

ETHANOL EXTRACT FROM *SAUROPUS ROSTRATUS* LEAVES ARREST CELL CYCLE AND INDUCES APOPTOSIS IN HEPG2 LIVE CANCER CELLS

Nguyen Thi Huong, Ngo Thu Ha, Le Thi Thanh Huong, Nguyen Hoai Huong,
Pham Thi Quynh, Vu Ngoc Duong, Nguyen Phu Hung*

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/6/2021	Liver cancer is the second most lethal cancer and hepatocellular carcinoma is the most common type of primary liver cancer. Although there have been advances in cancer treatment, however, current anti-cancer chemotherapies still have many limitations, especially post-treatment side effects. This study is aimed to evaluate the cancer cell inhibitory role of ethanol extract from <i>Sauropus rostratus</i> on HepG2 live cancer cells. By cell viability assay (MTT), we showed that the ethanol extract from <i>Sauropus rostratus</i> leaves inhibited the cell proliferation of HepG2 cells in a dose-dependent manner. Flow cytometry analysis revealed that <i>Sauropus rostratus</i> ethanol extract arrested cell cycle at M/G2 phase caused apoptosis with percentage from 15.5 - 32.3% in a dose-dependent manner. The results of this study showed that ethanol extract from <i>Sauropus rostratus</i> has potential against liver cancer cells.
Revised: 29/6/2021	
Published: 02/7/2021	
KEYWORDS	
<i>Sauropus rostratus</i>	
Live cancer	
Cell proliferation	
Cell cycle	
Apoptosis	

DỊCH CHIẾT ETHANOL TỪ LÁ CÂY ĐƠN LƯỖI HỔ (*SAUROPUS ROSTRATUS*) LÀM DỪNG CHU KỶ PHÂN CHIA VÀ GÂY APOPTOSIS ĐỐI VỚI TẾ BÀO UNG THƯ GAN HEPG2

Nguyễn Thị Hương, Ngô Thu Hà, Lê Thị Thanh Hương, Nguyễn Hoài Hương,
Phạm Thị Quỳnh, Vũ Ngọc Dương, Nguyễn Phú Hùng*

Trường Đại học Khoa học – ĐHTT Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/6/2021	Ung thư gan là loại ung thư gây tử vong cao thứ hai và ung thư biểu mô gan là phân nhóm ung thư chính. Mặc dù đã có những tiến bộ trong điều trị ung thư hiện nay, tuy nhiên các phương pháp điều trị bằng hóa chất hiện tại vẫn còn tồn tại nhiều hạn chế, đặc biệt là các tác dụng phụ sau điều trị. Nghiên cứu này nhằm mục tiêu đánh giá vai trò ức chế tế bào ung thư của dịch chiết ethanol từ cây Đơn lưỡi hổ (<i>Sauropus rostratus</i>), trên dòng tế bào ung thư biểu mô gan HepG2. Bằng các sàng lọc sống sót (MTT) cho thấy, dịch chiết ethanol từ cây Đơn lưỡi hổ đã ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan tùy theo nồng độ. Kết quả phân tích bằng flow cytometry chỉ ra rằng, dịch chiết ethanol từ cây Đơn lưỡi hổ làm dừng sự phân chia tại pha G2/M và làm tăng apoptosis tế bào ung thư gan HepG2 từ 15,5 - 32,3% tùy theo nồng độ. Kết quả của nghiên cứu này chỉ ra rằng, dịch chiết của cây Đơn lưỡi hổ có tiềm năng chống lại các tế bào ung thư gan HepG2.
Ngày hoàn thiện: 29/6/2021	
Ngày đăng: 02/7/2021	
TỪ KHÓA	
<i>Sauropus rostratus</i>	
Ung thư gan	
Tăng sinh tế bào	
Chu kỳ tế bào	
Apoptosis	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4611>

