

Investigating the Cytotoxic and Apoptosis-Inducing Effects of *Nigella sativa* Hydroalcoholic Extract on SCC-15 Oral Squamous Cell Carcinoma Cells and Its Relationship with TP53 Gene Expression under *In-Vitro* Conditions

Deniz Kiannasab¹, Maedeh Ghorbanpour², Fatemeh Shahsavari^{3*}

¹Dentist, Private practice, Tehran, Iran

²Assistant Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

³Associate Professor, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, TeMS.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 17 June 2026, Accepted: 14 September 2026

Background: Oral squamous cell carcinoma (SCC-15) is one of the most common malignancies of the oral cavity. The present study aimed to investigate the cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Nigella sativa* hydroalcoholic extract on SCC-15 cells and normal human gingival fibroblasts and to evaluate the relationship of these effects with TP53 gene expression.

Methods and Materials: SCC-15 cells and normal human gingival fibroblasts (HuGu) were treated with different concentrations of *Nigella sativa* hydroalcoholic extract. Cell viability was assessed by MTT assay at 24, 48 and 72 hours. Apoptosis was assessed using Annexin V-FITC.PI staining and flow cytometry. Relative TP53 gene expression was measured using SYBR Green-based Real-Time PCR and ABI StepOnePlus instrument. The GAPDH gene was used as a reference gene and data analysis was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. All experiments were performed in triplicate. Statistical analysis was performed using independent t-test and two-way analysis of variance, and a significance level of less than 0.05 was considered.

Results: *Nigella sativa* hydroalcoholic extract significantly reduced the viability of SCC-15 cells in a dose- and time-dependent manner, while it showed more limited effects on HuGu cells. Flow cytometry results showed an increase in the population of apoptotic cells after treatment. Also, a significant increase in the expression of TP53 mRNA was observed in treated SCC-15 cells. The increase was accompanied by an increase in the rate of apoptosis.

Conclusion: Under *In vitro* conditions, *Nigella sativa* hydroalcoholic extract had cytotoxic and apoptosis-inducing effects on SCC-15 cells, while showing fewer effects on normal cells. These effects were associated with increased TP53 gene expression. However, further mechanistic studies and animal models are needed to determine the biological significance and potential application of these findings.

Keywords: *Nigella Sativa*, Oral squamous cell carcinoma, SCC-15, Apoptosis, TP53 Gene

***Corresponding Author:** f.shahsavari@iau.ac.ir

➤ **Please cite this paper as:** Kiannasab D, Shahsavari F, Ghorbanpour M. Investigating the cytotoxic and apoptosis-inducing effects of *Nigella sativa* hydroalcoholic extract on SCC-15 oral squamous cell carcinoma cells and its relationship with TP53 gene expression under *in-vitro* conditions. *J Mashhad Dent Sch* 2026; 50(3):222-236.

➤ **DOI:** [10.22038/jmds.2026.28380](https://doi.org/10.22038/jmds.2026.28380)



بررسی اثرات سیتوتوکسیک و القاکننده آپوپتوز عصاره هیدروالکلی سیاهدانه (*Nigella sativa*) بر کارسینوم سلول سنگفرشی دهان SCC-۱۵ و ارتباط آن با بیان ژن TP53 در شرایط آزمایشگاهی

دنیز کیان‌نسب^۱، مائده قربان‌پور^۲، فاطمه شاهسواری^{۳*}

^۱دندانپزشک عمومی، تهران، ایران
^۲استادیار، گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳دانشیار، گروه پاتولوژی دهان، فک و صورت، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ ارائه مقاله: ۱۴۰۵/۰۳/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۶/۲۳

چکیده

مقدمه: کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (SCC-15) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های حفره دهان است. مطالعه حاضر، با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک و القاکننده آپوپتوز عصاره هیدروالکلی سیاهدانه (*sativa Nigella*) بر سلول‌های SCC-۱۵ و فیبروبلاست‌های طبیعی لته انسان و همچنین ارزیابی ارتباط این اثرات با بیان ژن TP53 انجام شد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های SCC-۱۵ و فیبروبلاست‌های طبیعی لته انسان (HuGu) با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی سیاهدانه تیمار شدند. زنده‌مانی سلولی با آزمون MTT در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت ارزیابی شد. آپوپتوز با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC.PI و فلوسایتومتری بررسی گردید. بیان نسبی ژن TP53 با استفاده از Real-Time PCR مبتنی بر SYBR Green و دستگاه ABI StepOnePlus اندازه‌گیری شد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع مورد استفاده قرار گرفت و تحلیل داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون t مستقل و آنالیز واریانس دوطرفه انجام شد و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی سیاهدانه موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های SCC-۱۵ به صورت وابسته به دوز و زمان شد، در حالی که اثرات محدودتری بر سلول‌های HuGu نشان داد. نتایج فلوسایتومتری افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک را پس از تیمار نشان داد. همچنین افزایش معنی‌دار بیان mRNA ژن TP53 در سلول‌های SCC-۱۵ تیمار شده مشاهده شد که با افزایش میزان آپوپتوز همراه بود.

نتیجه‌گیری: در شرایط آزمایشگاهی، عصاره هیدروالکلی سیاهدانه دارای اثرات سیتوتوکسیک و القاکننده آپوپتوز بر سلول‌های SCC-۱۵ بود و در عین حال اثرات کمتری بر سلول‌های طبیعی نشان داد. این اثرات با افزایش بیان ژن TP53 همراه بودند. با این حال، برای تعیین اهمیت زیستی و کاربرد بالقوه این یافته‌ها، انجام مطالعات مکانیسمی بیشتر و بررسی در مدل‌های حیوانی ضروری است.

کلمات کلیدی: سیاهدانه، کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، SCC-۱۵، آپوپتوز، ژن TP53

مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد / سال ۱۴۰۵ / دوره ۵۰ / شماره ۳: ۲۲۶-۲۲۲

* مؤلف مسئول، نشانی: علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مقدمه

کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (Oral Squamous Cell Carcinoma, OSCC) شایع‌ترین بدخیمی حفره دهان بوده و حدود ۹۰ درصد از کل سرطان‌های دهانی را تشکیل می‌دهد.^(۱) این بیماری یکی از مهم‌ترین معضلات سلامت عمومی در سراسر جهان محسوب می‌شود و سالانه صدها هزار مورد جدید در جهان گزارش می‌گردد.^(۲) علی‌رغم پیشرفت‌های حاصل شده در روش‌های تشخیصی و درمانی، میزان بقای پنج‌ساله بیماران مبتلا به SCC-15 همچنان در حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد باقی مانده است و پیش‌آگهی نامطلوب آن عمدتاً ناشی از تشخیص دیر هنگام، تهاجم موضعی، متاستاز و عود بیماری است.^(۳، ۴)

