

CYTOTOXIC EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF *FICUS PUMILA* LEAVES ON MCF7 BREAST CANCER CELLS

Nguyen Phu Hung*, Nguyen Thi Huong

TNU - University of Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 21/6/2021 Revised: 15/7/2021 Published: 28/7/2021	Breast cancer is one of the most prevalent malignancies in females worldwide. It causes a significant health care burden in both developed and developing countries. Herbal medicines are attracting the attention of the scientific community towards the new treatment of breast cancer. <i>Ficus pumila</i> is a creeping fig in the mulberry family and knows as many effects in medical uses. This study is aimed to evaluate the cytotoxic effect of Ethanol extract of <i>Ficus pumila</i> on MCF7 breast cancer cells. This finding showed that the extract inhibited the proliferation of the breast cancer cells in a dose-dependent manner, with the IC_{50} value was 0.29 mg/mL after 48h incubation. Flow cytometry analysis showed that <i>Ficus pumila</i> ethanol extract arrested cell cycle at G2/M phase caused the cytotoxic effect, therefore caused apoptosis. Thus, <i>Ficus pumila</i> may be considered a good candidate to against breast cancer cells.
KEYWORDS Apoptosis Breast cancer <i>Ficus pumila</i> Herbal medicines Cell cycle MCF7	

TÁC ĐỘNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA CAO CHIẾT ETHANOL TỪ CÂY TRÂU CỎ (*FICUS PUMILA*) LÊN TẾ BÀO UNG THƯ VÚ MCF7

Nguyễn Phú Hùng*, Nguyễn Thị Hương

Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 21/6/2021 Ngày hoàn thiện: 15/7/2021 Ngày đăng: 28/7/2021	Ung thư vú là một trong những bệnh ác tính phổ biến nhất ở phụ nữ trên thế giới. Nó gây ra gánh nặng chăm sóc sức khỏe đáng kể ở cả các nước phát triển và đang phát triển. Thuốc thảo dược đang thu hút sự quan tâm của giới khoa học nhằm hướng tới phương pháp điều trị mới cho bệnh ung thư vú. Cây Trâu cỏ (<i>Ficus pumila</i>) là một loài cây thuộc chi <i>Ficus</i>, họ Dâu tằm (Moraceae) và được biết đến là có nhiều tác dụng trong y học. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác dụng gây độc tế bào của chiết xuất ethanol của cây Trâu cỏ với dòng tế bào ung thư vú MCF7. Dữ liệu thu được trong nghiên cứu này đã chỉ ra rằng, chiết từ cây Trâu cỏ gây ức chế sự tăng sinh của tế bào phụ thuộc vào liều lượng cao chiết, với giá trị IC_{50} là 0,29 mg/mL sau 48h nuôi cấy. Kết quả phân tích Flow cytometry cho thấy, cao chiết ethanol từ cây Trâu cỏ làm dừng sự phân chia của chu kỳ tế bào tại pha G2/M, gây độc cho tế bào, do đó gây ra apoptosis ở tế bào MCF7. Vì vậy, Trâu cỏ (<i>Ficus pumila</i>) có thể được coi là loại dược liệu tiềm năng để phát triển chống lại tế bào ung thư vú.
TỪ KHÓA Apoptosis Ung thư vú Trâu cỏ Cây thuốc Chu kỳ tế bào MCF7	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.4671>