* Corresponding author. Email: hungnguyenphu@tnus.edu.vn

1. Giới thiệu

Theo thống kê của tổ chức Y tế thế giới, ung thư gan gây tử vong cao thứ hai trong các loại ung thư và ung thư biểu mô gan là loại ung thư nguyên phát phổ biến nhất [1]. Đa số bệnh nhân ung thư biểu mô gan được phát hiện ở giai đoạn tiến triển hoặc giai đoạn muộn. Trong trường hợp này, điều trị bằng hóa chất hay xạ trị là lựa chọn chính. Tuy nhiên, phương pháp điều trị bằng xạ trị thường gây nhiều tác dụng phụ, chi phí hóa chất tốn kém và tỉ lệ bệnh nhân sống sót sau 5 năm vẫn còn rất hạn chế [2], [3]. Do đó, việc nghiên cứu và phát triển loại thuốc mới điều trị ung thư biểu mô gan luôn là nhu cầu cấp thiết. Trong những năm gần đây, nghiên cứu về các sản phẩm dược liệu được sử dụng làm thuốc trong điều trị ung thư được đặc biệt quan tâm bởi những ưu điểm về chi phí cũng như ít tác dụng phụ trong điều trị [3]. Ung thư là bệnh phức tạp do những biến đổi về mặt di truyền như đột biến gene hoặc những thay đổi về mặt biểu sinh (epigenetics) của các gene, vùng nhiễm sắc thể liên quan tới các oncogene hoặc các gene ức chế ung thư [4]. Các cơ chế phát sinh ung thư đã được nghiên cứu kỹ như sự mất kiểm soát trong chu kỳ phân chia của tế bào hay sự thay đổi của con đường tín hiệu apoptosis và các con đường tín hiệu khác như Notch, EGFR và PI3K [5]. Trong đó, những biến đổi dẫn tới rối loạn chu kỳ phân chia tế bào và mất kiểm soát apoptosis là những cơ chế phổ biến và được nghiên cứu nhiều [6]. Phát triển các thuốc mới hoặc các dược phẩm hỗ trợ điều trị có khả năng can thiệp vào chu kỳ tế bào và quá trình apoptosis là một trong những mục tiêu chính của nhiều nghiên cứu về thuốc chống ung thư hiện nay [7].

Cây Đơn lưỡi hổ (*Sauropus rostratus*) thuộc chi Sauropus, là loại dược liệu có giá trị đã được sử dụng để điều trị ho, viêm phế quản, táo bón và giải độc gan trong y học cổ truyền Trung Quốc [8]. Huang và đồng tác giả đã chỉ ra rằng, chiết xuất của Đơn lưỡi hổ thể hiện khả năng kháng khuẩn mạnh, chống lại *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* và *Salmonella typhi* [8]. Bên cạnh đó, Zhang và đồng nghiệp đã chỉ ra rằng, chiết xuất của cây Đơn lưỡi hổ có khả năng chống oxy hóa hiệu quả [9]. Cây Đơn lưỡi hổ có chứa hợp chất 2-deoxy-3,6-anhydro hexofuranoside, có khả năng chống oxy hóa, kháng u, chống tăng lipid máu, kháng virus và kháng viêm hiệu quả [8]. Tuy nhiên, hiện nay những nghiên cứu cụ thể về chiết xuất của cây Đơn lưỡi hổ tác động lên ung thư, đặc biệt ung thư gan còn hạn chế. Ở Việt Nam, cây Đơn lưỡi hổ được tìm thấy ở một số tỉnh miền núi phía Bắc Việt Nam. Bên cạnh các hoạt tính chống viêm, kháng khuẩn mạnh và tác dụng giải độc gan của cây Đơn lưỡi hổ đã được các tác giả trên thế giới nghiên cứu, nghiên cứu này bước đầu đánh giá tác động của dịch chiết ethanol từ cây Đơn lưỡi hổ tới khả năng sống sót, chu kỳ phân chia tế bào cũng như khả năng gây apoptosis đối với dòng tế bào ung thư biểu mô gan HepG2.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Thu mẫu và chiết dịch từ lá cây Đơn lưỡi hổ bằng ethanol

Mẫu lá của cây Đơn lưỡi hổ được thu thập tại huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên, số hiệu tiêu bản mẫu: HT290912-49 lưu trữ tại trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.

