونولوژی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۵]دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[۶]استادیار مرکزتحقیقات علوم شناختی و گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
[*]**نویسنده مسئول**: دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
پست الکترونیک : shafeimn@mums.ac.ir

**وصول:۹۱/۱۰/۲۴اصلاح: ۹۱/۱۱/۳۰ پذیرش:۹۱/۱۲/۲۱**

**چکیده**

***زمینه و هدف:*** *کارسینوم سلول کلیه (RCC) کشنده ترین نوع سرطان دستگاه ادراری است. روشهای درمانی آن شامل جراحی، ایمنوتراپی، شیمی درمانی و تعدیل کننده های پاسخ بیولوژیک می باشد. گیاهان دارویی از جمله سیاه دانه نیز در درمان سرطان ها مورد توجه است. لذا در این مطالعه اثر فراکسیون آبی سیاه دانه بر درصد زنده ماندن دو رده سلول سرطانی اپیتلیال کلیه انسان (ACHN) و سلول نرمال اپیتلیال کلیه انسان ( GP-۲۹۳ ) مورد مطالعه قرار گرفته است.*

***مواد و روش کار:*** *در این مطالعه تجربی پس از تهیه عصاره آبی الکلی ۷۰٪ سیاه دانه و استخراج فراکسیونهای N-هگزان، دی کلرومتان، اتیل استات و N-بوتانل، فراکسیون آبی عصاره سیاه دانه بدست آمد. در این پژوهش ۲ رده سلول سرطانی ACHN و سلول نرمال ۲۹۳ -GPاستفاده شد. سلولها پس از انتقال به پلیت ۹۶ خانه در معرض غلظت های مختلف فراکسیون آبی قرار گرفتند و میزان زنده بودن آنها در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با روش MTT بررسی شد. داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. نتایج به صورت Mean ± SEM ارائه و برای مقایسه متغیرها از آزمون واریانس یک طرفه ANOVA استفاده گردید.*

***یافته ها:*** *اثر فراکسیون آبی سیاه دانه بر درصد زنده ماندن سلولهای ۲۹۳-GP در غلظت ها و زمانهای مورد نظر تاثیر معنی داری نداشت ولی بطور معنی داری درصد زنده ماندن سلولهای ACHN را بسته به زمان و غلظت نسبت به گروه کنترل و رده سلولی ۲۹۳-GP کاهش داد.*

***نتیجه گیری:*** *نتایج نشان داد که فراکسیون آبی سیاه دانه بطور معنی داری بر رده سلول سرطانی ACHN اثر سیتوتوکسیسیتی داشته ولی بر رده سلولی نرمال ۲۹۳-GP اثر معنی داری نداشته است.*

***واژه های کلیدی:*** *کارسینوم کلیه، سیاه دانه، فراکسیون آبی، تست MTT، رده سلولی ACHN، رده سلولی ۲۹۳ -GP*

**مقدمه**

کارسینوم سلول کلیه (Renal Cell Carcinoma )RCC کشنده ترین نوع سرطان دستگاه ادراری است. RCC تقریباً ۳٪ سرطانهای بالغین و ۹۵-۹۰٪ تمام موارد تومورهای بدخیم اولیه کلیه را تشکیل می دهد و میزان ابتلا به آن در مردان بیشتر از زنان است. کشیدن سیگار و