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

1. Giới thiệu

Ung thư vú là nguyên nhân chính gây tử vong cho phụ nữ trên toàn thế giới [1]. Theo thống kê của Hiệp hội ung thư Hoa Kỳ năm 2018 cho thấy, khoảng 30% tổng số ca ung thư mới ở phụ nữ là ung thư vú [2]. Cùng với đó, thống kê của Tổ chức Y tế thế giới cũng cho thấy, cứ 8 phụ nữ sẽ có một người phát triển ung thư vú trong suốt cuộc đời của họ và tỷ lệ mắc vẫn đang tiếp tục tăng lên [3], [4]. Có nhiều phương pháp điều trị ung thư vú khác nhau như phẫu thuật, xạ trị, liệu pháp hormone, hóa trị liệu. Tuy nhiên, bên cạnh những giá trị tích cực đã được ghi nhận trong điều trị thì những liệu pháp này vẫn tồn tại những hạn chế như tái phát sau điều trị, kháng thuốc, kháng xạ trị hay các tác dụng phụ không mong muốn khác. Do vậy, những nghiên cứu về thuốc mới hoặc các dược phẩm hỗ trợ trong điều trị ung thư vú hiện nay rất được quan tâm và có triển vọng. Sự phát triển của ung thư vú cũng như các loại ung thư khác đều bắt nguồn từ những tổn thương DNA, biến đổi biểu sinh, hoặc những rối loạn sự hoạt động của các con đường tín hiệu trong tế bào mà điển hình phải kể đến là con đường apoptosis, chu kỳ tế bào. Những rối loạn này sẽ dẫn tới sự tăng sinh không kiểm soát của tế bào [5]. Do vậy, nghiên cứu, tìm kiếm nguồn thảo dược tiềm năng trong việc phát triển thuốc hoặc các dược phẩm hỗ trợ mới có khả năng gây độc với tế bào ung thư, nhằm vào con đường apoptosis và chu kỳ phân chia tế bào là hướng đang được quan tâm hiện nay. Đáng lưu ý, chiết xuất từ thảo dược có khả năng gây độc, dẫn tới gây chết với tế bào ung thư mà giảm các tác dụng phụ so với các thuốc chống ung thư đang sử dụng hiện nay cũng đã được báo cáo [6].

Cây Trâu cổ (*Ficus pumila*) là một loài thuộc chi *Ficus*, họ Dâu tằm (Moraceae), được tìm thấy ở Nhật Bản, Trung Quốc và một số nước Đông Nam Á [7]. Ở Việt Nam, Trâu cổ được tìm thấy ở một số tỉnh miền núi phía Bắc. Trâu cổ cũng được sử dụng như một loại thực phẩm chức năng lâu đời ở Đông Á, đặc biệt quả của nó được sử dụng như một thành phần của chế độ ăn kiêng [7]. Các hợp chất tự nhiên trong loài thảo dược này được biết đến là có nhiều tác dụng với sức khỏe con người bao gồm chống oxy hóa, chống viêm, kháng khuẩn, chống ung thư, hạ đường huyết, bảo vệ đường tiêu hóa và bảo vệ tim mạch [8], [9]. Dược tính của cây Trâu cổ có được là do có chứa các hợp chất như flavonoid, terpenoid và steroid [10]. Nghiên cứu của Christopher và cộng sự đã chỉ ra rằng, chiết xuất từ lá và thân cây Trâu cổ khả năng chống lại ung thư bạch cầu do có chứa các hợp chất hydroethanolic và phytochemical bao gồm tannin, saponin, glycoside, alkaloid, flavonoid, triterpenes và sterol [11]. Đặc biệt, với hoạt tính chống oxy hóa mạnh, Trâu cổ được biết đến là một trong những thảo dược tiềm năng trong điều trị một số loại ung thư khác nhau [7]. Tuy nhiên, những nghiên cứu cụ thể về dược tính của Trâu cổ thu thập tại Việt Nam trên tế bào ung thư, đặc biệt là ung thư vú còn hạn chế. Nghiên cứu này nhằm đánh giá tác động gây độc của cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ lên sự tăng sinh ở dòng tế bào ung thư vú MCF7 cũng như ảnh hưởng của nó lên chu kỳ tế bào và apoptosis.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Dòng tế bào và mẫu lá Trâu cổ

Dòng tế bào ung thư vú MCF7 do phòng thí nghiệm Inserm U1053 – Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia Pháp cung cấp.

