

GROWTH INHIBITORY ACTIVITY OF *ARDISIA VILLOSA* LEAF EXTRACT ON MKN45 GASTRIC CANCER CELL

Le Thi Thanh Huong¹, Pham Van Khang², Ha Thi Thanh Hien¹, Nguyen Phu Hung^{1*}

¹TNU - University of Sciences, ²TNU – University of Education

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 08/6/2021	According to Globocan 2020, Vietnam had a total of 1825563 new cases and 122690 deaths linked to cancer. In recent decades, stomach cancer treatment has made remarkable progress. However, the 5-year survival rate of gastric cancer patients is still low, less than 30%. In this study, we conducted to qualify chemical composition and evaluated the inhibitory effect of ethanol extract from <i>Ardisia villosa</i> leaves on gastric cancer MKN45 cell line. Qualitative results revealed that the ethanol extract of <i>Ardisia villosa</i> species contained saponins, tannins but not triterpenoids and alkaloids. The <i>Ardisia villosa</i> ethanol extract had a proliferation inhibitory ability and changed MKN45 gastric cancer cell morphology. The IC ₅₀ value was determined to be 144.54 µg/mL. Our study showed that <i>Ardisia villosa</i> had the potential to inhibit gastric cancer cell proliferation.
Revised: 31/7/2021	
Published: 31/7/2021	
KEYWORDS	
<i>Ardisia villosa</i>	
Medicinal plant	
Gastric cancer	
Cell proliferation	
Saponin	

HOẠT TÍNH ỨC CHẾ SỰ TĂNG SINH TẾ BÀO CỦA DỊCH CHIẾT TỪ LÁ CÂY CƠM NGUỘI LÔNG (*ARDISIA VILLOSA*) TRÊN TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY MKN45

Lê Thị Thanh Hương¹, Phạm Văn Khang², Hà Thị Thanh Hiền¹, Nguyễn Phú Hùng^{1*}

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên, ²Trường Đại học Sư phạm – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 08/6/2021	Theo ghi nhận của Globocan năm 2020, Việt Nam có tổng số ca ung thư mới mắc là 1.825.563 người, tổng số ca tử vong là 122.690. Điều trị ung thư dạ dày đã đạt được những tiến bộ rõ rệt trong những thập kỷ gần đây. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót 5 năm của các bệnh nhân ung thư dạ dày vẫn còn thấp, dưới 30%. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định tính các thành phần hóa học và đánh giá tác động ức chế ung thư dạ dày dòng tế bào MKN45 của dịch chiết ethanol từ loài Cơm nguội lông (<i>Ardisia villosa</i>). Kết quả định tính cho thấy, dịch chiết ethanol của loài <i>Ardisia villosa</i> chứa saponin, tanin nhưng không chứa triterpenoid và alkaloid. Dịch chiết ethanol của loài <i>Ardisia villosa</i> có khả năng ức chế tăng sinh và làm thay đổi kiểu hình của tế bào ung thư dạ dày dòng MKN45. Giá trị IC ₅₀ được xác định là 144,54 µg/mL. Nghiên cứu này của chúng tôi đã chỉ ra rằng, <i>Ardisia villosa</i> có tiềm năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày.
Ngày hoàn thiện: 31/7/2021	
Ngày đăng: 31/7/2021	
TỪ KHÓA	
<i>Ardisia villosa</i>	
Cây thuốc	
Ung thư dạ dày	
Tăng sinh tế bào	
Saponin	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4612>