Một kg lá cây Đơn lưỡi hổ được thu thập, rửa sạch, sấy khô ở 50°C trong 48h và nghiền thành bột mịn để tạo dịch chiết với ethanol. Dịch chiết của lá cây Đơn lưỡi hổ được bổ sung ethanol 95% vào ống falcon chứa bột mịn lá và lắc qua đêm ở tốc độ 200 vòng/phút. Dịch chiết được lọc bằng giấy lọc Whatman (Merk, Đức). Sau đó cho bay hơi hoàn toàn ethanol ở nhiệt độ 40°C trong 24h. Dịch chiết được sử dụng đánh giá tác động trên dòng tế bào ung thư gan HepG2.

2.2. Phân tích sự tăng sinh tế bào bằng sàng lọc MTT

Dòng tế bào ung thư gan HepG2 do Ngân hàng chủng chuẩn của Mỹ (ATCC) cung cấp. Tế bào nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy 96 giếng trong môi trường RPMI 1640 có bổ sung 10% huyết thanh bào thai bò (FBS) và 1% kháng sinh ampicillin/streptomycin ở nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ ở mật độ 5x10³ tế bào/giếng, thể tích nuôi cấy là 100 µL/giếng. Sau 48h nuôi cấy, các tế bào bám dính hoàn toàn trên bề mặt đĩa và đạt khoảng 1/3 diện tích bề mặt thì tiến hành xử lý với dịch

chiết ethanol từ cây Đơn lưỡi hổ với các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1 mg/mL. Giếng đối chứng được xử lý với lượng DMSO tương ứng. Tế bào được nuôi cấy trong 48h ở điều kiện 37°C, 5% CO₂, độ ẩm 95% để đánh giá tác động của dịch chiết lên sự phân chia tế bào. Tiếp theo, môi trường nuôi cấy được thay thế hoàn toàn bằng 100 µL môi trường nuôi cấy mới chứa hóa chất MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Thermo Fisher, Mỹ) nồng độ 5 mg/mL. Tế bào tiếp tục được ủ trong 4h ở nhiệt độ 37°C. Sau đó, loại bỏ môi trường chứa MTT sau khi ủ và tiến hành bổ sung 100 µL DMSO. Mức độ tăng sinh của tế bào được xác định gián tiếp qua việc đo mật độ quang ở bước sóng 570 nm trên máy quang phổ đa năng (Multiskan Sky, Thermo Fisher). Các tế bào trước khi phân tích MTT được chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược TS2 (NIKON, Nhật Bản) ở độ phóng đại 200 và 400 lần.

$$\% \text{ mức độ tăng sinh tế bào} = (\text{Mật độ quang giếng xử lý} / \text{mật độ quang giếng đối chứng}) \times 100$$

Giá trị IC₅₀ được tính theo phần mềm GraphPad Prism 5.0.

2.3. Phân tích apoptosis và chu kỳ tế bào bằng Flow cytometry

Để đánh giá tác động của dịch chiết từ lá cây Đơn lưỡi hổ lên chu kỳ tế bào và apoptosis được tiến hành theo phương pháp nhuộm PI (Propidium iodide) [10], các bước tiến hành như sau: 2x10⁵ tế bào ung thư biểu mô gan HepG2 được nuôi cấy trên đĩa 24 giếng, trong 0,5 mL môi trường RPMI 1640 chứa 10% huyết thanh bò. Sau khi tế bào đã đạt đến mật độ khoảng 30% diện tích của giếng, tiến hành xử lý bằng môi trường mới chứa dịch chiết của lá cây Đơn lưỡi hổ ở các nồng độ khác nhau từ 0,1 – 0,5 mg/mL trong 48h ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tiếp theo, tế bào được thu nhận lại bằng cách xử lý với dung dịch trypsin/EDTA (0,25%) và ly tâm 1.300 vòng/phút trong 3 phút. Nhuộm tế bào với dung dịch Fluorochrom (0,1% sodium citrate (w/v); 0,1% Triton X-100 (v/v); 50 mg/l PI trong nước khử ion vô trùng) trong thời gian 2h ở 40°C. Chu kỳ tế bào và apoptosis được phân tích bằng hệ thống Flow cytometry BD Accuri™ C6 Plus.