چاقی مهمترین عوامل ایجاد کننده این بیماری به شمار می آیند [۱-۲]. علائم سه گانه کلاسیک RCC عبارتند از: هماچوری، درد پهلو و وجود تودۀ قابل لمس شکمی [۳]. روشهای درمانی مورد استفاده برای RCC شامل جراحی، هورمون درمانی، ایمنو تراپی، شیمی درمانی و تعدیل کننده های پاسخ بیولوژیک می باشند [۴]. گیاهان دارویی نیز به علت دارا بودن مزیت های زیادی از جمله آنها ارزان و قابل دسترس بودن و پذیرش بهتر بوسیله بیماران برای درمان بیماریها از جمله سرطان مورد توجه قرار گرفتند. یکی از این گیاهان دارویی که مورد توجه واقع شده است سیاه دانه (Nigella sativa) می باشد. سیاه دانه گیاهی است یک ساله، علفی و از تیره آلاله (Ranunculaceae) [۵] که حدود ۳۰-۲۰ سانتی متر طول داشته و دارای گل های سیاه دانه سفید، زرد، صورتی، آبی کمرنگ و قرمز می باشد [۶]. این گیاه در جنوب آسیا Black Cumin، در زبان عربی حب السودا و در زبان لاتین Panacea نیز نامیده شده است [۷]. ترکیبات متعدد در سیاه دانه یافت شده که از جمله آنها روغن غیرفرار، آلکالوئید و ساپونین [۸]، اولئیک و لینولئیک اسید [۹] است. اسانس سیاه دانه شامل تیموکینون (Thymoquinone)، ρ-cymene، کارواکرول t-anethol، 4-terpineol و longifoline می باشد [۱۰]. بقیه ترکیبات سیاه دانه شامل استرول ها، تری اسیل گلیسرولها، فسفولیپیدها، تانن ها، رزین ها، هیدروکسی کتونها، پلی فنولها، توکروفرولها و ویتامین ها می باشند [۱۱]. سیاه دانه دارای اثرات درمانی قابل توجهی از جمله: اثر آنتی اکسیدانی، اثر ضد درد و ضد التهاب، اثر ضد سرطان و ضد جهش، اثر ضد سمیت کبدی و کلیوی، اثر ضد دیابتی، اثر روی سیستم ایمنی و اثر ضد اولسر می باشد [۱۰]. روغن سیاه دانه و ترکیبات جداشدۀ آن اثرات مشخصی علیه سلولهای سرطانی انسانی دارند و همچنین سمیت متداول داروهای ضد سرطان را کاهش می دهد [۱۲]. سیاه دانه اثر ضد توموری قوی بر علیه سرطان خون، ریه [۱۳]، کبد [۱۴]، پستان [۱۵] و رحم [۱۶] دارد. یکی ازمواد مؤثره مهم سیاه دانه تیموکینون است که دارای اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثر ضد سرطانی می باشد [۱۷]. اثرات این گیاه بر روی سلولهای سرطانی کلیه نیز مورد بررسی قرار گرفته است .در مطالعه ای که توسط بارک[1] و همکاران (۲۰۰۷ ) انجام شد [۱۸]، اثرضد سرطانی این گیاه بر روی سلولهایP۸۱۵ (سلولهای سرطانی پستان)، VERO (سلولهای کارسینومای کلیه میمون)، BSR (سلولهای کارسینومای کلیه موش) و ICO1 (سلولهای کارسینومای قلب گوسفند) نشان داده شد و در مطالعه ای دیگر که در سال ۲۰۱۰ توسط طبسی و همکاران انجام شد [۱۹]، مشخص گردید که اثر الکلی سیاهدانه موجب کاهش معنی دار میزان تکثیر سلولی وافزایش آپوپتوزیس سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN می گردد. علی رغم مطالعات متعدد خواص ضد سرطانی فراکسیون آبی این گیاه بررسی نشده است. لذا در این مطالعه اثر فراکسیون آبی عصاره آبی الکلی سیاه دانه بر درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی کلیه انسان رده ACHN و سلولهای نرمال اپیتلیال کلیه انسان رده ۲۹۳ -GP بررسی گردید.

**روش کار**

پس از تهیه سیاه دانه، ۱۰۰ گرم پودر آن در محلول ۷۰٪ الکل و ۳۰٪ آب مقطر بمدت ۷۲ خیسانده و عصاره آبی الکلی ۷۰٪ تهیه شد. برای تهیه فراکسیونها ۱۰ گرم از عصاره تهیه شده با ۱۰۰ میلی لیتر اتانول مخلوط گردید و به قیف دکانتور منتقل شد. حلال N- هگزان به قیف دکانتور اضافه شد و فراکسیون N-هگزان استخراج گردید. در مرحله بعد محلول باقیمانده در قیف دکانتور با حلال دی کلرومتان ترکیب شد و فراکسیون دی کلرومتان استخراج گردید. سپس محلول باقیمانده از مرحله قبل با حلال اتیل استات ترکیب شد و فراکسیون اتیل استات استخراج گردید و در نهایت محلول باقیمانده از مرحله قبل با N-بوتانل ترکیب و فراکسیون های N-بوتانل استخراج گردید و محلول باقیمانده در قیف دکانتور به عنوان فراکسیون آبی در نظر گرفته شد. فراکسیون آبی پس از حذف حلال با غلظتهای مورد نظر تهیه ومورد آزمایش قرار گرفت [۲۰]. از ۱۰ گرم عصاره سیاه دانه ۴/۱۶ گرم فراکسیون آبی استخراج گردید.