Lá cây Trâu cổ được tiến hành thu thập tại huyện Đồng Hỷ, tỉnh Thái Nguyên tháng 11 năm 2020 (Hình 1); mẫu vật được lưu trữ tại phòng Thí nghiệm của trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên.

2.2. Chiết xuất cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ

Chiết xuất cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ được tiến hành như sau: Lá cây Trâu cổ sau khi thu thập được rửa sạch và tráng 2 lần bằng nước cất hai lần, sấy khô ở 50°C trong 48h, sau đó lá Trâu cổ khô được nghiền thành bột mịn. Bổ sung 30 mL ethanol nồng độ 95% vào 15g bột mịn lá và lắc ở 200 vòng/phút trong 24h. Cao chiết được lọc bằng giấy lọc Whatman (Merk, Đức). Sau đó cho bay hơi hoàn toàn ethanol ở nhiệt độ 40°C trong 24h. Phần cao chiết thu được đem cân và hòa tan trong DMSO trước khi sử dụng.



Hình 1. Cây Trâu cổ (*Ficus pumila*) thu nhận tại huyện Đồng Hỷ, Thái Nguyên

2.3. Phân tích sự tăng sinh tế bào bằng phương pháp MTT

Tế bào ung thư vú MCF7 được nuôi cấy trên đĩa 96 giếng với mật độ $5 \cdot 10^3$ tế bào/giếng, trong 100 μL môi trường RPMI 1640, có bổ sung 1% kháng sinh ampicillin/streptomycin và 10% huyết thanh bò (FBS) (tất cả đều được cung cấp bởi Invitrogen, Mỹ). Sau đó, tế bào được nuôi trong 48h ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 , độ ẩm 95%. Tiến hành xử lý tế bào với cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ theo các bước như sau: Loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ; rửa bề mặt đĩa nuôi cấy với đệm PBS (Phosphate Buffer Saline) 1X; bổ sung môi trường nuôi cấy mới chứa cao chiết có nồng độ lần lượt là 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 và 1 mg/mL. Tế bào sau khi xử lý tiếp tục được nuôi cấy trong điều kiện như trên. Sau 48h nuôi cấy, tế bào được chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược TS2 (NIKON, Nhật Bản) ở độ phóng đại 200 và 400 lần và tiến hành phân tích MTT.

Các bước phân tích MTT được tiến hành như sau: Loại bỏ toàn bộ môi trường nuôi cấy cũ, bổ sung 100 μL môi trường nuôi cấy mới chứa 10% MTT (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid do Sigma Aldrich cung cấp) nồng độ 5 mg/mL và ủ đĩa nuôi cấy ở 37°C trong 4h trong điều kiện tối. Sau đó, tiến hành loại bỏ môi trường nuôi cấy chứa MTT và bổ sung 100 μL DMSO/giếng. 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). Tỷ lệ tăng sinh của tế bào được tính theo công thức:

$$\% \text{ tăng sinh tế bào} = (\text{OD mẫu xử lý} / \text{OD đối chứng}) \cdot 100$$

Nồng độ ức chế 50% sự tăng sinh của tế bào (IC_{50}) được tính theo phần mềm GraphPad Prism 5.0 theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

2.4. Phân tích apoptosis và chu kỳ tế bào

Phân tích chu kỳ tế bào và apoptosis được thực hiện bằng phương pháp Flow cytometry theo Riccardi và Nicoletti [12]. Nuôi cấy 2×10^5 tế bào MCF7 trên đĩa 24 giếng. Sau khi tế bào đã đạt đến mật độ khoảng 30% diện tích của giếng thì tiến hành thay bằng môi trường mới chứa cao chiết của lá cây Trâu cổ ở nồng độ 0,1 và 0,5 mg/mL trong 48h ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Các tế bào được chụp ảnh dưới kính hiển vi soi ngược TS2 (NIKON, Nhật Bản) ở độ phóng đại 200 và 400 lần.