رده سلولی SCC-15 یک رده سلولی انسانی مشتق‌شده از کارسینوم سلول سنگفرشی زبان بوده و به‌طور گسترده به عنوان مدل آزمایشگاهی سرطان سلول سنگفرشی دهان مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رده سلولی به دلیل حفظ بسیاری از ویژگی‌های مولکولی و زیستی تومور اولیه، از جمله ظرفیت تکثیر، پاسخ به عوامل ضدسرطان و تغییرات مسیرهای تنظیم‌کننده آپوپتوز، مدل مناسبی برای ارزیابی فعالیت ضدتوموری ترکیبات طبیعی و دارویی در شرایط آزمایشگاهی محسوب می‌شود. عوامل متعددی در بروز و پیشرفت SCC-15 نقش دارند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به مصرف دخانیات، الکل، عفونت با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV)، عوامل محیطی، التهاب مزمن و استعداد های ژنتیکی اشاره کرد.^(۵، ۶) این عوامل از طریق ایجاد آسیب DNA، اختلال در مسیرهای تنظیم‌کننده چرخه سلولی و تغییر در بیان ژن‌های مرتبط با بقا و مرگ سلولی، در فرایند سرطان‌زایی دخالت می‌کنند.^(۷)

یکی از ویژگی‌های اساسی سلول‌های سرطانی، توانایی فرار از آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است. آپوپتوز نقش مهمی در حفظ هموستاز بافتی و حذف سلول‌های آسیب‌دیده یا دارای جهش ایفا می‌کند.^(۸) اختلال در مسیرهای آپوپتوز موجب بقای سلول‌های غیرطبیعی، افزایش تکثیر سلولی و پیشرفت تومور می‌شود.^(۹) از این رو، القای آپوپتوز به عنوان یکی از اهداف اصلی درمان‌های ضدسرطان شناخته می‌شود و بسیاری از داروهای ضدسرطان از طریق فعال‌سازی این مسیر اثر خود را اعمال می‌کنند.^(۱۰)

در میان عوامل مولکولی دخیل در سرطان دهان، ژن TP53 از مهم‌ترین ژن‌های سرکوبگر تومور محسوب می‌شود. پروتئین p53 که به عنوان «نگهبان ژنوم» شناخته می‌شود، در پاسخ به آسیب DNA، استرس اکسیداتیو و سایر تنش‌های سلولی فعال شده و از طریق توقف چرخه سلولی، ترمیم DNA، پیری سلولی و القای آپوپتوز از تکثیر سلول‌های آسیب‌دیده جلوگیری می‌کند.^(۱۱، ۱۲) جهش یا غیرفعال شدن TP53 یکی از شایع‌ترین تغییرات ژنتیکی در SCC-15 بوده و در بیش از نیمی از موارد گزارش شده است.^(۱۳) اختلال در عملکرد p53 با افزایش تهاجم تومور، مقاومت به درمان و پیش‌آگهی ضعیف‌تر همراه است.^(۱۴)

در سال‌های اخیر، استفاده از ترکیبات طبیعی و فرآورده‌های گیاهی به عنوان منابع بالقوه داروهای ضدسرطان مورد توجه گسترده قرار گرفته است. گیاه سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) از خانواده Ranunculaceae یکی از گیاهان دارویی شناخته‌شده در طب سنتی خاورمیانه، آسیا و آفریقا است که به دلیل خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و ضدتوموری مورد مطالعه قرار گرفته است.^(۱۵، ۱۶) ترکیبات زیست‌فعال متعددی از جمله تیموکینون (Thymoquinone)،

حاضر با هدف بررسی اثرات سیتوتوکسیک و القاکننده آپوپتوز عصاره هیدروالکلی *Nigella sativa* بر سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان SCC-15 و فیبروبلاست‌های طبیعی لته انسان و همچنین ارزیابی ارتباط این اثرات با تغییرات بیان ژن TP53 در شرایط آزمایشگاهی طراحی و اجرا شد. نتایج این پژوهش می‌تواند در درک بهتر مکانیسم‌های ضدسرطانی سیاه‌دانه و ارزیابی ظرفیت بالقوه آن به عنوان یک عامل کمکی در درمان سرطان دهان مؤثر باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه گیاه و استخراج عصاره هیدروالکلی
بذرهای سیاه‌دانه (*Nigella sativa*) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران (IBRC) تهیه شدند. هویت گونه گیاهی بر اساس اطلاعات ثبت شده و مشخصات ارائه شده توسط این مرکز تایید گردید. مقدار ۵۰ گرم از بذرها خشک پس از آسیاب شدن، در اتانول ۸۰ درصد سوسپانسیون شده و به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر آزمایشگاهی در دمای اتاق قرار گرفت. (۲۸-۳۰) پس از پایان فرایند استخراج، مخلوط حاصل از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ عبور داده شد. حلال با استفاده از دستگاه روتاری اواپراتور RV 10 (rotary evaporator (IKA, Staufen, Germany) تحت فشار کاهش‌یافته حذف گردید. سپس عصاره با استفاده از آون U6۳۲۰ (فاطر الکتریک، ایران) خشک و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بازده استخراج عصاره خشک هیدروالکلی سیاه‌دانه بر اساس وزن اولیه نمونه، ۱۲٪ محاسبه شد. برای آزمایش‌های سلولی، عصاره در DMSO حل شد و غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. غلظت نهایی DMSO در تمامی گروه‌ها کمتر از ۰/۱ درصد حفظ شد.

تیموهِیدروکینون، تیمول، آلکالوئیدها و فلاونوئیدها در این گیاه شناسایی شده‌اند که در ایجاد اثرات فارماکولوژیک آن نقش دارند. (۱۷)

تیموکینون، مهم‌ترین ترکیب فعال سیاه‌دانه، در مطالعات متعدد آزمایشگاهی و حیوانی اثرات ضدسرطانی قابل توجهی نشان داده است. گزارش شده است که این ترکیب می‌تواند از طریق مهار تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز بر رشد تومور اثر بگذارد. (۱۸-۲۰) مطالعات نشان داده‌اند که تیموکینون می‌تواند با هدف قرار دادن مسیر PI3K/AKT، موجب مهار ترجمه cyclin D1، توقف چرخه سلولی در مرحله G1 و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی شود. (۲۱) همچنین شواهد نشان می‌دهد که تیموکینون قادر است مسیرهای مولکولی متعددی از جمله NF-κB، MAPK، PI3K/AKT و p53 را تنظیم کند. (۲۱،۲۲) برخی مطالعات افزایش بیان p53 و فعال‌سازی کاسپازها را در سلول‌های سرطانی تیمار شده با تیموکینون گزارش کرده‌اند که نشان‌دهنده نقش احتمالی این ترکیب در القای آپوپتوز وابسته به p53 است. (۲۳-۲۵)