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

1. Giới thiệu

Ung thư dạ dày đứng hàng thứ 5 sau ung thư phổi, vú, tuyến tiền liệt, đại tràng với số ca tử vong vì ung thư dạ dày trên toàn thế giới năm 2020 là 768.793 ca [1]. Cũng theo ghi nhận của Globocan năm 2020, Việt Nam có tổng số ca ung thư mới mắc là 182.563 người, tổng số ca tử vong do ung thư là 122.690 [1]. Điều trị ung thư dạ dày trong những năm gần đây đã đạt được những tiến bộ rõ rệt. Tuy nhiên, tỷ lệ sống sót 5 năm của các bệnh nhân ung thư dạ dày vẫn còn rất thấp, 353.826 người tương ứng với tỷ lệ dưới 30% [2], [3]. Một trong những thách thức trong điều trị ung thư hiện nay là sự kháng thuốc và kháng xạ trị, sự tái phát của khối u sau điều trị [3]. Các phương pháp tiếp cận trong điều trị ung thư bằng việc sử dụng các loài thảo dược có sẵn trong tự nhiên đang được quan tâm ở nhiều quốc gia khác nhau, điển hình như Trung Quốc, Ấn Độ, Hàn Quốc và Nhật Bản [4], [5].

Ardisia là một chi lớn nhất trong họ Myrsinaceae với khoảng 500 loài, phân bố rải khắp các vùng nhiệt và cận nhiệt đới như châu Mỹ, châu Á, số ít ở châu Úc, các đảo Thái Bình Dương và có tiềm năng ứng dụng trong đời sống [6]. Ở Việt Nam, chi này gồm 101 loài và nhiều loài được sử dụng làm thuốc [7]. Những nghiên cứu gần đây đã cho thấy, một số loài trong chi *Ardisia* có khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa [8], [9]. Các nghiên cứu xa hơn cũng đã chỉ ra, một số loài trong chi này còn có khả năng ức chế sự nhân lên của các tế bào ung thư khác nhau [10]. Một số cơ chế kháng ung thư từ các loài thuộc chi *Ardisia* cũng đã được chỉ ra như khả năng dừng chu kỳ tế bào, cảm ứng apoptosis [11], [12]. Cơm nguội lông (*Ardisia villosa*) là một loài thuộc chi *Ardisia* được tìm thấy ở nhiều khu vực khác nhau, trong đó có khu vực miền núi phía Bắc. Những hiểu biết về vai trò kháng ung thư của loài Cơm nguội lông còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành định tính các thành phần hóa học và đánh giá tác động ức chế ung thư dạ dày dòng tế bào MKN45 của dịch chiết ethanol từ loài *Ardisia villosa*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hoá chất

Mẫu vật: Mẫu lá từ cây Cơm nguội lông (*Ardisia villosa* Roxb.) thuộc chi *Ardisia* họ Đơn nem (Myrsinaceae) phân bố tại Bắc Kạn.

Dòng tế bào ung thư dạ dày: MKN45 do phòng Thí nghiệm Inserm U1053, Đại học Y Dược Bordeaux, Pháp cung cấp.

Hóa chất: Môi trường nuôi cấy RPMI 1640 (Invitrogen cung cấp), Propidium iodide và 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma cung cấp).

2.2. Phương pháp thu thập, xử lý mẫu vật và định loại

Sử dụng phương pháp thu thập, xử lý mẫu vật theo Nguyễn Nghĩa Thìn (2007) [13] và định loại theo Trần Thị Kim Liên trong cuốn Thực vật chí Việt Nam, tập 4, họ Myrsinaceae [14].

2.3. Phương pháp tách dịch chiết tổng thể từ lá bằng ethanol và định tính thành phần hóa học

Mẫu lá của loài Cơm nguội lông (*Ardisia villosa*) được thu nhận, rửa sạch, sấy khô ở nhiệt độ 42°C trong 48 h. Tiếp theo, mẫu lá được nghiền nhỏ bằng chày cối sứ thành bột mịn. 10 gam bột thu được sẽ được cho vào ống Falcon thể tích 50 mL. Để chiết rút dịch chiết tổng số, 30 mL ethanol tuyệt đối được bổ sung vào ống Falcon chứa 10 gam bột lá và được lắc 200 vòng/phút trong 48 h. Dịch chiết thu được, được lọc bằng giấy lọc Whatman, sau đó làm khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C trong 48 h, cặn thu được sau bay hơi sẽ được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Tiến hành các phản ứng định tính alkaloid, flavonoid, tannin, saponin, terpenoid, carbohydrate và protein theo mô tả của Sasidharin và cộng sự [15].