Sau đó thu nhận lại tế bào 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 (BD Biosciences, EU).

2.5. 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, $P < 0,05$.

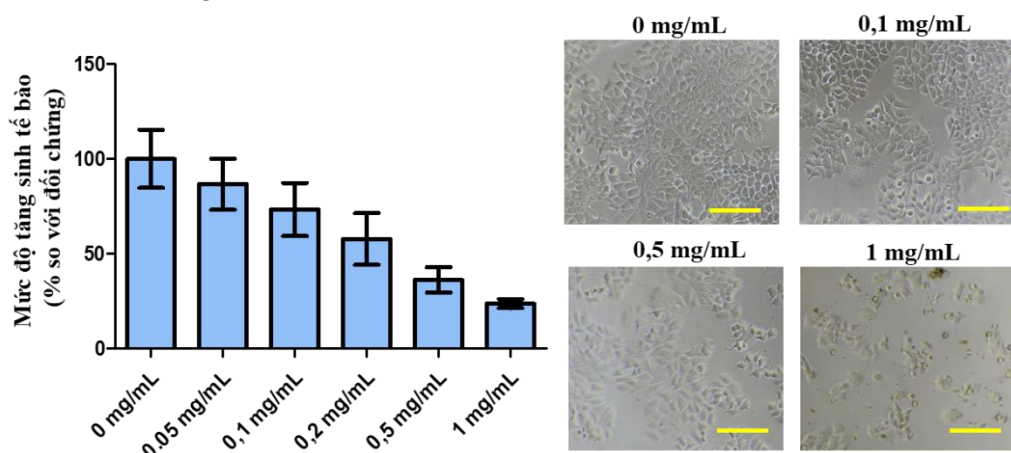
3. Kết quả và bàn luận

3.1. Cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ làm giảm sự tăng sinh của tế bào ung thư vú MCF7

Để nghiên cứu ảnh hưởng của cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ đến sự tăng sinh của tế bào MCF7, tế bào được nuôi cấy trong môi trường có chứa cao chiết với nồng độ từ 0,05 – 1 mg/mL. Kết quả chỉ ra trong Hình 2 cho thấy, cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ đã ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư ngay với nồng độ cao chiết là 0,05 mg/mL. Sự tăng lên của nồng độ cao chiết từ 0,1 mg/mL đã tăng cường ảnh hưởng ức chế sự tăng sinh đối với các tế bào ung thư này. Tại nồng độ 0,5 mg/mL thì tỉ lệ tăng sinh của tế bào chỉ đạt 40% so với đối chứng (2A), mật độ tế bào đã giảm rõ rệt khi quan sát dưới kính hiển vi (2B). Với nồng độ cao chiết 1 mg/mL thì tỷ lệ tế bào còn sống sót chỉ còn dưới 30%. Nghiên cứu này đã cho thấy, cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ có tác dụng ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư vú MCF7, với mức độ ức chế tùy thuộc vào nồng độ cao chiết. Giá trị IC_{50} của cao chiết ethanol của lá Trâu cổ đối với dòng tế bào ung thư vú sau 48h đã được tính toán đối với dòng tế bào ung thư là 0,29 mg/mL.

Theo nghiên cứu của Larbie và cộng sự, cao chiết xuất thô từ cây *Ficus pumila* gây độc và ức chế tăng sinh với dòng tế bào ung thư bạch cầu ở người MT-4 với giá trị IC_{50} là 131 μ g/mL. Tác động gây độc tế bào của cao chiết tăng lên khi chiết xuất cây *Ficus pumila* với chloroform và butanol với IC_{50} giá trị lần lượt là 23 μ g/mL và 26 μ g/mL [11]. Bên cạnh đó, nghiên cứu của Bai và cộng sự cho thấy, cây Trâu cổ có chứa các hợp chất dehydrovomifoliol và (E)-3-oxoretro-a-ionol. Các hợp chất này có hoạt tính gây độc tế bào, gây ức chế tăng sinh ở dòng tế bào ung thư A549, giá trị IC_{50} tương ứng là 33,70 μ g/mL [12].