با وجود شواهد روبه رشد درباره اثرات ضدسرطانی *Nigella sativa* و تیموکینون در انواع مختلف سرطان‌ها از جمله سرطان پستان، کولون، پروستات و ریه، مطالعات انجام شده بر روی کارسینوم سلول سنگفرشی دهان همچنان محدود است و نتایج موجود نیز به دلیل تفاوت در نوع عصاره، غلظت مورد استفاده، مدت زمان تیمار و مدل‌های سلولی مورد بررسی، یکسان نیستند. (۲۶-۲۸) افزون بر این، اطلاعات اندکی درباره تأثیر عصاره هیدروالکلی سیاه‌دانه بر بیان ژن p53 در سلول‌های SCC-15 و میزان انتخاب‌پذیری آن در برابر سلول‌های طبیعی دهانی وجود دارد. بنابراین، با توجه به اهمیت یافتن عوامل درمانی جدید با سمیت کمتر و کارایی بیشتر علیه سرطان دهان، مطالعه

کشت سلولی

سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان ۱۵-SCC (IBRC 10870) و فیروپلاست طبیعی لته انسان HuGu (IBRC 10459) از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد محلول پنی‌سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت اشباع و ۵ درصد CO₂ نگهداری شدند.^(۳۱) گروه کنترل منفی شامل سلول‌های تیمار شده با همان غلظت DMSO و بدون عصاره بود. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ µg.ml از گیاه تهیه گردیدند.

آزمون MTT

برای ارزیابی زنده‌مانی سلولی از آزمون MTT استفاده شد. آزمون MTT بر اساس توانایی سلول‌های زنده در احیای نمک ترازولیوم MTT به کریستال‌های فورمازان توسط آنزیم‌های میتوکندریایی انجام می‌شود. میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی بوده است. سلول‌های ۱۵-SCC و HuGu با تراکم ۵×۱۰^۳ سلول در هر چاهک در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره سیاهدانه به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محلول MTT به هر چاهک افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. کریستال‌های فورمازان تشکیل شده با DMSO حل شدند و جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELx800TS microplate reader (BioTek, USA) اندازه‌گیری شد. میزان محاسبه شده شاخصی از درصد زنده‌مانی سلولی محسوب می‌شود. بنابراین، کاهش جذب نوری پس از تیمار نشان‌دهنده کاهش فعالیت متابولیکی و کاهش زنده‌مانی سلول‌ها است. غلظت نهایی DMSO در تمامی تیمارها کمتر

از ۱/۰٪ بود و گروه کنترل حلال (Vehicle Control) نیز در تمامی آزمایش‌ها در نظر گرفته شد. درصد زنده‌مانی سلولی نسبت به گروه کنترل محاسبه گردید. مقادیر IC₅₀ با استفاده از پردازش منحنی دوز-پاسخ غیرخطی (nonlinear regression) با مدل log(inhibitor) versus normalized response به همراه بازه اطمینان ۹۵٪ و با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ محاسبه شد.^(۳۲،۳۳)

بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری

برای ارزیابی آپوپتوز از کیت Annexin V Apoptosis Detection Kit (FITC) استفاده شد. پس از تیمار، سلول‌ها (تعداد ۱۰^۵) جمع‌آوری و با PBS شستشو داده شدند. سپس با رنگ‌های Annexin V-FITC و Propidium Iodide رنگ‌آمیزی شدند. حداقل ۱۰۰۰۰ رویداد برای هر نمونه توسط دستگاه فلوسایتومتر BriCyte E6 (Mindray Bio-Medical Electronics Co., Ltd., Shenzhen, China) ثبت و تحلیل شد.^(۳۴) درصد سلول‌های زنده، آپوپتوتیک اولیه، آپوپتوتیک دیررس و نکروتیک تعیین گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA با استفاده از RNA Extraction Kit (Sinaclon Co., Tehran, Iran) استخراج شد. غلظت و خلوص RNA با دستگاه NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) اندازه‌گیری گردید.^(۳۵) سپس سنتز cDNA با استفاده از Cdna Synthesis Kit (Sinaclon Co., Tehran, Iran) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

بررسی بیان ژن TP53 با Real-Time PCR

بیان ژن TP53 با استفاده از روش Real-Time PCR مبتنی بر SYBR Green ارزیابی شد. ژن GAPDH به عنوان ژن مرجع (Housekeeping Gene) انتخاب گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده ارائه شده است (جدول ۱).

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژنهای مورد بررسی

ردیف	نام پرایمر	توالی (۳' تا ۵')	طول	OD	تغییرات در انتهای ۵'	تغییرات در انتهای ۳'
۳	P53-F	CGCTTCGAGATGTTCCGAGA	۲۲	۲	خیر	خیر
۴	P53-R	CTTCAGGTGGCTGGAGTGAG	۲۴	۲	خیر	خیر
۹	HUMAN-GAPDH-F	GTCTCCYCTGACTTG AACAGCG	۲۰	۲	خیر	خیر
۱۰	HUMAN-GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTG TAGCCAA	۲۰	۲	خیر	خیر

گروه‌ها از آزمون t مستقل استفاده شد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر عصاره هیدروالکلی سیاهدانه بر زنده‌مانی سلولی نتایج آزمون MTT نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های SCC-۱۵ به صورت وابسته به دوز و زمان شد. همان‌گونه که در جدول ۲ نشان داده شده است، با افزایش غلظت عصاره، درصد بقای سلول‌های SCC-۱۵ در تمامی زمان‌های مورد بررسی کاهش یافت. (شکل ۱)

پس از ۷۲ ساعت تیمار، زنده‌مانی سلول‌های SCC-۱۵ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۱۱/۴ درصد کاهش یافت. در مقابل، زنده‌مانی سلول‌های HuGu در همان غلظت بیش از ۶۲ درصد باقی ماند که بیانگر حساسیت بیشتر سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی بود. (شکل ۲) در زمان ۷۲ ساعت، اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی سیاهدانه به حداکثر میزان خود رسید. در این زمان، زنده‌مانی سلول‌های SCC-۱۵ در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به حدود ۱۱ درصد کاهش یافت، در حالی که بیش از ۶۰ درصد سلول‌های HUGU همچنان زنده باقی ماندند.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر RealQ Plus 2× Master Mix Green (Yekta Tajhiz Azma, Iran)، یک میکرولیتر از هر پرایمر، دو میکرولیتر cDNA و آب بدون نوکلئاز انجام شد. واکنش‌ها در دستگاه CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) انجام گرفت.