2.4. Phân tích và xử lý số liệu

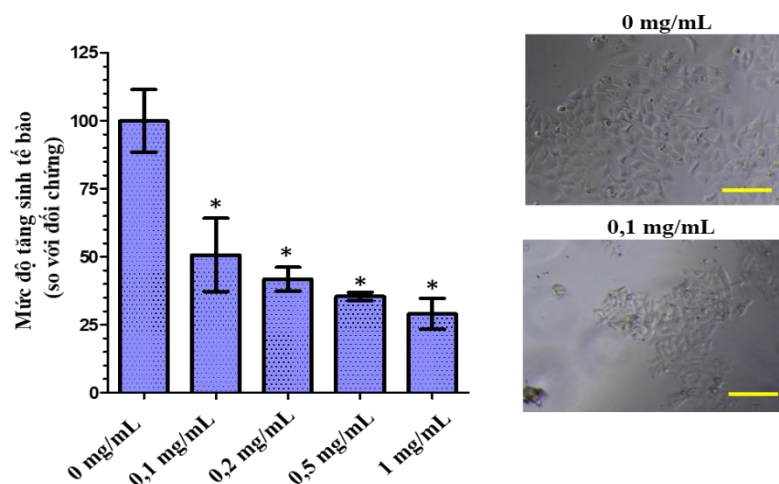
Toàn bộ dữ liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê GraphPad Prism 5.0 theo kiểm định Mann Whitney U Test, P < 0,05.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2

Để nghiên cứu tác động của dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ đến tế bào ung thư gan HepG2, các tế bào nuôi cấy được xử lý với dịch chiết trong môi trường nuôi cấy ở các nồng độ 0,1; 0,2; 0,5; 1 mg/mL. Tác động của các nồng độ khác nhau của dịch chiết lên sự tăng sinh tế bào được thể hiện ở hình 1. Kết quả chỉ ra rằng, sau 48 h xử lý với dịch chiết, tốc độ tăng sinh của tế bào ung thư đã giảm rõ rệt so với đối chứng (0 mg/mL). Cụ thể với nồng độ dịch chiết 0,1 mg/mL, tỉ lệ tăng sinh của tế bào đã giảm xấp xỉ 50% và mật độ tế bào đã giảm rõ rệt so với đối chứng. Sự tăng dần của nồng độ dịch chiết từ 0,2 - 1 mg/mL đã tăng cường tác động ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan. Giá trị IC₅₀ được tính toán với dòng tế bào ung thư là 0,09 mg/mL.

Trước đó, nghiên cứu của nhóm tác giả Liu và đồng tác giả chỉ ra rằng, dịch chiết ethanol từ *Ophiorrhiza pumila* gây ra kìm hãm sự nhân lên của tế bào ung thư gan HepG2 với nồng độ IC₅₀ là 6,25 µg/mL [11]. Lai và cộng sự đã chỉ ra, dịch chiết ethanol từ rễ cây *Prunus persica* gây ức chế sự tăng sinh với dòng tế bào ung thư HepG2 với IC₅₀ là 1,56 mg/mL [12]. Từ các kết quả nghiên cứu trên cho thấy, dịch chiết ethanol từ các loài thảo dược khác nhau có tác động khác nhau lên sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2 tùy vào dược tính từng loại. Bên cạnh đó, một nghiên cứu khác chỉ ra rằng, cây Đơn lưỡi hổ có chứa hợp chất 2-deoxy-3,6-anhydro hexofuranoside, với hoạt tính sinh học bao gồm chống oxy hóa, kháng tế bào ung thư [8]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về thử nghiệm sâu hơn hoạt tính sinh học của hợp chất này sau tách chiết còn hạn chế.



Hình 1. Tác động của dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ lên sự tăng sinh tế bào ung thư gan. Tế bào ung thư gan HepG2 được xử lý bằng dịch chiết ở các nồng độ từ 0,1 – 1 mg/mL trong 48h. Hình ảnh được chụp dưới kính hiển vi soi ngược NIKON Ts2 ở độ phóng đại 200 lần, $n = 5$; $*P < 0,05$. Thang đo: 50 μm .