Từ những nghiên cứu về cây Trâu cổ cho thấy, cao chiết từ lá cây Trâu cổ có thể gây ức chế tăng sinh đối với nhiều dòng ung thư vú khác nhau ở mức độ khác nhau, tùy thuộc vào dung môi chiết xuất và liều lượng cao chiết.

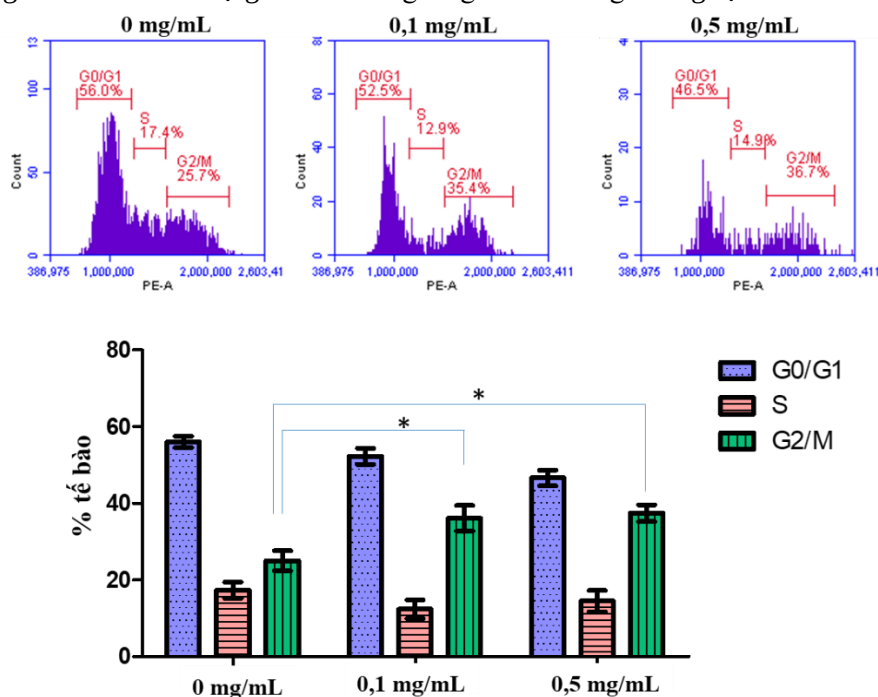


Hình 2. Ảnh hưởng của cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ lên sự tăng sinh của tế bào ung thư vú MCF7. (A) Tỷ lệ tăng sinh của tế bào MCF7; (B) hình ảnh tế bào MCF7 được xử lý bằng cao chiết ở các nồng độ khác nhau trong 48h. Hình ảnh được chụp dưới kính hiển vi soi ngược NIKON Ts2 ở độ phóng đại 200 lần, $n = 5$; $*P < 0,05$. Thang đo: 50 μ m.

3.2. Tác động của cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ lên các pha của chu kỳ tế bào

Để đánh giá tác động của cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ tới sự phân bố trong các pha của chu kỳ tế bào đối với dòng MCF7, tế bào được nuôi cấy và xử lý với cao chiết nồng độ 0,1 và 0,5 mg/mL, đây là hai nồng độ nằm giữa trong dãy nồng độ đã được thử nghiệm. Kết quả phân tích bằng phương pháp Flow cytometry thể hiện trên Hình 3. Tác động của cao chiết gây ra sự thay đổi về tỷ lệ tế bào trong các pha của chu kỳ tế bào ngay ở nồng độ cao chiết là 0,1 mg/mL (3A).