برنامه حرارتی شامل دناتوره شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. میزان بیان نسبی ژن با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید. (۳۶،۳۷)

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل زیستی انجام شدند و هر نمونه در هر آزمایش به صورت تریپلیکیت فنی اندازه‌گیری شدند (n=۳). داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین گزارش شدند. داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون‌های MTT، Real-Time PCR و فلوئوسایتمتری به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین (Mean $\pm$ SD) گزارش شدند. برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها از آزمون Shapiro-Wilk استفاده شد. مقایسه بین گروه‌ها با توجه به نوع داده‌ها با آزمون‌های آماری مناسب انجام شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistics نسخه ۲۹ انجام شد. برای مقایسه

جدول ۲. مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی سلولی در رده‌های HUGU و SCC-15

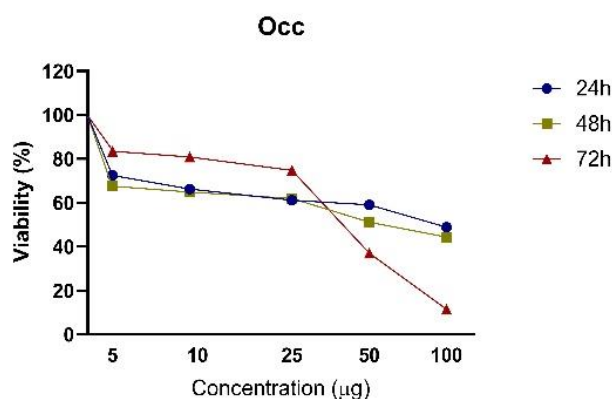
غلظت	زنده مانی SCC-15 (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	زنده مانی HUGU (انحراف معیار $\pm$ میانگین)	P/value
کنترل	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۶۶	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۶۶	۱
۵	۷۲/۳۹۰ $\pm$ ۰/۶۶	۷۷/۴۲۸۸ $\pm$ ۰/۲۲	۰/۰۰۰۵۰*
۱۰	۶۶/۱۹۹۷ $\pm$ ۰/۳۳	۶۷/۳۵۲۰ $\pm$ ۰/۵۸	۰/۰۷۲۰۹
۲۵	۶۱/۱۳۸۷ $\pm$ ۰/۴۰	۶۳/۶۰۱۴ $\pm$ ۰/۲۳	۰/۰۰۱۶۶*
۵۰	۵۹/۰۸۲۷ $\pm$ ۰/۶۱	۶۱/۹۰۶۹ $\pm$ ۰/۲۱	۰/۰۰۳۴۳*
۱۰۰	۴۸/۸۰۲۵ $\pm$ ۰/۸۱	۵۷/۷۷۲۳ $\pm$ ۰/۱۲	۰/۰۰۰۰۹۹*
کنترل	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۴۷	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۷۳	۱
۵	۶۷/۵۵۰ $\pm$ ۰/۱۴	۹۴/۲۹۵۹ $\pm$ ۰/۸۹	<۰/۰۰۰۱*
۱۰	۶۴/۸۴۴۰ $\pm$ ۰/۳۷	۹۱/۰۸۷۳ $\pm$ ۰/۵۹	<۰/۰۰۰۱*
۲۵	۶۱/۹۴۴۲ $\pm$ ۰/۶۱	۷۰/۹۴۴۷ $\pm$ ۰/۳۷	<۰/۰۰۰۱*
۵۰	۵۱/۱۱۸۵ $\pm$ ۰/۰۷	۶۷/۴۹۸۵ $\pm$ ۰/۵۸	<۰/۰۰۰۱*
۱۰۰	۴۴/۳۲۴۸ $\pm$ ۰/۶۱	۶۳/۰۴۲۲ $\pm$ ۰/۹۱	<۰/۰۰۰۱*
کنترل	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۸۲	۱۰۰/۰۰۰۰ $\pm$ ۰/۰۹	۱
۵	۸۳/۴۶۱۵ $\pm$ ۰/۲۲	۸۸/۲۱۷۳ $\pm$ ۱/۵۲	۰/۰۰۰۱۶*
۱۰	۸۰/۸۷۴۱ $\pm$ ۰/۵۰	۸۲/۲۹۵۵ $\pm$ ۰/۸۲	۰/۱۰۵۵
۲۵	۷۱/۷۳۳۸ $\pm$ ۰/۶۹	۷۴/۶۸۵۳ $\pm$ ۰/۶۹	۰/۰۱۲۸*
۵۰	۳۷/۲۲۸۰ $\pm$ ۰/۷۷	۶۷/۳۹۹۳ $\pm$ ۰/۴۶	<۰/۰۰۰۱*
۱۰۰	۱۱/۳۹۸۶ $\pm$ ۰/۶۵	۶۲/۷۵۹۵ $\pm$ ۰/۶۵	<۰/۰۰۰۱*

۲۴ h

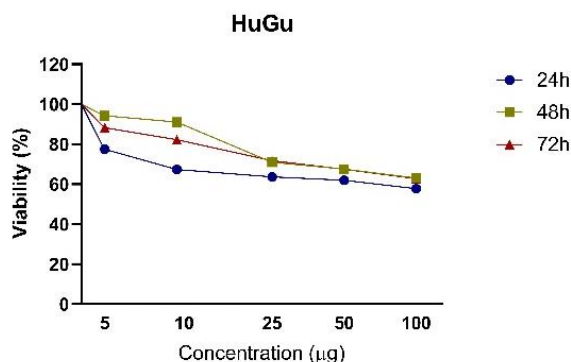
۴۸ h

۷۲ h

* سطح معناداری آماری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد



شکل ۱. اثر عصاره هیدروالکلی سیاهدانه بر درصد زنده مانی سلول های SCC-15 در غلظت های مختلف و زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت



شکل ۲. اثر عصاره هیدروالکلی سیاهدانه بر درصد زنده مانی سلول های HUGU در غلظت های مختلف و زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

در مقابل، در سلول های HuGu کاهش بیان ژن TP53 مشاهده شد و میزان Fold Change برابر با ۲۱ گزارش گردید ($P=0/003$). مقایسه نتایج بین دو رده سلولی تفاوت معنی داری در الگوی بیان ژن TP53 پس از تیمار با عصاره سیاهدانه نشان داد (جدول ۴ و ۵).

بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری

نتایج فلوسایتومتری نشان داد که تیمار با عصاره سیاه دانه موجب افزایش هر دو جمعیت آپوپتوز اولیه (Early Apoptosis) و آپوپتوز دیررس (Late Apoptosis) در سلول های SCC-۱۵ شد، در حالی که تغییرات در سلول های HuGu محدود تر بود (جدول ۵) و تیمار سلول های SCC-۱۵ با عصاره سیاهدانه موجب افزایش جمعیت سلول های آپوپتوتیک شد. درصد آپوپتوز اولیه از ۲/۵۴ درصد در گروه کنترل به ۴/۵۴ درصد در گروه تیمار افزایش یافت ($P=0/027$). همچنین درصد آپوپتوز دیررس از ۴/۰۶ درصد به ۷/۲۰ درصد رسید ($P=0/089$).