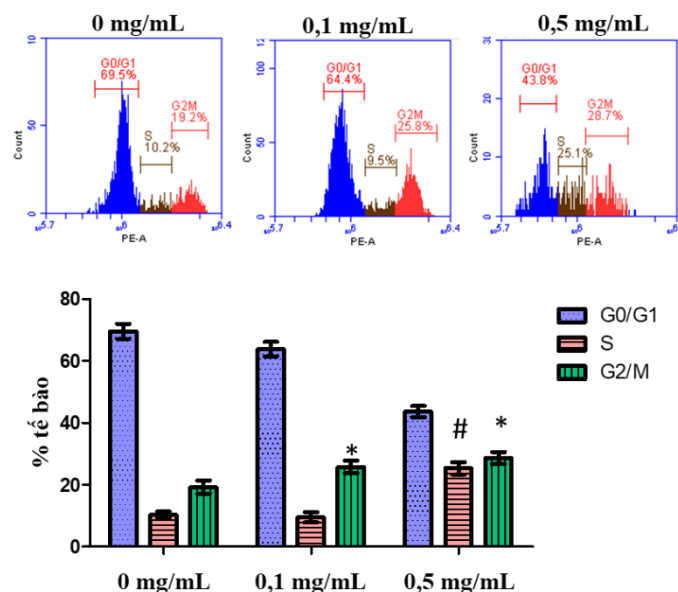
Từ kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy, dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ có tác dụng ức chế sự tăng sinh với tế bào ung thư biểu mô gan. Đó là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu xa hơn các hoạt tính sinh học khác cũng như phân lập những hợp chất có hoạt tính sinh học chống ung thư gan từ lá cây Đơn lưỡi hổ.

3.2. Dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ ức chế sự phân chia của tế bào HepG2

Để phân tích sự ảnh hưởng của dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ đối với các pha của chu kỳ phân chia của tế bào HepG2, các tế bào được xử lý với dịch chiết nồng độ khác nhau (0,1 và 0,5 mg/mL), sau đó DNA nhân được nhuộm với propidium iodide và được phân tích bằng phương pháp Flow cytometry. Thí nghiệm này cho phép xác định được tỉ lệ phần trăm tế bào trong các pha khác nhau của chu kỳ tế bào. Kết quả phân tích thể hiện ở hình 2 cho thấy, tỉ lệ tế bào ở các pha phụ thuộc vào nồng độ dịch chiết. Với nồng độ dịch chiết 0,1 mg/mL, tỉ lệ tế bào ở pha G0/G1 đã giảm rõ rệt và pha G2/M tăng lên so với đối chứng. Sự khác biệt rõ ràng hơn khi tăng nồng độ thuốc thử lên 0,5 mg/mL, pha G2/M tăng lên và pha G0/G1 giảm xấp xỉ 50% so với đối chứng ($P < 0,05$).

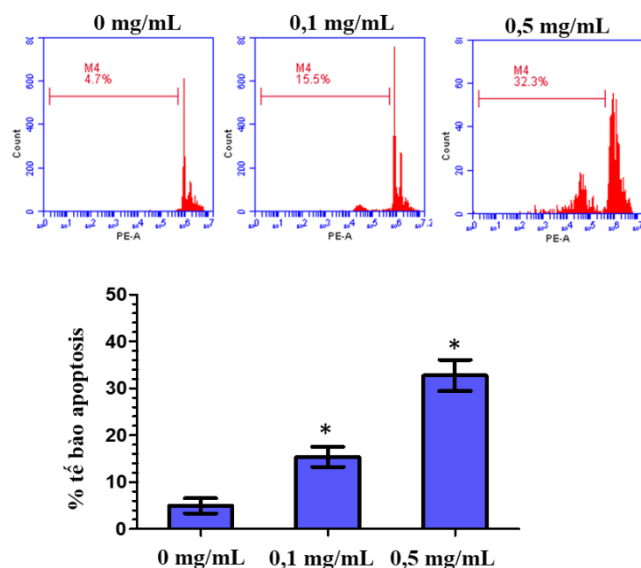
Trước đó, nghiên cứu của Liu và cộng sự chỉ ra rằng, dịch chiết ethanol từ *Ophiorrhiza pumila* cũng khiến sự tích tụ tế bào ở pha G2/M tăng rõ rệt so với đối chứng trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 ở nồng độ 6,25 $\mu\text{g/mL}$ [11]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Lai và cộng sự cũng chỉ ra, dịch chiết ethanol từ rễ cây *Prunus persica* gây trì hoãn pha G2/M ở nồng độ 1,56 mg/mL [12]. Như vậy có thể thấy rằng, những thảo dược khác nhau được cho là gây ra sự ức chế tăng trưởng của tế bào ung thư HepG2 bằng cách làm dừng quá trình phân chia của tế bào tại pha G2/M.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy, nồng độ khác nhau dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ tác động đến tỉ lệ tế bào ở pha khác nhau của chu kỳ phân chia cũng như tác động đến tỷ lệ sống sót của tế bào.