Với nồng độ này, tỷ lệ tế bào ở pha G0/G1 đã giảm và pha G2/M tăng lên rõ rệt là 35,4% so với đối chứng là 25,7% ($P < 0,05$ so với đối chứng (0 mg/mL)). Tại nồng độ 0,5 mg/mL của cao chiết, tỷ lệ tế bào pha G2/M là 36,7%, không tăng nhiều so với nồng độ 0,1 mg/mL, nhưng tăng rõ rệt so với đối chứng ($P < 0,05$). Như vậy có thể thấy rằng, cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ làm dừng chu kỳ phân chia tế bào tại pha G2/M đối với dòng tế bào MCF7, dẫn đến sự tích tụ tế bào ở pha này. Sự kéo dài thời gian tế bào, hay dừng chu kỳ phân chia tế bào ở pha G2/M cũng đã được chứng minh là dẫn tới sự giảm khả năng tăng sinh và tăng cường sự chết của tế bào [13].



Hình 3. Tác động của cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ lên chu kỳ phân chia của tế bào MCF7. (A, B) Tỷ lệ tế bào trong các pha của chu kỳ tế bào sau 48h xử lý với cao chiết được phân tích chu kỳ tế bào bằng Flow cytometry, $n = 3$; * $P < 0,05$.

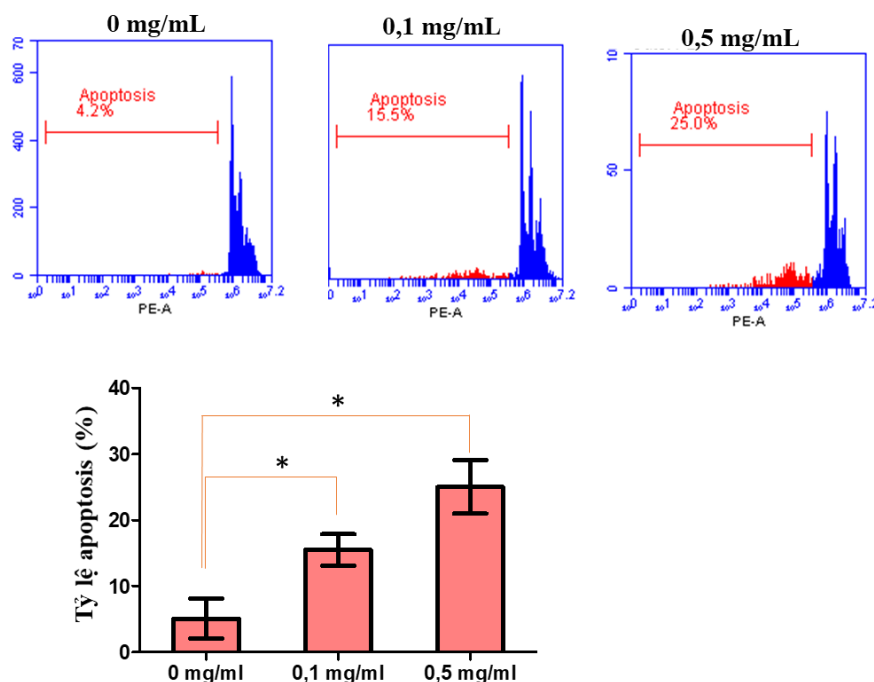
Theo nghiên cứu Mohammad và cộng sự (2019) đã cho thấy, chiết xuất methanol từ cây Dừa cạn (*Catharanthus roseus*) gây tích tụ tế bào ở pha G2/M, do đó gây độc và ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư vú MCF7 [14]. Chiết xuất methanol từ hoa của cây *Allium atrovioleaceum* cũng được nghiên cứu là gây dừng chu kỳ tế bào ở pha G2/M, dẫn đến ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư vú MCF7 [15]. Nghiên cứu này cũng đã xác định được rằng, cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ đã ức chế tăng sinh của dòng tế bào ung thư vú MCF7 do dừng chu kỳ phân chia ở pha G2/M.