2.4. Xác định tỷ lệ tế bào sống bằng phương pháp MTT

Dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 được nuôi cấy trong RPMI 1640 có bổ sung 10% huyết thanh bò và 1% hỗn hợp kháng sinh Penicillin/Streptomycin (10,000 đơn vị/mL Penicillin và 10,000 µg/mL Streptomycin) do Invitrogen cung cấp. Tế bào nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy 96 giếng, nhiệt độ 37°C và 5% CO₂ ở mật độ 5x10³ tế bào/giếng, thể tích nuôi cấy là 100 µL/giếng. Sau 48 h, tế bào được xử lý bằng môi trường mới chứa dịch chiết ở các nồng độ từ 10 – 400 µg/mL.

Thời gian xử lý là 48 h, sau đó bổ sung 20 µL dung dịch MTT trong 4 h. Tiếp theo dung dịch nuôi cấy chứa hóa chất MTT được loại bỏ hoàn toàn và được thay thế bởi 100 µL dung môi DMSO và 12 µL dung dịch đệm: 0,1 M NaCl; 0,1 M glycine; pH = 10 và tiếp tục ủ 15 phút. Mật độ quang (optical density) của mỗi giếng được đo bằng máy quang phổ nano (SPECTROstar^{nano}) ở bước sóng 570 nm. Tỷ lệ phần trăm tế bào sống so với đối chứng được tính theo công thức:

$$\% \text{ Tế bào sống so với đối chứng} = (\text{Mật độ quang giếng xử lý} / \text{mật độ quang giếng đối chứng}) \times 100$$

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

2.5. Phương pháp đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lên kiểu hình của tế bào

Tế bào nuôi cấy trong môi trường RPMI 16040 có bổ sung 10% huyết thanh bò và 1% hỗn hợp kháng sinh Penicillin/Streptomycin (10,000 đơn vị/mL Penicillin và 10,000 µg/mL Streptomycin) trong điều kiện 5% CO₂ ở 37°C. Sau 48 h nuôi cấy, tế bào được xử lý với dịch chiết cây Com ngui lông tại nồng độ tương ứng với giá trị IC₅₀ trong 48 h. Các tế bào đối chứng được nuôi cấy trong cùng điều kiện nhưng không bổ sung dịch chiết cây Com ngui lông. Sau khi xử lý, tế bào được rửa 2 lần bằng dung dịch đệm PBS. Sự thay đổi hình dạng tế bào được quan sát và chụp ảnh trên kính hiển vi soi ngược Ts2 (NIKON) ở độ phóng đại 200 lần. Các thay đổi về kiểu hình tế bào sẽ được quan sát đánh giá dưới kính hiển vi bao gồm thay đổi về kích thước tế bào, hình dạng tế bào và sự bám dính trên bề mặt nuôi cấy.

2.6. Phương pháp phân tích thống kê

Các thí nghiệm phân tích tăng sinh tế bào được tiến hành lặp lại 2 lần và mỗi nồng độ được tiến hành trên 4 giếng nuôi cấy. Phân tích giá trị khác biệt về mặt thống kê giữa các nhóm đối chứng và nhóm theo kiểm định Mann Whitney với giá trị $p \leq 0,05$, sử dụng phần mềm GraphPad Prism 5.0.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả thu thập và định loại mẫu vật

Mẫu cây thuốc sau khi được thu thập tại thôn Nà Chúa, xã Thuận Mang, huyện Ngân Sơn, tỉnh Bắc Kạn, tiến hành xử lý mẫu ngoài thực địa và xử lý tại phòng thí nghiệm được tiến hành định danh khoa học dựa trên các đặc điểm về hình thái của thân, rễ, lá, hoa, quả đối chiếu với các tài liệu phân loại về chi *Ardisia* đã xác định được loài Com ngui lông (*Ardisia villosa* Roxb.) (hình 1) và mẫu khô được lưu giữ tại phòng thí nghiệm.



Hình 1. Hình ảnh loài *Ardisia villosa* Roxb: mẫu tươi (trái) và tiêu bản mẫu khô (phải)

3.2. Kết quả định tính các thành phần trong cao chiết ethanol của loài *Ardisia villosa*

Để xác định thành phần các chất có trong cao chiết ethanol, chúng tôi tiến hành các phản ứng định tính. Kết quả trình bày trong bảng 1 cho thấy, cao chiết ethanol không có phản ứng rõ rệt với các thuốc thử Wagners và Dragendroff, đồng thời cho kết tủa màu kem với dung dịch HCl.