Hình 2. Tác động của dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ lên chu kỳ phân chia của tế bào HepG2. Tế bào sau 48h xử lý với dịch chiết được phân tích chu kỳ tế bào bằng Flow cytometry, $n = 3$; #, * $P < 0,05$

3.3. Dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ gây apoptosis đối với tế bào ung thư gan HepG2



Hình 3. Tác động của dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ lên apoptosis của tế bào HepG2. Tế bào sau 48h xử lý với dịch chiết ethanol được phân tích apoptosis bằng Flow cytometry, $n = 3$; * $P < 0,05$

Từ kết quả trên cho thấy, dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ có tác động đến chu kỳ tế bào, điều này tác động đến khả năng tăng sinh và sự sống sót của tế bào. Do đó, chúng tôi cũng tiến hành phân tích tác động của cùng nồng độ dịch chiết tới quá trình apoptosis. Các tế bào sau khi được xử lý với dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ được phân tích bằng phương pháp Flow cytometry sử dụng thuốc nhuộm PI. Kết quả phân tích tác động của dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ lên quá trình apoptosis của tế bào ung thư gan HepG2 thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, sau 48h, tế bào sau khi được xử lý với dịch chiết nồng độ 0,1 mg/mL, tỉ lệ tế bào chết đã tăng lên 15,5% so với đối chứng 4,7%. Sự

tăng lên của nồng độ dịch chiết cũng làm tăng mạnh tỉ lệ tế bào chết, với nồng độ thuốc là 0,5 mg/mL thì tỉ lệ tế bào chết là 32,3% ($P < 0,05$). Kết quả phân tích Flow cytometry (hình 3) cho thấy, với tế bào được bổ sung dịch chiết đã xuất hiện rõ quần thể phụ (sub G0/G1), là quần thể các tế bào kiểu nhân đặc trưng của apoptosis nằm tách rời các tế bào có kiểu hình bình thường của chu kỳ phân bào, trong đó ở đối chứng gần quần thể tế bào apoptosis chỉ chiếm một tỷ lệ nhỏ (4,7%). Kết quả nghiên cứu của Albinhassan và cộng sự tại Iran đã chỉ ra rằng, chiết xuất từ cây *Avicennia marina* gây ức chế sự tăng sinh do tác động gây chết ở tế bào ung thư gan HepG2 với nồng độ IC_{50} là 44,9 μ g/mL [13]. Kết quả tương tự cũng được chỉ ra bởi nhóm nghiên cứu của Liu và cộng sự khi tiến hành đánh giá tác động của dịch chiết ethanol từ cây *Ophiorrhiza pumila* lên tế bào ung thư gan HepG2 [11].

Quá trình apoptosis ở tế bào ung thư sẽ dẫn tới sự phá hủy DNA nhân tế bào, làm mất khả năng phân chia của tế bào; do đó làm giảm khả năng tăng sinh của tế bào ung thư [14]. Kết quả phân tích của chúng tôi cho thấy, dịch chiết cây Đơn lưỡi hổ gây chết tế bào theo chương trình (apoptosis) đối với dòng tế bào ung thư gan HepG2. Kết quả của nghiên cứu này là dữ liệu tiền đề cho việc nghiên cứu khả năng chống ung thư từ cây Đơn lưỡi hổ.