3.3. Cao chiết ethanol từ lá cây Trâu cổ gây apoptosis đối với tế bào MCF7

Để nghiên cứu ảnh hưởng của cao chiết ethanol từ cây Trâu cổ lên quá trình apoptosis của tế bào MCF7, các tế bào ung thư được nuôi cấy và xử lý với cao chiết nồng độ 0,1 và 0,5 mg/mL. Sau đó, tế bào được nhuộm với thuốc nhuộm nhân Propidium Iodide và phân tích bằng phương pháp Flow cytometry. Hình ảnh phân tích Flow cytometry (Hình 4) cho thấy rằng, với tế bào được bổ sung cao chiết đã xuất hiện quần thể nằm tách rời khỏi các tế bào có kiểu hình bình thường của chu kỳ phân bào, đó là quần thể phụ (subG1) gồm các tế bào có kiểu hình apoptosis. Kết quả phân tích cho thấy, tác động gây độc dẫn tới sự chết tế bào ngay với nồng độ cao chiết là 0,1 mg/mL, có sự khác biệt rõ rệt so với tỷ lệ chết apoptosis ở mẫu đối chứng. Ở nồng độ này tỷ lệ tế bào chết đã tăng lên 15,5% so với đối chứng là 4,2% ($P < 0,05$). Tỷ lệ tế bào chết cũng tăng

rõ rệt lên 25% so với đối chứng, khi tăng nồng độ cao chiết lên 0,5 mg/mL ($P < 0,05$). Như vậy, cao chiết ethanol từ cây Trầu cổ đã có tác dụng gây độc, làm chết tế bào theo chương trình (apoptosis) đối với tế bào MCF7.

Theo một nghiên cứu trước đó của Handayani và cộng sự, chiết xuất từ cây Tầm bóp (*Physalis minima*) có tác động gây apoptosis, dẫn đến ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư vú MCF7 [16]. Bên cạnh đó, trong một công bố khác, Ramcharan và cộng sự đã cho thấy rằng, cao chiết từ cây Trầu cổ có tác động apoptosis ở dòng tế bào ung thư bạch cầu MT-4 [17]. Trong nghiên cứu, tùy thuộc vào nồng độ cao chiết ethanol từ cây Trầu cổ mà nó có ảnh hưởng khác nhau đến khả năng ức chế, gây độc đối với tế bào ung thư vú MCF7.



Hình 4. Tác động của cao chiết ethanol từ lá cây Trầu cổ lên apoptosis của tế bào MCF7. Tế bào sau 48h xử lý với cao chiết ethanol được phân tích apoptosis bằng Flow cytometry, $n = 3$; $*P < 0,05$

4. Kết luận

Cao chiết ethanol từ lá của cây Trầu cổ có tác dụng ngăn cản sự gia tăng về số lượng, làm dừng chu kỳ phân chia tế bào ở pha G2/M, đồng thời gây apoptosis với mức độ khác nhau tùy thuộc vào nồng độ. Nghiên cứu này đã cho thấy rằng, cây Trầu cổ là một thảo dược tiềm năng cho việc tiếp tục nghiên cứu phát triển các dược phẩm chống lại tế bào ung thư vú.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] J. Ferlay *et al.*, "Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012: Globocan 2012," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. E359-E386, Mar. 2015, doi: 10.1002/ijc.29210.
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 68, no. 1, pp. 7-30, Jan. 2018, doi: 10.3322/caac.21442.
- [3] R. L. Siegel, K. D. Miller, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 66, no. 1, pp. 7-30, Jan. 2016, doi: 10.3322/caac.21332.
- [4] F. Bray, A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay, and D. Forman, "Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study," *The Lancet Oncology*, vol. 13, no. 8, pp. 790-801, Aug. 2012, doi: 10.1016/S1470-2045(12)70211-5.