Bảng 1. Các thành phần trong cao chiết ethanol của loài *Ardisia villosa*

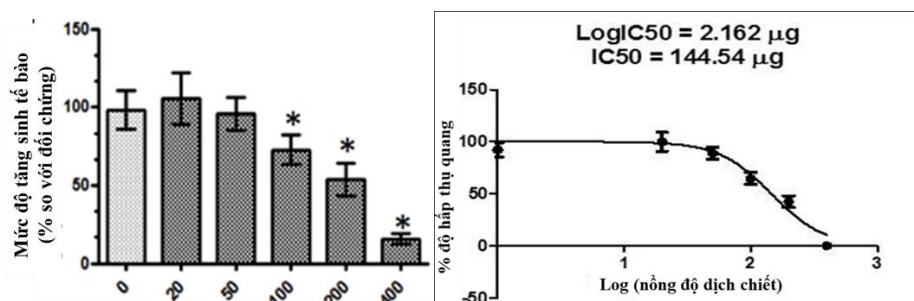
Nhóm chất	Thuốc thử cho phản ứng định tính	Hiện tượng	Kết luận
Alkaloid	HCl 1%	Kết tủa	Không có alkaloid
	Mayers	Màu kem	
	Wagners	Có dấu hiệu phản ứng	
	Dragendroff	Không rõ	
Flavonoid	NH ₃ loãng + H ₂ SO ₄	Xuất hiện màu vàng	Có flavonoid
Tannin	FeCl ₃	Xuất hiện màu xanh	Có tannin
Saponin	Pha loãng trong H ₂ O	Hình thành bọt	Có saponin
Terpenoid	CHCl ₃ + C ₂ H ₅ OH + H ₂ SO ₄	Hiện tượng không rõ	Không có terpenoid
Carbohydrate	Thuốc thử Fehling	Kết tủa đỏ	Có carbohydrate
Protein	HNO ₃ + C ₂ H ₅ OH	Xuất hiện màu vàng	Có protein

Kết quả này chỉ ra rằng, cao chiết ethanol của loài *Ardisia villosa* không chứa thành phần alkaloid. Tiếp theo, các phản ứng dương tính với dung dịch NH₃ và axit H₂SO₄ cho thấy cao chiết có chứa thành phần flavonoid. Bên cạnh đó, sự có mặt của tannin trong cao chiết cũng được chỉ ra dựa vào các phản ứng dương tính với FeCl₃ với sự xuất hiện màu xanh đen. Đáng chú ý, sự có mặt của saponin, một thành phần quan trọng thường được tìm thấy trong chi *Ardisia* đã được xác định thông qua đặc tính tạo bọt. Tuy nhiên, kết quả bảng 1 cho thấy, không có thành phần terpenoid trong cao chiết ethanol của loài *Ardisia villosa*. Như vậy, với các phân tích định tính cho thấy, cao chiết ethanol từ lá cây Cơm nguội lông có chứa thành phần flavonoid, tannin, saponin, carbohydrate và các protein nhưng không có alkaloid và terpenoid. Các phân tích sâu hơn bằng sắc ký lỏng, khối phổ là cần thiết để xác định chính xác tên các hợp chất có trong loài thực vật này.

3.3. Ảnh hưởng của dịch chiết *Ardisia villosa* lên sự sinh trưởng của tế bào ung thư dạ dày MKN45

Để đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết lên sự tăng trưởng của tế bào ung thư dạ dày được tiến hành xử lý ở 5 nồng độ khác nhau trong 48 h. Kết quả được đánh giá khi kiểm tra ảnh hưởng của dịch chiết *Ardisia villosa* lên sự tăng sinh tế bào trong dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 bằng phương pháp MTT.