1-Mbarek

در این مطالعه تجربی از رده سلولی ACHN (سلول آدنوکارسینوم کلیه انسان) و رده سلولی GP- ۲۹۳ (سلول نرمال اپیتلیال کلیه انسان) که از انستیتوپاستور ایران خریداری شدند استفاده گردید. سلولها در محیط کشت DMEM (حاوی گلوکز با غلظت ۴/۵ mg/ml ) به همراه ۱۰٪ سرم گاوی جنین (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین و در انکوباتور $CO_2$ ۵% و ºC ۳۷ کشت داده شدند.

در این مطالعه ۲ رده سلولی سرطانی (ACHN) و غیر سرطانی (GP-۲۹۳) به ۴ گروه به شرح زیر تقسیم شدند:

۱) گروه کنترل سالم: در این گروه رده سلولی غیر سرطانی (GP-۲۹۳) بدون درمان با هیچ ماده ای در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM قرار گرفتند.

۲) گروه کنترل بیمار: در این گروه رده سلولی سرطانی (ACHN) بدون درمان با هیچ ماده ای در ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM قرار گرفتند.

۳) گروه کنترل سالم با فراکسیون آبی: سلولهای غیر سرطانی GP-۲۹۳ موجود در این گروه با غلظتهای های µg/ml ۱۹/۸، ۳۹/۶، ۹۹، ۱۹۸، ۲۹۷، ۳۹۶، ۴۹۵، ۵۹۴، ۶۹۳ و ۷۹۲ از فراکسیون آبی در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درمان شدند.

۴) گروه درمان با فراکسیون آبی: سلولهای سرطانی ACHN موجود در این گروه با هایµg/ml ۱۹/۸، ۳۹/۶، ۹۹، ۱۹۸، ۲۹۷، ۳۹۶، ۴۹۵، ۵۹۴، ۶۹۳ و ۷۹۲ از فراکسیون آبی در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت درمان شدند.

کریستالهای آبی رنگ فورمازان می شود که در زیر میکروسکوپ به راحتی قابل تشخیص هستند. جهت بررسی درصد سلولهای زنده از تست MTT استفاده شد.