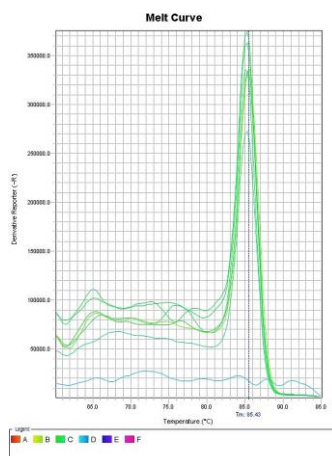
درصد سلول های زنده از ۹۳/۱ درصد در گروه کنترل به ۸۷/۹ درصد در گروه تیمار کاهش یافت، در حالی که درصد سلول های نکروتیک در هر دو گروه کمتر از یک درصد باقی ماند. در سلول های HuGu تغییرات محدودی در جمعیت سلول های آپوپتوتیک مشاهده شد (جدول ۵ و شکل ۴).

همچنین کاهش مقدار IC_{50} از ۱۱۰/۹ میکروگرم بر میلی لیتر در ۲۴ ساعت به ۳۶/۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر در ۷۲ ساعت نشان دهنده وابستگی اثر عصاره به زمان است. افزایش شاخص انتخاب پذیری ($SI=7/23$) در ۷۲ ساعت نیز بیانگر آن است که با افزایش مدت تیمار، عصاره به طور انتخابی اثر مهاری بیشتری بر سلول های سرطانی نسبت به سلول های طبیعی اعمال کرده است.

مقادیر IC_{50} برای سلول های SCC-۱۵ در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب ۱۱۰/۹، ۶۲/۴۹ و ۳۶/۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. در سلول های HuGu این مقادیر به ترتیب ۲۹۰/۱، ۱۸۰/۳ و ۲۶۳/۳ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. شاخص انتخاب پذیری (SI) در طول زمان افزایش یافت و در ۷۲ ساعت به ۷/۲۳ رسید (جدول ۳). در پایان، آنالیز منحنی ذوب (Melting Curve Analysis) جهت تأیید اختصاصیت محصولات تکثیر انجام شد (شکل ۳).

تأثیر عصاره سیاهدانه بر بیان ژن TP53

نتایج Real-Time PCR نشان داد که تیمار سلول های SCC-۱۵ با غلظت IC_{50} عصاره سیاهدانه به مدت ۷۲ ساعت موجب افزایش معنی دار بیان ژن TP53 شد. میزان بیان نسبی این ژن در سلول های SCC-۱۵ تیمار شده ۲۴/۸ برابر بیشتر از گروه کنترل بود ($P=0/01$).



شکل ۳. نمودار بیان ژن TP53 (Melting curve)

جدول ۳. مقادیر IC50 در رده‌های سلولی SCC-15 و HUGU

زمان (h)	HUGU IC50 (μg/mL)	SCC-15 IC50 (μg/mL)	Selectivity Index (SI)
۲۴	۲۹۰/۱	۱۱۰/۹	۲/۶۱۵۸
۴۸	۱۸۰/۳	۶۲/۴۹	۲/۸۸۵۲
۷۲	۲۶۳/۳	۳۶/۴۲	۷/۲۲۹۵

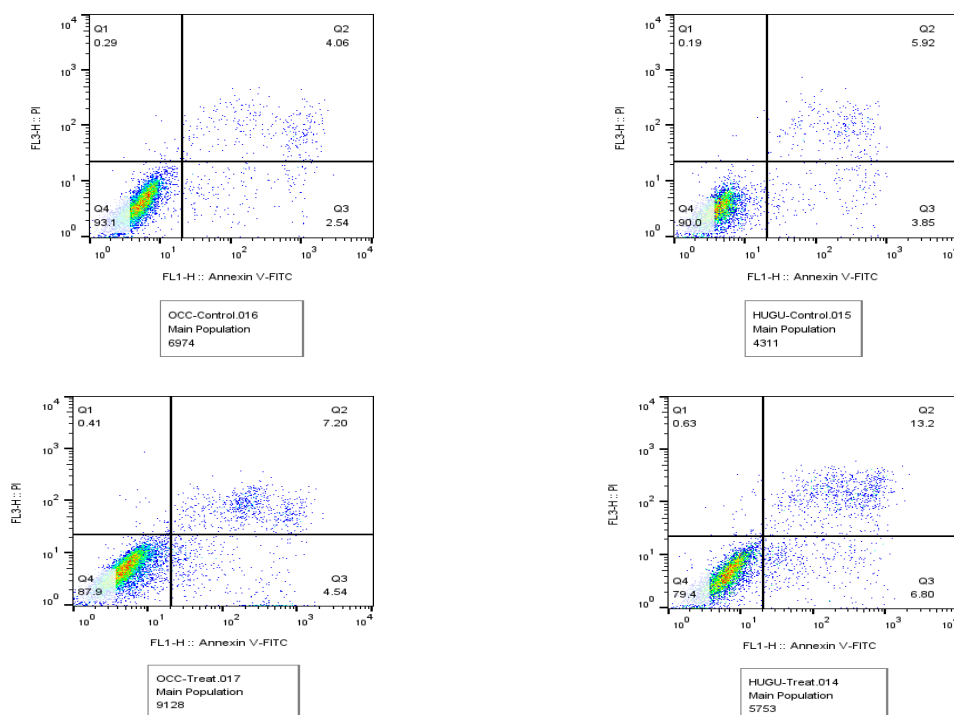
جدول ۴. مقایسه بیان ژن TP53 نسبت به GAPDH بر اساس $\Delta\Delta Ct$ و Fold Change

متغیر	تیمار SCC-15	کنترل SCC-15	تیمار HUGU	کنترل HUGU
Target Ct (Mean $\pm$ SD)	۲۵/۲۱ $\pm$ ۰/۱۵	۳۰/۹۲ $\pm$ ۰/۴۶	۲۶/۴۰ $\pm$ ۰/۲۷	۲۶/۸۴ $\pm$ ۰/۰۷
GAPDH Ct (Mean $\pm$ SD)	۲۱/۳۷ $\pm$ ۰/۱۰	۲۲/۶۹ $\pm$ ۰/۱۳	۲۰/۸۳ $\pm$ ۰/۷۰	۲۴/۱۲ $\pm$ ۰/۲۰
Mean $\Delta Ct \pm SD$	۳/۸۴ $\pm$ ۰/۲۰۴	۸/۲۳ $\pm$ ۰/۳۳۰	۵/۵۷ $\pm$ ۰/۶۸۰	۲/۷۲ $\pm$ ۰/۲۷۰
Mean $\Delta\Delta Ct \pm SD$	-۴/۳۹ $\pm$ ۰/۲۵۳		۲/۸۵ $\pm$ ۰/۱۶۲	
Fold Change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	۲۰/۹۵	۱	۰/۱۴۰	۱
P value	۰/۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۱۱	۰/۰۱۲۱	۰/۰۱۲۱