Kết quả ở hình 2 (phải) chỉ ra rằng, dòng tế bào MKN45 bị ức chế tăng sinh bởi dịch chiết ethanol từ loài *Ardisia villosa* trong dải nồng độ nghiên cứu từ 0 đến 400 µg/mL. Nồng độ ức chế sự tăng trưởng được chỉ ra là từ 50 µg/mL. Ở nồng độ 100 µg/mL tỷ lệ tế bào sống chỉ là khoảng 30% so với đối chứng.



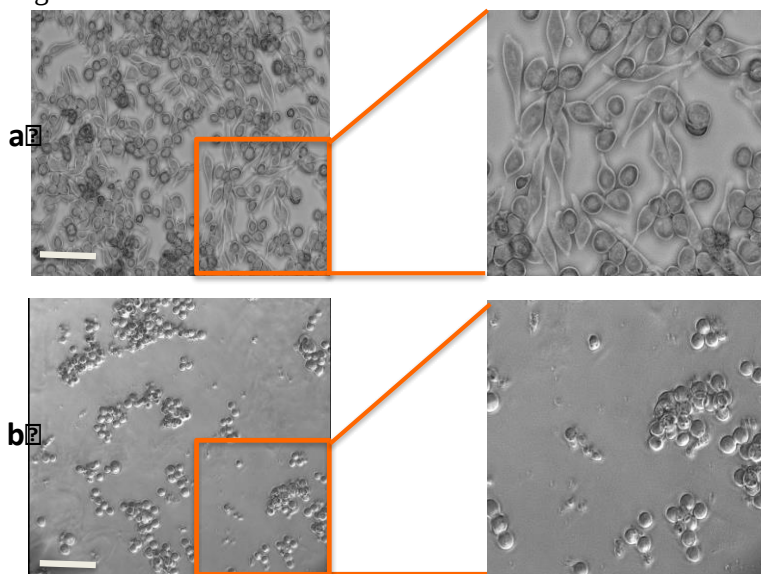
Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết *Ardisia villosa* lên sự sinh trưởng của tế bào ung thư dạ dày MKN45 (trái) và đồ thị xác định giá trị IC₅₀ của dịch chiết ethanol (phải), * P < 0,05.

Trên cơ sở ảnh hưởng của từng nồng độ tới sự tăng trưởng của tế bào MKN45, chúng tôi tính toán giá trị IC_{50} của dịch chiết ethanol từ cây *Ardisia villosa* (hình 2, trái) dựa vào phần mềm Graphad Primism 5.0. Kết quả trong hình 2 chỉ ra rằng, giá trị IC_{50} của dịch chiết ethanol của loài *Ardisia villosa* là 144,54 $\mu\text{g/mL}$.

Một số nghiên cứu trước đó chỉ ra rằng, loài dịch chiết methanol từ loài *Ardisia balansae* có giá trị IC_{50} dao động từ 54,22 – 77,68 $\mu\text{g/mL}$ trên các dòng tế bào ung thư vú, ung thư gan và ung thư phổi [9], trong khi đó dịch chiết methanol từ loài *Ardisia primulifolia* và *Ardisia maculosa* trong cùng chi này lại đều ghi nhận giá trị $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$. Nodin và cộng sự đã đánh giá tác dụng của dịch chiết methanol (80%) từ loài *Ardisia crispa* lên các dòng tế bào ung thư cổ tử cung 4T1, dòng tế bào NIH3T và đã cho thấy giá trị IC_{50} thu được tương ứng là 42,26 $\mu\text{g/mL}$ và 431,94 $\mu\text{g/mL}$. Trong khi đó, dịch chiết bằng Ethyl acetate có giá trị IC_{50} tương ứng với 2 dòng tế bào này là 52,41 $\mu\text{g/mL}$ và 50,21 $\mu\text{g/mL}$ đối với dòng NIH3T. Đối với dịch chiết bằng nước của loài này giá trị IC_{50} là 303,09 $\mu\text{g/mL}$ đối với dòng 4T1 và 236,42 $\mu\text{g/mL}$ đối với dòng NIH3T [11]. Như vậy có thể thấy, một số loài khác nhau thuộc chi *Ardisia* có mức độ tác động lên tế bào ung thư khác nhau là không giống nhau. Đồng thời trong cùng một loài, sử dụng các dung môi khác nhau có thể dẫn tới giá trị IC_{50} cũng khác nhau. Nghiên cứu của chúng tôi sử dụng dung môi Ethanol ít độc hơn so với Methanol nhưng cũng thu được giá trị IC_{50} đối với dòng tế bào ung thư dạ dày MKN45 ở mức 144,54 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. Ảnh hưởng của dịch chiết *Ardisia villosa* lên hình thái nuôi cấy của tế bào MKN45