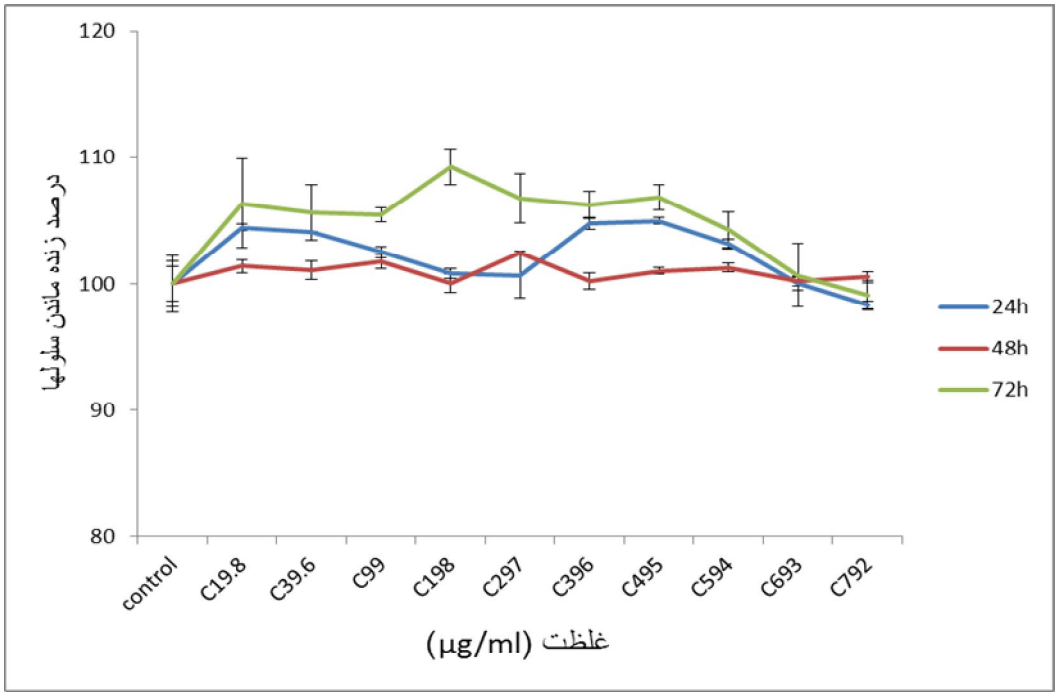
پس از انجام تست تریپان بلو و شمارش تعداد سلولهای زنده هر دو رده سلولی به پلیت ۹۶ خانه منتقل شدند. برای هر یک از دو رده سلولی ACHN و ۲۹۳ -GP سه پلیت و برای هر غلظت ۳ چاهک در نظر گرفته شد. به هر چاهک ۵۰۰۰ سلول ACHN و $۱۰^۴$ سلول ۲۹۳ -GP به همراه ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد. پس از طی ۲۴ ساعت جهت چسبیدن سلولها به کف پلیت، محیط کشت رویی هر چاهک خارج گردید. سپس هر دو رده سلولی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تحت تأثیر غلظت هایµg/ml ۱۹/۸، ۳۹/۶، ۹۹، ۱۹۸، ۲۹۷، ۳۹۶، ۴۹۵، ۵۹۴، ۶۹۳ و ۷۹۲ از فراکسیون آبی قرار گرفتند، پس از طی زمانهای مذکور هر دو رده سلولی محیط کشت رویی با برگرداندن پلیت خالی گردید و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت FBS ۵ % حاوی ۰/۵ mg/ml محلول MTT اضافه شد. پلیت ها در فایل آلومینیومی پوشیده شدند و به مدت چهار ساعت انکوبه گردیدند. پس از طی مدت زمان انکوباسیون و خالی کردن محیط کشت به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و در نهایت جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه Eliza reader در طول موج ۵۷۰ nm قرائت شد و درصد سلولهای زنده با فرمول زیر محاسبه گردید [۲۱].

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

آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که اساس آن احیاء و شکسته شدن کریستالهای زرد رنگ تترازولیوم بوسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستالهای آبی رنگ نا محلول می باشد. در طی زمان انکوباسیون، MTT توسط سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیمهای چرخه تنفسی میتوکندریهاست احیاء می شود. احیاء و شکسته شدن این حلقه موجب تولید

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند و به صورت Mean ± SEM ارائه گردید. برای مقایسه متغیر های نرمال از آزمون واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. در صورت وجود اختلاف معنی دار برای مقایسه نتایج در بین گروه ها از Post Hoc Tukey استفاده شد.$p< ۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد.

**یافته ها**




شکل۲: تأثیر فراکسیون آبی عصاره سیاه دانه در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بردرصد زنده ماندن سلول های سالم کلیه انسان رده GP- ۲۹۳ هیچکدام از غلظتها اثر معنی داری بر درصد زنده ماندن سلولهای GP -۲۹۳ هیچکدام نداشتند.

**بحث**

در این مطالعه اثر فراکسیون آبی سیاه دانه بر درصد زنده ماندن دو رده سلولی ACHN و GP- ۲۹۳ بررسی گردید. در رده سلولی ACHN، ۲۴ ساعت پس از تأثیر فراکسیون آبی از غلظت ۲۹۷µg/ml کاهش معنی دار در درصد زنده ماندن سلولها در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد، در حالیکه در رده سلولی GP-۲۹۳ در هیچ یک از زمانها درصد زنده ماندن سلولها در مقایسه با چاهک کنترل معنی دار نبود. نتایج این مطالعه نشان دهنده تأثیر بیشتر فراکسیون آبی در رده سلولی ACHN به صورت وابسته به دوز و زمان در مقایسه با رده سلولی GP- ۲۹۳ بود. اثر ضد سرطانی سیاه دانه در مطالعات زیادی نشان داده شده است به عنوان نمونه مصرف خوراکی روغن سیاه دانه در ضایعات بدخیم روده القاء شده در موش صحرایی به طور مؤثری باعث مهار رشد و توسعه سلول های بدخیم سرطان روده شده است [۲۲]. اثر ضد سرطانی سیاه دانه بر روی رده های سلولهای سرطانی بافتهای مختلف مثل سرطان خون، کلیه، کبد، پروستات، پستان، گردن رحم و پوست نشان داده شده است [۲۳]. همچنین α-هیدرین مشتق شده از سیاه دانه نیز فعالیت ضد توموری قوی بر علیه سرطان خون و ریه داشته است [۱۳]. در مطالعه شافی[1] اثر عصاره متانولی و فراکسیون های N-هگزان و کلروفرم

