

THE EFFECTS ON PROLIFERATION, CELLULAR NUCLEAR MORPHOLOGY OF AGS GASTRIC CANCER CELL LINE BY EXTRACT OF CERTAIN MEDICINAL PLANTS OF RED DAO PEOPLE IN TA PHIN, SAPA, LAO CAI

Le Thi Thanh Huong^{1*}, Vu Ngoc Duong¹, Mai Van Linh², Nguyen Van Tuan²
Hua Nguyen Mai¹, Ngo Duc Phuong³, Nguyen Phu Hung^{1,2}

¹TNU - University of Sciences, ²TNU - Center for Interdisciplinary Science and Education

³Institute of Medicinal Plant Sciences

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 05/6/2023	<i>Sambucus simsonii</i> Rehd, <i>Clematis brevicaudata</i> DC., <i>Euodia lepta</i> (Spreng) Merr., and <i>Hedyotis capitellata</i> Wall. ex G. Don. var. <i>mollis</i> (Pierre ex Pit.) are commonly used medicinal plants in the traditional herbal remedies of the Red Dao ethnic group. In this study, leaf samples of the four herb species were collected, classified, extracted, and evaluated for their impact on cell division using MTT assay, as well as on cell morphology using DAPI staining method. The experiments were conducted on the gastric cancer cell line AGS. The research results showed that <i>Sambucus simsonii</i> Rehd exhibited the strongest inhibitory effect with an IC ₅₀ value of 8.21 µg/mL. <i>Hedyotis capitellata</i> Wall. ex G. Don. var. <i>mollis</i> (Pierre ex Pit.), <i>Euodia lepta</i> (Spreng) Merr., and <i>Clematis brevicaudata</i> DC. had IC ₅₀ values of 26.06 µg/mL, 31.0 µg/mL, and 52.45 µg/mL, respectively. The extracts from all four herbal medicines were able to induce changes in cell morphology and nuclear morphology. The extracts from these herbal medicines induced the formation of apoptotic cell morphology, leading to programmed cell death in the AGS gastric cancer cells under different culture conditions. This research result showed that all four herb species used by the Red Dao people in this study have potential to inhibit AGS gastric cancer.
Revised: 23/6/2023	
Published: 23/6/2023	
KEYWORDS	
Gastric cancer	
Red Dao	
Ta Phin	
Cell proliferation	
Apoptosis	

TÁC ĐỘNG LÊN SỰ TĂNG SINH, KIỂU HÌNH NHÂN TẾ BÀO UNG THƯ DẠ DÀY DÒNG AGS BỞI DỊCH CHIẾT CỦA MỘT SỐ CÂY THUỐC CỦA NGƯỜI DAO ĐỎ Ở TẢ PHÌN, SAPA, LÀO CAI

Lê Thị Thanh Hương^{1*}, Vũ Ngọc Dương¹, Mai Văn Linh², Nguyễn Văn Tuấn²
Hứa Nguyệt Mai¹, Ngô Đức Phương³, Nguyễn Phú Hùng^{1,2}

¹Trường Đại học Khoa học - ĐH Thái Nguyên, ²Trung tâm Khoa học và Giáo dục liên ngành - ĐH Thái Nguyên

³Viện Khoa học Thuốc nam

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 05/6/2023	Cơm cháy tròn, Hoa ông lão, Ba chạc và Dạ cẩm là các cây thuốc được sử dụng phổ biến trong các bài thuốc cổ truyền của dân tộc Dao đỏ. Trong nghiên cứu này, mẫu lá của bốn loại thảo dược đã được thu thập và định loại, thu dịch chiết và đánh giá tác động lên sự phân chia tế bào bằng sàng lọc MTT, lên kiểu hình nhân tế bào bằng phương pháp nhuộm với thuốc nhuộm DAPI. Các phân tích được tiến hành trên dòng tế bào ung thư dạ dày AGS. Kết quả nghiên cứu cho thấy, Cơm cháy tròn có khả năng ức chế mạnh nhất với giá trị IC ₅₀ là 8,21 µg/mL; Tiếp theo là Dạ cẩm, Ba chạc và Hoa ông lão có giá trị IC ₅₀ lần lượt là 10,2 µg/mL; 26,06 µg/mL và 52,45 µg/mL. Dịch chiết từ cả bốn loại thảo dược đều có khả năng làm thay đổi hình thái tế bào và kiểu nhân tế bào. Dịch chiết từ các loài thảo dược đã cảm ứng sự hình thành kiểu hình nhân apoptosis, gây chết theo chương trình đối với tế bào ung thư dạ dày AGS trong điều kiện nuôi cấy ở các mức độ khác nhau. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, cả bốn loại thảo dược của người Dao đỏ được sử dụng trong nghiên cứu này đều có tiềm năng chống lại tế bào ung thư dạ dày AGS.
Ngày hoàn thiện: 23/6/2023	
Ngày đăng: 23/6/2023	
TỪ KHÓA	
Ung thư dạ dày	
Dao đỏ	
Tả Phìn	
Tăng sinh tế bào	
Apoptosis	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.8070>

* Corresponding author. Email: huonglth@tnu.edu.vn

1. Giới thiệu

Ung thư là bệnh lý phức tạp do sự tích lũy của các đột biến gene khác nhau. Tế bào ung thư được đặc trưng bởi tăng sinh mất kiểm soát, rối loạn chu kỳ phân chia tế bào và khả năng di căn [1].