Để đánh giá ảnh hưởng của dịch chiết ethanol từ loài *Ardisia villosa* lên kiểu hình tế bào MKN45, các tế bào nuôi cấy được xử lý trong 48 h ở nồng độ tương ứng của giá trị IC_{50} . Kết quả được trình bày trong hình 3.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết ethanol lên hình thái tế bào ung thư dạ dày MKN45: (a) Đối chứng và (b) Tế bào được xử lý với cao chiết từ lá cây *Ardisia villosa* ở nồng độ IC_{50}

Kết quả cho thấy, đã có sự thay đổi hình thái của tế bào được xử lý (Hình 3b) so với đối chứng (Hình 3a). Hình 3a cho thấy, tế bào đối chứng có hình thoi và phân bố đồng đều và bám dính tốt trên bề mặt nuôi cấy. Trong khi đó các tế bào được xử lý với dịch chiết từ cây *Ardisia villosa* đã có kiểu hình biến đổi thành dạng hình tròn, phân bố thưa thớt và không đồng đều trên bề mặt đĩa nuôi cấy. Mặt khác, dưới kính hiển vi soi ngược cho thấy, một số tế bào có xu hướng mất khả năng bám dính trên bề mặt đĩa và trôi nổi trong dịch nuôi cấy và một số tế bào kích

thước nhỏ xuất hiện tương ứng với tế bào chết. Điều này chỉ ra rằng, kiểu hình thông thường của tế bào đã bị biến đổi sau xử lý và sự thay đổi có liên quan tới đặc tính phân chia, tăng sinh của tế bào. So với các tế bào bình thường thì các tế bào ung thư thường có cơ chế thoát khỏi quá trình apoptosis, giúp tế bào kéo dài sự sống và tăng khả năng phân chia. Một trong những cơ chế quan trọng của các thuốc điều trị ung thư là khả năng thúc đẩy lại quá trình apoptosis của tế bào. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, dịch chiết từ một số loài thuộc chi *Ardisia* có khả năng cảm ứng apoptosis đối với các dòng tế bào ung thư vú thông qua sự tăng cường biểu hiện của các protein caspase 8 và caspase 3 [11]. Bên cạnh đó, các protein thụ thể của tế bào chết gồm Fas/FasL, TNFR1 và DR5 cũng được biểu lộ tăng sau khi tế bào xử lý với dịch chiết chứa saponin từ cây *Ardisia gigantifolia* Stapf [16]. Trong nghiên cứu này, bước đầu chúng tôi đã chỉ ra sự biến đổi kiểu nhân của một tế bào bình thường thành kiểu nhân đặc trưng của apoptosis sau khi xử lý với dịch chiết ethanol chứa saponin từ loài *Ardisia villosa*. Kết quả này cho thấy tiềm năng kháng ung thư từ loài này là có cơ sở. Đây sẽ là tiền đề cho việc phát triển các nghiên cứu sâu hơn để làm rõ sự ảnh hưởng của chúng lên các gen liên quan tới quá trình apoptosis của tế bào sau xử lý.