1 -Shafi

سیاه دانه روی سلولهای Hela ( سلولهای سرطانی گردن رحم انسان) بررسی شد. هر سه عصاره سیاه دانه باعث آپوپتوز در سلولهای Hela می شوند ولی عصاره کلروفرم اثرات مؤثرتری نسبت به عصاره های n-هگزان و متانول داشته است [۱۶]. در مطالعه بارک و همکاران اثر کشندگی عصاره های اتیل استات و روغن اصلی روی رده سلولی P8 ۱۵ (سلول سرطان پستان)، نسبت به عصاره بوتانل بیشتر بود. همچنین در رده سلولی BSR (سلول سرطان کلیه موش) اتیل استات نسبت به روغن اصلی اثر کشندگی بیشتری داشت، در حالیکه عصاره بوتانل اثر کشندگی پایینی نشان داد. در سلولهای ICO1 (سلولهای سرطان قلب گوسفند) عصاره بوتانل نسبت به دو رده سلولی دیگر اثر کشندگی بیشتری داشت [۱۸]. در نتیجه اثر کشندگی فراکسیون های مختلف به ترکیبات آنها وابسته نیست بلکه به رده های سلولی مختلف وابسته است. در مطالعه طبسی اثر عصاره الکلی سیاهدانه بر میزان تکثیر سلولی و آپوپتوزیس سلول های سرطانی کلیه انسان رده ACHN نشان داد که عصاره موجب کاهش معنی دار تعداد سلولهای زنده رده های ACHN و۹۲۹ L می گردد. نتایج این مطالعه نیز در راستای مطالعات قبلی و نشان دهنده اثر ضد سرطانی سیاه دانه می باشد [۱۹].

سیدل[1] (۲۰۰۶) نشان داد که عصاره هیدرو الکلی گیاهان دارای سه فراکسیون اصلی می باشند که عبارتند از: ۱) فراکسیونهای محلول در آب ۲) فراکسیونهای باحالت بینابینی و ۳) فراکسیونهای محلول در چربی [۲۴-۲۵]. با توجه به متفاوت بودن مواد موثره این فراکسیونها اثرات آنها نیز بر روی رده های سلولی مختلف احتمالاً متفاوت خواهد بود [۲۴].

دراین مطالعه نیز فراکسیون آبی از عصاره هیدروالکلی تهیه شد و به نظر می رسد محتوی مواد موثر محلول درآب باشد. تا کنون پژوهشی بطور مشخص اثر عصاره آبی سیاه دانه را بر سلولهای سرطانی کلیه مورد بررسی قرار نداده است و شاید این اولین مطالعه در این زمینه باشد.

این فراکسیون باعث کاهش درصد زنده ماندن سلولهای ACHN شده است و به نظر می رسد مواد موجود در این فراکسیون نیز دارای اثر ضد توموری باشند. مکانیسم ایجاد سیتوتوکسیتی توسط این فراکسیون مشخص نیست ولی با توجه به اثر سیاه دانه بر سایر رده های سرطانی در مطالعات دیگر می توان پیشنهاد کرد که مکانیسم احتمالی القاء آپوپتوز توسط این فراکسیون آزاد شدن سیتوکروم c به داخل سیتوزول، فعال شدن کاسپازها و در نهایت فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز می باشد هرچند تعیین مکانیزم دقیق نیازمند مطالعات دیگر می باشد [۱۶].