جدول ۵. نتایج فلوسایتومتری و ارزیابی آپوپتوز در رده‌های سلولی SCC-15 و HUGU

سل لاین	SCC-15	HUGU
وضعیت سلولی	تیمار (%)	کنترل (%)
$\pm SD$ زنده	۸۷/۹ $\pm$ ۰/۴۴	۹۳/۱ $\pm$ ۰/۵۱
$\pm SD$ نکروز	۰/۴۱ $\pm$ ۰/۰۳	۰/۲۹ $\pm$ ۰/۰۳
$\pm SD$ آپوپتوز اولیه	۴/۵۴ $\pm$ ۰/۰۸	۲/۵۴ $\pm$ ۰/۰۶
$\pm SD$ آپوپتوز دیررس	۷/۲۰ $\pm$ ۰/۱۸	۴/۰۶ $\pm$ ۰/۱۴
p-value	۰/۰۰۸۹	۰/۰۰۲۴
p-value	۰/۰۱	۰/۰۲۹۱
p-value	۰/۰۰۰۱۱	۰/۰۰۰۱۱

* مقایسه آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون t مستقل انجام شد



شکل ۴. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های SCC-15 و HUGU در گروه‌های کنترل و تیمار
Q1: نکروز، Q2: سلول‌های آپوپتوز دیررس، Q3: سلول‌های آپوپتوز اولیه، Q4: سلول‌های زنده

مشاهده‌شده در فیروپلاست‌های طبیعی لته انسان (HuGu) محدودتر بود. این یافته‌ها بیانگر حساسیت بیشتر سلول‌های سرطانی نسبت به تیمار با عصاره سیاهدانه در شرایط آزمایشگاهی است.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه موجب کاهش وابسته به غلظت و زمان در زنده‌مانی سلول‌های SCC-15 شد، در حالی که اثر آن بر سلول‌های طبیعی HuGu88 محدودتر بود. این یافته می‌تواند نشان‌دهنده حساسیت نسبی بیشتر سلول‌های بدخیم به ترکیبات زیست‌فعال سیاهدانه باشد. همچنین، مقادیر بالاتر IC50 در سلول‌های HuGu و افزایش شاخص انتخاب‌پذیری در طول زمان حاکی از تفاوت پاسخ میان سلول‌های سرطانی و طبیعی بود. چنین تفاوتی از دیدگاه پژوهشی حائز

به طور کلی، عصاره هیدروالکلی سیاهدانه موجب کاهش وابسته به دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌های SCC-15 شد. این اثر با افزایش بیان ژن TP53 و افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک همراه بود، در حالی که اثرات مشاهده‌شده در سلول‌های طبیعی HuGu محدودتر بود.

بحث

در مطالعه حاضر، اثرات عصاره هیدروالکلی بذر سیاهدانه بر سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (SCC-15) بررسی شد و تأثیر آن بر زنده‌مانی سلولی، آپوپتوز و بیان ژن TP53 مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که عصاره سیاهدانه موجب کاهش وابسته به دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌های SCC-15 شد، در حالی که اثرات

اهمیت است، زیرا نشان می‌دهد ترکیبات موجود در سیاهدانه ممکن است بر سلول‌های بدخیم اثر بیشتری نسبت به سلول‌های طبیعی داشته باشند.^(۱۸،۱۹) در همین راستا، مطالعات جدید نشان داده‌اند که ترکیبات فعال موجود در *Nigella sativa* به‌ویژه تیموکینون، قادر به مهار تکثیر و کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی از طریق القای آپوپتوز و تعدیل مسیرهای مرتبط با بقا هستند. همچنین، در یک مطالعه، تیموکینون در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان موجب کاهش وابسته به دوز زنده‌مانی سلولی و افزایش مرگ آپوپتوتیک شد.^(۲۰،۲۱) این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر در خصوص اثر مهار عصاره سیاهدانه بر سلول‌های SCC-۱۵ همخوانی دارد.

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه موجب کاهش وابسته به غلظت و زمان در زنده‌مانی سلول‌های SCC-۱۵ شد، در حالی که اثر آن بر سلول‌های طبیعی HuGu به مراتب کمتر بود. این نتایج نشان‌دهنده انتخاب‌پذیری نسبی عصاره در برابر سلول‌های سرطانی است. مطالعات اخیر نیز نشان داده‌اند که تیموکینون، به عنوان مهم‌ترین ترکیب فعال سیاهدانه، با مهار تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز، موجب کاهش رشد سلول‌های سرطان سلول سنگفرشی سر و گردن می‌شود. علاوه بر این، گزارش شده است که تیموکینون با افزایش بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپوپتوز نظیر Bax، p53 و کاسپازها و کاهش بیان پروتئین‌های ضدآپوپتوز مانند Bcl-2، اثرات ضدسرطانی خود را اعمال می‌کند که با یافته‌های مطالعه حاضر همخوانی دارد.^(۴۲، ۴۳)

مطالعات پیشین نشان داده‌اند که ترکیبات زیست‌فعال موجود در سیاهدانه، به‌ویژه تیموکینون، دارای اثرات ضدتکثیری و القاکننده آپوپتوز در انواع مختلف سلول‌های

سرطانی هستند. تیموکینون با اثرگذاری بر چندین مسیر پیام‌رسانی سلولی مرتبط با تکثیر، بقا و مرگ سلولی، می‌تواند رشد و پیشرفت سلول‌های سرطانی را مهار کند.^(۳۸-۴۰) مطالعات اخیر نشان می‌دهند که اثرات ضدسرطانی تیموکینون محدود به مهار تکثیر سلولی نبوده و مجموعه‌ای از مسیرهای مولکولی مرتبط با آپوپتوز، استرس اکسیداتیو و بقای سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد.^(۴۱) در یک مرور نظام‌مند در زمینه سرطان‌های سلول سنگفرشی سر و گردن، افزایش فعالیت مسیرهای پیش‌برنده آپوپتوز شامل Bax، p53 و کاسپازها و همچنین کاهش فعالیت مسیرهای ضدآپوپتوزی مانند Bcl-2 و MDM2 به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم اثر تیموکینون مطرح شده است.^(۴۱،۴۲) علاوه بر این، شواهد جدید در سلول‌های سرطان دهان نشان داده‌اند که تیموکینون می‌تواند از طریق افزایش استرس اکسیداتیو و تعدیل بیان پروتئین‌های مرتبط با بقا و آپوپتوز سلولی، اثر ضدتکثیری و پروآپوپتوتیک ایجاد کند.^(۳۸،۴۲) بنابراین، نتایج مطالعه حاضر را می‌توان در چارچوب مجموعه‌ای از اثرات مولکولی تیموکینون و سایر ترکیبات زیست‌فعال موجود در سیاهدانه تفسیر کرد.^(۲۲،۲۳)