4. Kết luận

Nghiên cứu này chỉ ra rằng dịch chiết ethanolic từ lá cây Đơn lưỡi hổ (*Sauropus rostratus*) có khả năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư gan HepG2 với giá trị IC_{50} là 0,09 mg/mL, làm tích lũy tế bào tại pha G2/M và giảm xấp xỉ 50% tế bào ở pha G0/G1. Dịch chiết ethanol từ lá cây Đơn lưỡi hổ đã gây apoptosis đối với tế bào ung thư gan. Như vậy có thể thấy rằng, Đơn lưỡi hổ là loại thảo dược có khả năng chống lại tế bào ung thư gan.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. Sung, J. Ferlay, L. Siegel, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA A Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] C. Pucci, C. Martinelli, and G. Ciofani, "Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges," *Ecancer*, vol. 13, Sep. 2019, doi: 10.3332/ecancer.2019.961.
- [3] V. Schirrmacher, "From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review)," *Int J Oncol*, vol. 54, no. 2, pp. 407-419, Feb. 2019, doi: 10.3892/ijo.2018.4661.
- [4] J. S. You and P. A. Jones, "Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 1, pp. 9-20, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.008.
- [5] F. Sanchez-Vega *et al.*, "Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas," *Cell*, vol. 173, no. 2, pp. 321-337.e10, Apr. 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.035.
- [6] G. O. Arican, "Effects of Geven root extract on proliferation of HeLa cells and bcl-2 gene expressions," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 11, no. 18, Mar. 2012, doi: 10.5897/AJB11.2971.
- [7] E. I. Papadopoulos, G. M. Yousef, and A. Scorilas, "Cytotoxic activity of sunitinib and everolimus in Caki-1 renal cancer cells is accompanied by modulations in the expression of apoptosis-related microRNA clusters and BCL2 family genes," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 70, pp. 33-40, Mar. 2015, doi: 10.1016/j.biopha.2014.12.043.
- [8] C. Zhang, C. Wang, Z. Wang, G. Tanabe, O. Muraoka, A. Lin, J. Xu, X. Wu, L. Wu, and W. Xie, "Total synthesis, structural elucidation and anti-inflammatory activity evaluation of 2-deoxy-3,6-anhydro hexofuranoside derivatives isolated from *Sauropus rostratus*," *Org. Biomol. Chem.*, vol. 14, no. 46, pp. 10906-10913, 2016, doi: 10.1039/C6OB02207C.
- [9] W.-M. Zhang, W.-Y. Huang, W.-X. Chen, L. Han, and H.-D. Zhang, "Optimization of Extraction Conditions of Areca Seed Polyphenols and Evaluation of Their Antioxidant Activities," *Molecules*, vol. 19, no. 10, pp. 16416-16427, Oct. 2014, doi: 10.3390/molecules191016416.
- [10] C. Riccardi and I. Nicoletti, "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *Nat Protoc*, vol. 1, no. 3, pp. 1458-1461, Aug. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.238.

-
- [11] H. Liu, W. Liao, L. Fan, Z. Zheng, D. Liu, Q-W. Zhang, A. Yang, and F. Liu, "Ethanol extract of *Ophiorrhiza pumila* suppresses liver cancer cell proliferation and migration," *Chin Med*, vol. 15, no. 1, p. 11, Dec. 2020, doi: 10.1186/s13020-020-0291-4.
- [12] H. Shen, H. Wang, L. Wang, L. Wang, M. Zhu, Y. Ming, S. Zhao, J. Fan, and E-Y. Lai, "Ethanol Extract of Root of *Prunus persica* Inhibited the Growth of Liver Cancer Cell HepG2 by Inducing Cell Cycle Arrest and Migration Suppression," *Evid Based Complement Alternat Med*, vol. 2017, p. 8231936, 2017, doi: 10.1155/2017/8231936.
- [13] A. A. Momtazi-Borojeni, M. Behbahani, and H. Sadeghi-Aliabadi, "Antiproliferative activity and apoptosis induction of crude extract and fractions of *avicennia marina*," *Iran J Basic Med Sci*, vol. 16, no. 11, pp. 1203-1208, Nov. 2013.
- [14] D. De Zio, V. Cianfanelli, and F. Cecconi, "New Insights into the Link Between DNA Damage and Apoptosis," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 19, no. 6, pp. 559-571, Aug. 2013, doi: 10.1089/ars.2012.4938.