تیموکینون وترکیبات دیگرسیاه دانه که اثر ضد سرطانی آنها نشان داده شده است ترکیبات محلول در چربی می باشند [۲۶]، در حالیکه مطالعه حاضر نشان داد که علاوه برخواص ضد سرطانی ترکیبات محلول در چربی، فراکسیون آبی سیاه دانه نیز احتمالاً دارای ترکیبات ضد سرطانی می باشد. از طرف دیگراین پژوهش اثر ناچیز فراکسیون آبی بر رده سلولی GP- ۲۹۳را نشان داد که اهمیت بررسی بیشتر فراکسیون آبی بر سرطان کلیه را دو چندان می کند. علاوه بر این می توان نتیجه گرفت که احتمالاً ماده ضد توموری سیاه دانه بطور مشخص دریک فراکسیون یا ماده مؤثره وجود ندارد و در تمام فراکسیونهای آن پراکنده می باشد. لذا این ایده که جداسازی قسمت های خاص گیاه به عنوان مواد مؤثر گیاه دارویی یکپارچگی گیاه را به هم زده و باعث کاهش اثر درمانی و افزایش عوارض جانبی آن می گردد [۲۷] را تقویت می کند.

## نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که فراکسیون آبی سیاه دانه دارای اثر سیتوتوکسیسیتی بر رده سلولی ACHN بوده در حالیکه بر رده سلولی GP- ۲۹۳ تاثیری ندارد.

## تشکر و قدر دانی

این مطالعه منتج از پایان نامه دانشجویی کارشناسی ارشد با کد طرح پژوهشی ۹۰۰۱۹۸ و تاریخ تصویب۱۳۹۰/۰۷/۰۶ بوده که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده است.

1-Seidel

**References**


1. Lindblad p, EPIDEMIOLOGY OF RENAL CELL CARCINOMA, Scandinavian Journal of Surgery 2004; 93(70): p. 88-96.
2. Steffens S, "et al", Caveolin 1 protein expression in renal cell carcinoma predicts survival, BMC urology 2011; 11(1): p. 25.
3. Kim H.L, "et al", Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. J Urol 2003; 170(5): p. 1742-6.
4. Dragsted L.O., M, Strube and J.C. Larsen, Cancer-protective factors in fruits and vegetables: biochemical and biological background, Pharmacol Toxicol 1993, 72 Suppl 1: p. 116-35.
5. Nickavar B., "et al", Chemical composition of the fixed and volatile oils of Nigella sativa L. from Iran, Zeitschrift Fur Naturforschung C 2003; 58(9/10): p. 629-631.
6. Padhye S ," et al", From here to eternity-the secret of Pharaohs: Therapeutic potential of black cumin seeds and beyond, Cancer therapy 2008; 6(b): p. 495.
7. Gilani A , Q. Jabeen and M. Khan, A review of medicinal uses and pharmacological activities of Nigella sativa. Pak, J. Biol. Sci, 2004. 7: p. 441-451[Persian].
8. Salem M.L., Immunomodulatory and therapeutic properties of the Nigella sativa L. seed. Int Immunopharmacol 2005; 5(13-14): p. 1749-70.
9. Swamy, S.M. and B.K. Tan, Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of Nigella sativa L. seeds, J Ethnopharmacol 2000, 70(1): p. 1-7.
10. Ali B.H. and G. Blunden, Pharmacological and Toxicological Propertie of Nigella sativa, Phytother Res 2003; 17(299): p. 299-305.
11. Badary O.A., "et al", The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats, Toxicology 2000; 143(3): p. 219-26.
12. Ait Mbarek L., "et al", Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2007; 40(6): p. 839-847.
13. Kumara S.S. and B.T. Huat, Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, alpha-hederin from the seeds of Nigella sativa, Planta Med 2001; 67(1): p. 29-32.
14. Iddamaldeniya S.S.," et al", Protection against diethylnitrosoamine-induced hepatocarcinogenesis by an indigenous medicine comprised of Nigella sativa, Hemidesmus indicus and Smilax glabra: a preliminary study, J Carcinog 2003. 2(1): p. 6.
15. Arafa el S.A., "et al", Thymoquinone up-regulates PTEN expression and induces apoptosis in doxorubicin-resistant human breast cancer cells, Mutat Res 2011; 706(1-2): p. 28-35.
16. Shafi G.," et al", Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of Nigella sativa, BioMed Central 2009; 9(29): p. 2867-2874.
17. Rooney S. and M.F. Ryan, Effects of alpha-hederin and thymoquinone, constituents of Nigella sativa, on human cancer cell lines, Anticancer Res 2005; 25(3B): p. 2199-204.
18. Mbarek L.A., "et al", Anti-tumor properties of blackseed (Nigella sativa L.) extracts, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2007; 40(6): p. 839-847.
19. Tabasi N.," et al", The effects of Nigella sativa ethanolic extract on proliferation and apoptosis of renal cell carcinoma ACHN cell line, Journal of Shahrekord University of Medical Sciences 2010; 12(3): p. 7-14[Persian].
20. Tayarani-Najaran Z.," et al", Growth-inhibitory effect of Scutellaria lindbergii in human cancer cell lines, Food Chem Toxicol 2010; 48(2): p. 599-604.
21. Freshney R.I., Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 5th ed. 2010: Wiley-Blackwell.
22. Al-Johar D.," et al", Role of Nigella sativa and a number of its antioxidant constituents towards azoxymethane-induced genotoxic effects and colon cancer in rats, Phytotherapy Research 2008; 22(10): p. 1311-1323.
23. Khan A., "et al", Anticancer Activities of Nigella sativa (Black Cumin), African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 2011; 8(5S).
24. Seidel V., Initial and bulk extraction, In: Sarker SD, Latif Z, Gray AI (Eds), Natural product isolation. 2ed ed. 2006, New Jersey: Humana Press. 27- 46.
25. Ghorbani A.," et al", Effects of Coriandrum sativum extracts on glucose/serum deprivation-induced neuronal cell death, Avicenna J, Phytomed 2011; 2(1): p. 4-9[Persian].
26. Alenzi F.Q., S. El-Bolkiny Yel and M.L. Salem, Protective effects of Nigella sativa oil and thymoquinone against toxicity induced by the anticancer drug cyclophosphamide, Br J Biomed Sci, 2010; 67(1): p. 20-8.
27. Mojab F., Antimalarial natural products: a review, Avicenna Journal of Phytomedicine 2012; 2(2): p. 52-62.