نتایج Real-Time PCR افزایش معنی‌دار بیان ژن TP53 را در سلول‌های SCC-۱۵ تیمار شده نشان داد. نتایج Real-Time PCR مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار بیان mRNA ژن TP53 در سلول‌های SCC-۱۵ پس از تیمار با عصاره سیاهدانه بود. از آنجا که p53 یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم پاسخ سلولی به آسیب DNA، توقف چرخه سلولی و آپوپتوز است، افزایش بیان TP53 می‌تواند با فعال شدن پاسخ‌های ضدتکثیری و پروآپوپتوتیک در سلول‌های تیمار شده ارتباط داشته باشد. شواهد حاصل از مطالعات جدید در سرطان‌های سلول سنگفرشی سر و گردن

محدودتر بود. این یافته مؤید اثر انتخابی عصاره بر سلول‌های بدخیم است و با مطالعات اخیر که افزایش آپوپتوز و کاهش بقای سلول‌های سرطان دهان را پس از مواجهه با تیموکینون گزارش کرده‌اند، همخوانی دارد.^(۴۲،۴۴) با وجود نتایج امیدوارکننده، مطالعه حاضر دارای محدودیت‌هایی است. نخست، آزمایش‌ها در شرایط *in vitro* و بر روی یک رده سلولی سرطان دهان، یعنی SCC-۱۵، انجام شد و بنابراین تعمیم نتایج به سایر انواع سرطان دهان یا شرایط *in vivo* باید با احتیاط صورت گیرد. دوم، اگرچه افزایش بیان TP53 و افزایش آپوپتوز مشاهده شد، در این مطالعه سطح پروتئین p53 و سایر اجزای مسیرهای پایین‌دستی آپوپتوز بررسی نشد. همچنین، با توجه به اینکه عصاره مورد استفاده حاوی مجموعه‌ای از ترکیبات زیست‌فعال است، نمی‌توان اثر مشاهده‌شده را به‌طور قطعی به تیموکینون نسبت داد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که علاوه بر تیموکینون، ترکیبات دیگری از *Nigella sativa* مانند α -hederin نیز ممکن است در اثرات ضدسرطانی عصاره نقش داشته باشند. بنابراین، شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فعال عصاره و مقایسه اثر عصاره کامل با ترکیبات خالص می‌تواند در مطالعات آینده اهمیت داشته باشد. در نهایت، انجام مطالعات *in vivo*، بررسی رده‌های سلولی مختلف و ارزیابی نشانگرهای پروتئینی و مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با آپوپتوز برای تأیید مکانیسم اثر و بررسی قابلیت ترجمه این یافته‌ها با مطالعات پیش‌بالینی و بالینی ضروری است.^(۲۳،۲۴)

در مجموع، یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی سیاهدانه در شرایط آزمایشگاهی دارای اثرات مهارکننده رشد و القاکننده آپوپتوز در سلول‌های SCC-۱۵ است و با افزایش بیان mRNA ژن TP53 همراه می‌باشد. این نتایج می‌تواند مبنایی برای انجام مطالعات تکمیلی

نیز نشان داده‌اند که مسیر p53 در پاسخ به تیموکینون نقش مهمی در القای اثرات ضدسرطانی دارد. با این حال، باید توجه داشت که افزایش mRNA ژن TP53 به‌تنهایی اثبات‌کننده افزایش فعالیت عملکردی پروتئین p53 نیست. از این رو، با توجه به اینکه در مطالعه حاضر وضعیت جهش TP53، سطح پروتئین p53 و فعالیت عملکردی آن بررسی نشده است، یافته حاضر باید با احتیاط تفسیر شود. انجام مطالعات تکمیلی در سطح پروتئین و بررسی اهداف پایین‌دستی مسیر p53 می‌تواند به روشن شدن نقش عملکردی این مسیر در اثر عصاره سیاهدانه کمک کند.^(۲۰-۲۳)

نتایج فلوسایتومتری مطالعه حاضر افزایش معنی‌دار جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک را پس از تیمار با عصاره سیاهدانه نشان داد، در حالی که تغییرات ایجادشده در سلول‌های طبیعی محدودتر بود. افزایش آپوپتوز همراه با کاهش زنده‌مانی سلولی، یافته‌های حاصل از آزمون سمیت سلولی را تقویت می‌کند و نشان می‌دهد که کاهش تعداد سلول‌های زنده احتمالاً تا حدی ناشی از فعال شدن مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است. این یافته با شواهد اخیر در مورد تیموکینون در سرطان‌های سلول سنگفرشی سر و گردن همخوانی دارد؛ به‌طوری‌که در مطالعات پیشین افزایش نشانگرهای پیش‌آپوپتوتیک و فعال شدن کاسپازها پس از مواجهه با تیموکینون گزارش شده است. همچنین، مطالعه‌ای در سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان نشان داد که تیموکینون می‌تواند از طریق تغییر تعادل عوامل مرتبط با آپوپتوز و افزایش استرس اکسیداتیو، مرگ سلولی را تقویت کند.^(۲۰،۲۱)

نتایج نشان داد که تیمار با عصاره سیاهدانه موجب افزایش معنی‌دار آپوپتوز اولیه و دیررس در سلول‌های SCC-۱۵ شد، در حالی که تغییرات ایجاد شده در سلول‌های طبیعی

درباره ظرفیت زیستی ترکیبات موجود در سیاهدانه در تحقیقات سرطان دهان باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی دانه *sativa Nigella* در شرایط آزمایشگاهی موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان (SCC-۱۵) به صورت وابسته به دوز و زمان شد. همچنین، این عصاره در مقایسه با فیروبلاست‌های طبیعی لته انسان اثرات سیتوتوکسیک کمتری نشان داد که بیانگر حساسیت بیشتر سلول‌های سرطانی به تیمار با عصاره مورد بررسی است.

نتایج حاصل از آنالیز بیان ژن و فلوسایتومتری نشان داد که کاهش زنده‌مانی سلولی با افزایش بیان mRNA ژن TP53 و افزایش جمعیت سلول‌های آپپتوتیک همراه بوده است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که القای آپپتوز ممکن است یکی از مکانیسم‌های دخیل در اثرات زیستی مشاهده شده باشد.