- [5] L. Ji, Y. Chen, T. Liu, and Z. Wang, "Involvement of Bcl-xL degradation and mitochondrial-mediated apoptotic pathway in pyrrolizidine alkaloids-induced apoptosis in hepatocytes," *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 231, no. 3, pp. 393-400, Sep. 2008, doi: 10.1016/j.taap.2008.05.015.
- [6] M. M. Rahman and Md. A. Khan, "Anti-cancer potential of South Asian plants," *Nat. Prod. Bioprospect.*, vol. 3, no. 3, pp. 74-88, Jun. 2013, doi: 10.1007/s13659-013-0027-6.
- [7] C. N. A. Leong, M. Tako, I. Hanashiro, and H. Tamaki, "Antioxidant flavonoid glycosides from the leaves of *Ficus pumila* L.," *Food Chemistry*, vol. 109, no. 2, pp. 415-420, Jul. 2008, doi: 10.1016/j.foodchem.2007.12.069.
- [8] S. B. Badgajar, V. V. Patel, A. H. Bandivdekar, and R. T. Mahajan, "Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Ficus carica*: A review," *Pharmaceutical Biology*, vol. 52, no. 11, pp. 1487-1503, Nov. 2014, doi: 10.3109/13880209.2014.892515.
- [9] N. Jaradat, "Phytochemistry, traditional uses and biological effects of the desert plant *Styrax officinalis* L.," *Journal of Arid Environments*, vol. 182, p. 104253, Nov. 2020, doi: 10.1016/j.jaridenv.2020.104253.
- [10] Z.-Y. Qi, J.-Y. Zhao, F.-J. Lin, W.-L. Zhou, and R.-Y. Gan, "Bioactive Compounds, Therapeutic Activities, and Applications of *Ficus pumila* L.," *Agronomy*, vol. 11, no. 1, p. 89, Jan. 2021, doi: 10.3390/agronomy11010089.
- [11] C. Larbie *et al.*, "Anti-proliferative effect of *Ficus pumila* Linn. on human leukemic cell lines," *Int J Basic Clin Pharmacol*, vol. 4, no. 2, pp. 330-336, 2015, doi: 10.5455/2319-2003.ijbcp20150434.
- [12] M. Bai *et al.*, "A new norisoprenoid from the leaves of *Ficus pumila*," *Natural Product Research*, vol. 33, no. 9, pp. 1292-1297, May 2019, doi: 10.1080/14786419.2018.1471077.
- [13] A. K. Tyagi, R. P. Singh, C. Agarwal, D. C. F. Chan, and R. Agarwal, "Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth Inhibition, G2-M arrest, and apoptosis," *Clin Cancer Res*, vol. 8, no. 11, pp. 3512-3519, Nov. 2002.
- [14] M. H. Rezadoost, H. H. Kumleh, and A. Ghasempour, "Cytotoxicity and apoptosis induction in breast cancer, skin cancer and glioblastoma cells by plant extracts," *Mol Biol Rep*, vol. 46, no. 5, pp. 5131-5142, Oct. 2019, doi: 10.1007/s11033-019-04970-w.
- [15] S. Khazaei *et al.*, "Cytotoxicity and Proapoptotic Effects of *Allium atrovioleaceum* Flower Extract by Modulating Cell Cycle Arrest and Caspase-Dependent and p53 -Independent Pathway in Breast Cancer Cell Lines," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2017, pp. 1-16, 2017, doi: 10.1155/2017/1468957.
- [16] H. Handayani, R. Handajani, I. Susilo, A. Basori, and H. M. Salim, "Apoptotic effect of *Physalis minima* Linn ethanol extract on breast cancer cells via p53 wild-type and Apaf-1 protein," *Trop. J. Pharm Res*, vol. 19, no. 10, pp. 2085-2089, Nov. 2020, doi: 10.4314/tjpr.v19i10.10.
- [17] G. Ramcharan, Y. N. Clement, and A. R. Maxwell, "Cytotoxic activity of selected West Indian medicinal plants against a human leukaemia cell line," *West Indian Med J*, vol. 59, no. 6, pp. 597-601, Dec. 2010.