***Original Article***

# Effect of aqueous fraction of Nigella sativa on percentage of live cells in human renal carcinoma cell line (ACHN) and normal human renal epithelial cells (GP-293)

*ShahrakiS[1], Khajavirad A[2], Mahmoudi M[3], Tabasi N[4], Havakhah S[5], Hosinian S[5], Parhizgar S[1], Shafei MN[6*]*

[1]MSc Student of Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences ,Mashhad ,Iran
[2]Assistant Professor, Applied Physiology Research Center and department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences ,Mashhad ,Iran
[3]Professor of Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad ,Iran
[4]MSc of Physiology, Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad ,Iran
[5]Ph.D Student of Physiology, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants and department of Physiology , School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad ,Iran
[6]Assistant Professor, Cognetive Research Center and department of Physiology, School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad ,Iran

***Corresponding Author**: School of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad ,Iran
Email: shafeimn@mums.ac.ir

**Submitted:**13 Jun 2013
**Revised:**18 Feb 2012
**Accepted:**11 Mar 2013

***Abstract***

***Background and objectives:*** *Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most leading causes of death among cancers. The therapeutic methods of RCC are surgery, immunotherapy, chemotherapy and biologic response modulators. Medicinal plants such as Nigella sativa (N. sativa) also are used for the treatment of cancer. Therefore, in this study the effect of aqueous fraction of N. sativa was investigated on percentage of live cells in the human renal carcinoma cell line (ACHN) and normal human renal epithelial cells (GP-293).*

***Materials and Methods:*** *Aqueous fraction of N. sativa obtained from %70 hydro-alcoholic extract after discarded of n-Hexane, dichloromethane, ethyl acetate, N-butanol fractions. In this study two cell lines including carcinoma cell line ACHN and normal cell line GP-293 were used. Cells were seeded in 96 well plates and were treated with various concentrations of aqueous fraction and cell viability was calculated with MTT after 24, 48 and 72 hours. Results are presented as Mean ± SEM. Statistical analysis was performed by using SPSS. One-way ANOVA test was applied for the statistical analysis of the data.*

***Results:*** *our results showed aqueous fractions of N.sativa didn't significant effect on percentage of live GP-293 cells in certain dose and time but its effect on percentage of live ACHN cells is significantly higher than control group and GP-293 cell line in dose and time-dependent manner.*

***Conclusion:*** *It was concluded that the aqueous fraction of N.sativa has cytotoxic effects on ACHN cell line but didn't has any significant effect on GP-293 cell line.*

***Keywords:*** *Renal cell carcinoma, Nigella sativa, Aqueous fraction, MTT assay, ACHN cell line, GP-293 cell line.*