با توجه به اینکه در این پژوهش از عصاره کامل گیاه استفاده شد، احتمال می‌رود مجموعه‌ای از ترکیبات زیست‌فعال موجود در سیاهدانه در ایجاد پاسخ‌های مشاهده شده نقش داشته باشند. با این حال، تعیین سهم هر یک از ترکیبات فعال و شناسایی دقیق مکانیسم‌های مولکولی نیازمند مطالعات تکمیلی است. با توجه به انتخاب‌پذیری مناسب عصاره سیاه دانه در مهار سلول‌های SCC-۱۵ و القای

منابع

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol 2009;45(4-5):309-16.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2024;74(3):229-63.
3. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. CA Cancer J Clin 2024;74(1):12-49.

آپوپتوز، این ترکیب می‌تواند به عنوان یک گزینه امیدوارکننده برای مطالعات پیش‌بالینی و توسعه درمان‌های کمکی سرطان دهان مورد توجه قرار گیرد.

در مجموع، نتایج این پژوهش شواهدی در حمایت از ظرفیت زیستی عصاره هیدروالکلی سیاه دانه در مهار رشد سلول‌های SCC-۱۵ در شرایط آزمایشگاهی فراهم می‌کند. با این وجود، برای ارزیابی اهمیت زیستی و کاربرد بالقوه این یافته‌ها، انجام مطالعات مکانیسمی بیشتر، بررسی در مدل‌های حیوانی و در نهایت مطالعات بالینی ضروری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه طرح پژوهشی انجام شده در دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران و مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران می‌باشد. نویسندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را از مسئولان، اعضای هیئت علمی دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد تهران و کارکنان آزمایشگاه‌های مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران که در انجام این پژوهش همکاری و حمایت لازم را فراهم نمودند، ابراز می‌دارند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ‌گونه تعارض منافی در ارتباط با این پژوهش وجود ندارد.

4. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma—an update. *CA Cancer J Clin* 2015;65(5):401-21.
5. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000 2011;57(1):19-37.
6. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-20.
7. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11(1):9-22.
8. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007;35(4):495-516.
9. Hanahan D. Hallmarks of cancer: New dimensions. *Cancer Discov* 2022;12(1):31-46.
10. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25(34):4798-811.
11. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88(3):323-31.
12. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8(4):275-83.
13. Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2007;357(25):2552-261.
14. Muller PAJ, Vousden KH. Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 2014;25(3):304-17.
15. Ahmad A, Husain A, Mujeeb M, Khan SA, Najmi AK, Siddique NA, et al. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013;3(5):337-52.
16. Tavakkoli A, Mahdian V, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Review on clinical trials of Black Seed (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone. *J Pharmacopuncture* 2017;20(3):179-93.
17. Gholamnezhad Z, Keyhanmanesh R, Boskabady MH. Anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory aspects of *Nigella sativa* for its preventive and bronchodilatory effects on obstructive respiratory diseases: A review of basic and clinical evidence. *J Funct Foods* 2015; 17:910-27.
18. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KH. Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol* 2012;83(4):443-51.
19. 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):173-80.
20. Fath MK, Nasiri K, Ghasemzadeh S, Nejati ST, Ghafari N, Masouleh SS, et al. Thymoquinone potentiates anti-cancer effects of cisplatin in oral squamous cell carcinoma via targeting oxidative stress. *Chem Biol Drug Des* 2024;103(3):e14492
21. Kwan K, Han AY, Mukdad L, Barragan F, Selim O, Alhiyari Y, et al. Anticancer effects of thymoquinone in head and neck squamous cell carcinoma: A scoping review. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* 2023;8(4):876-85.
22. Aktar MA, Bhuia MS, Chowdhury R, Biswas S, Sanzida MR, Sonia FA, et al. Anticancer activity of *Nigella sativa* and its bioactive compounds: An update. *Pharmacological Research J Nat Prod* 2024; 5:100100
23. Sharma B, Shekhar H, Sahu A, Haque S, Kaur D, Tuli HS, et al. Deciphering the anticancer potential of thymoquinone: in-depth exploration of the potent flavonoid from *Nigella sativa*. *Mol Biol Rep* 2025;52(1):268
24. Al-Damook N, Sakkal M, Khair M, Mousa WK, Khoder G, Ghemrawi R. Targeting cancer through thymoquinone: from molecular mechanisms to clinical prospects. *Int J Mol Sci* 2025;26(22):11029.
25. Rajput S, Kumar BNP, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci* 2013;93(21):783-90.

26. Motaghd M, Al-Hassan FM, Hamid SS. Cellular responses with thymoquinone treatment in human breast cancer cell line MCF-7. *Pharmacognosy Res* 2013; 5:200-6.
27. Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 2005;5(13-14):1749-70.
28. Harborne JB. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3rd ed. London: Chapman & Hall; 1998. P. 1-32.
29. Sarker SD, Nahar L. *Natural Products Isolation*. 3rd ed. Totowa (NJ): Humana Press; 2012. P. 27-41.
30. Freshney RI, Capes-Davis A. *Freshney's Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 8th ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell; 2021. P. 177-94.
31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1-2):55-63.
32. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11:127-152.
33. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein-labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184(1):39-51.
34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-9.
35. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
36. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55(4):611-22.
37. Motulsky H. *Intuitive Biostatistics: A Nonmathematical Guide to Statistical Thinking*. 4th ed. New York: Oxford University Press; 2018. P. 294-305.
38. Farooqi AA, Attar R, Xu B. Anticancer and anti-metastatic role of thymoquinone: regulation of oncogenic signaling cascades by thymoquinone. *Int J Mol Sci* 2022;23(11):6311.
39. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2015;95-96:138-58.
40. Rajput S, Kumar BNP, Dey KK, Pal I, Parekh A, Mandal M. Molecular targeting of Akt by thymoquinone promotes G1 arrest through translation inhibition of cyclin D1 and induces apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci* 2013;93(21):783-90.
41. 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;25(4):857-66.
42. Kwan K, Han AY, Mukdad L, Barragan F, Selim O, Alhiyari Y, St John M. Anticancer effects of thymoquinone in head and neck squamous cell carcinoma: A scoping review. *Laryngoscope Investig Otolaryngol*. 2023;8(4):876-85.
43. Sadeghi E, Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Molecular mechanisms and signaling pathways of black cumin (*Nigella sativa*) and its active constituent, thymoquinone: a review. *Mol Biol Rep* 2023; 50(6):5439-54.
44. Tan Y, Wang Z, Xu M, Li B, Huang Z, Qin S, et al. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. *Int J Oral Sci* 2023 22;15(1):44.