4. Kết luận

Đã tiến hành thu thập mẫu vật, định loại loài Cơm nguội lông (*Ardisia villosa* Roxb.) và thu được cao chiết ethanol từ loài *Ardisia villosa* với tỷ lệ 10%. Kết quả định tính dịch chiết ethanol của loài *Ardisia villosa* chứa saponin, tanin nhưng không chứa triterpenoid và alkaloid. Dịch chiết ethanol của loài *Ardisia villosa* có khả năng ức chế sự tăng sinh làm thay đổi kiểu hình của tế bào ung thư dạ dày dòng MKN45. Giá trị IC_{50} được xác định là 144,54 $\mu\text{g/mL}$. Nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, *Ardisia villosa* có tiềm năng ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư dạ dày.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] H. Sung *et al.*, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries," *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209-249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] D. Yang *et al.*, "Survival of metastatic gastric cancer: Significance of age, sex and race/ethnicity," *J Gastrointest Oncol*, vol. 2, no. 2, pp. 77-84, Jun. 2011, doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2010.025.
- [3] J. L. Leiting and T. E. Grotz, "Advancements and challenges in treating advanced gastric cancer in the West," *WJGO*, vol. 11, no. 9, pp. 652-664, Sep. 2019, doi: 10.4251/wjgo.v11.i9.652.
- [4] J. Nie *et al.*, "Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer," *Biomed Rep*, vol. 4, no. 1, pp. 3-14, Jan. 2016, doi: 10.3892/br.2015.537.
- [5] Y. K. Lee, K. Bae, H.-S. Yoo, and S.-H. Cho, "Benefit of Adjuvant Traditional Herbal Medicine With Chemotherapy for Resectable Gastric Cancer," *Integr Cancer Ther*, vol. 17, no. 3, pp. 619-627, Sep. 2018, doi: 10.1177/1534735417753542.
- [6] E. G. de Mejía and M. V. Ramírez-Mares, "*Ardisia*: health-promoting properties and toxicity of phytochemicals and extracts," *Toxicology Mechanisms and Methods*, vol. 21, no. 9, pp. 667-674, Nov. 2011, doi: 10.3109/15376516.2011.601355.
- [7] H. Kobayashi and E. de Mejía, "The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 96, no. 3, pp. 347-354, Jan. 2005, doi: 10.1016/j.jep.2004.09.037.
- [8] N. M. Al-Abd *et al.*, "Phytochemical constituents, antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of *Ardisia elliptica*," *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 7, no. 6, pp. 569-576, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.apjtb.2017.05.010.
- [9] A. V. Trinh, T. H. V. Nguyen, T. T. Do, T. N. H. Tran, A. T. Nguyen, and Q. L. Pham, "Antifungal, antibacterial and cytotoxic activities of some *Ardisia* species from Vietnam," *V J Bio*, vol. 38, no. 1, pp. 75-80, Jan. 2016, doi: 10.15625/0866-7160/v38n1.6232.
- [10] R. Hamid, Y. Ting, F. Othman, and H. Sulaiman, "Anti-tumor effect of *Ardisia crispa* hexane fraction on 7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced mouse skin papillomagenesis," *J Can Res Ther*, vol. 8, no. 3, p. 404, 2012, doi: 10.4103/0973-1482.103521.

-
- [11] M. L. Nordin, A. Abdul Kadir, Z. A. Zakaria, F. Othman, R. Abdullah, and M. N. H. Abdullah, "Cytotoxicity and Apoptosis Induction of *Ardisia crispa* and Its Solvent Partitions against *Mus musculus* Mammary Carcinoma Cell Line (4T1)," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, pp. 1-10, 2017, doi: 10.1155/2017/9368079.
- [12] L. Wen Jun, C. Pit Foong, and R. Abd Hamid, "Ardisia crispa root hexane fraction suppressed angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and in vivo zebrafish embryo model," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 118, p. 109221, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109221.
- [13] N. T. Nguyen, *Research Methods in Plant Sciences*. Hanoi National University Publishing House, 2007.
- [14] T. K. L. Tran, *Flora of Vietnam – volume 4*, Myrsinaceae R.Br. Hanoi Science and Technology Publishing House, 2000.
- [15] S. Sasidharan, Y. Chen, D. Saravanan, K. M. Sundram, and L. Yoga Latha, "Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts," *Afr J Tradit Complement Altern Med*, vol. 8, no. 1, pp. 1-10, 2011.
- [16] L.-H. Mu *et al.*, "AG36 Inhibits Human Breast Cancer Cells Proliferation by Promotion of Apoptosis In vitro and In vivo," *Front Pharmacol*, vol. 8, p. 15, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00015.