Theo thống kê của Globocan năm 2020, trên thế giới đã có gần 1,1 triệu ca mắc ung thư dạ dày mới được phát hiện và 770.000 ca tử vong do loại ung thư này. Cơ quan Nghiên cứu Ung thư Quốc tế (IARC) dự đoán có khoảng 1,3 triệu ca tử vong vào năm 2040 [2]. Tình trạng nhiễm khuẩn *Helicobacter pylori*, chế độ ăn uống và yếu tố di truyền là những yếu tố được quan tâm trong chẩn đoán tiên tri ung thư dạ dày. Trong khi các phương pháp phẫu thuật mới cho phép cắt bỏ chính xác và gây ít tổn thương hơn cho các mô xung quanh thì hóa chất dùng trong hóa trị chưa có nhiều đột phá trong một thời gian dài [3].

Thực vật là một nguồn cung cấp phong phú các hợp chất tự nhiên để sàng lọc sử dụng trong điều trị bệnh nói chung và ung thư nói riêng. Thống kê cho thấy hầu hết các thuốc đang sử dụng hiện nay có nguồn gốc từ thực vật hoặc được phát hiện ở thực vật. Các hợp chất tách chiết từ thực vật có ưu điểm nổi trội trong tác động có chọn lọc và ít gây độc cho các tế bào bình thường [4]. Cơm cháy tròn (*Sambucus simsponii* Rehd), Hoa ông lão (*Clematis brevicaudata* DC.), Ba chạc (*Euodia lepta* (Spreng) Merr.) và Dạ cẩm (*Hedyotis capitellata* Wall. ex G. Don. var. *mollis* (Pierre ex Pit.)) là những cây thuốc được phân bố ở các khu vực khác nhau trên thế giới, phổ biến ở Đông Bắc Á và được ghi nhận là những thảo dược có khả năng kháng viêm và chống lại virus và vi khuẩn [5]-[9]. Tại Việt Nam, các cây thuốc này cũng được tìm thấy ở Tả Phìn, Sapa, Lào Cai, có mặt trong nhiều bài thuốc cổ truyền của dân tộc Dao đỏ sinh sống ở khu vực này với công dụng điều trị nhiều bệnh khác nhau có tác dụng đa dạng từ giảm đau, điều trị ngứa, dị ứng, thanh nhiệt và giải độc [10]. Khả năng ức chế tế bào ung thư dạ dày của bốn loại thảo dược này hiện nay còn chưa được làm sáng tỏ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành các thí nghiệm nhằm xác định ảnh hưởng riêng rẽ của dịch chiết của bốn loại thảo dược này lên sự tăng sinh, kiểu hình tế bào và kiểu hình nhân của dòng tế bào ung thư dạ dày AGS trong điều kiện nuôi cấy.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu, hóa chất

Cơm cháy tròn (*Sambucus simsponii* Rehd), Ba chạc (*Euodia lepta* (Spreng) Merr.), Hoa ông lão (*Clematis brevicaudata* DC.) và Dạ cẩm (*Hedyotis capitellata* Wall. ex G. Don. var. *mollis* (Pierre ex Pit.)) được thu thập tại Tả Phìn, Sapa, Lào Cai. Dòng tế bào ung thư dạ dày AGS nhận được từ Viện Sức khỏe và Nghiên cứu Y học Quốc gia Pháp. Môi trường và hoá chất sử dụng trong nuôi cấy do Corning và Thermo Fisher (Mỹ) cung cấp.

2.2. Phương pháp thu thập và xác định tên khoa học của cây thuốc

Sử dụng phương pháp thu thập mẫu cây thuốc theo phương pháp của Nguyễn Nghĩa Thìn [11]. Xác định tên khoa học theo phương pháp chuyên gia, kết hợp với cuốn “Từ điển cây thuốc Việt Nam” (bộ mới) của Võ Văn Chi [10].

2.3. Đánh giá khả năng ức chế tế bào ung thư bằng phương pháp MTT

Tế bào được cấy vào đĩa nuôi cấy 96 giếng với mật độ 5×10^3 tế bào/ giếng trong thể tích môi trường nuôi cấy là 100 μ l/giếng. Sau 48 giờ nuôi cấy, tiến hành xử lý tế bào với dịch chiết của cây thuốc Cơm cháy tròn, Hoa ông lão, Ba chạc và Dạ cẩm với các nồng độ từ 0; 10; 50; 100; 500 μ g/mL, đối chứng là môi trường nuôi cấy không chứa dịch chiết của cây thuốc. Sau 48 giờ thử thuốc, tiến hành chụp ảnh tế bào và phân tích MTT (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) (Thermo Fisher, Mỹ). Phân tích MTT được thực hiện theo các bước bao gồm: loại bỏ môi trường nuôi cấy cũ, bổ sung thêm 100 μ l môi trường nuôi cấy mới chứa 10% MTT. Xử lý đĩa nuôi cấy với MTT ở trong điều kiện tránh ánh sáng tại tủ nuôi cấy 37°C trong 4 giờ. Loại bỏ toàn bộ môi trường nuôi cấy chứa MTT và bổ sung 100 μ l

DMSO/giếng, mix đều, đo mật quang (OD - optical density) để xác định tỷ lệ sống của tế bào trên máy quang phổ ở bước sóng 570 nm. Từ mật độ quang của mỗi giếng được đo, tỷ lệ phần trăm tế bào sống so với đối chứng được tính theo công thức:

$$\% \text{ tế bào sống so với đối chứng} = \frac{\text{Mật độ quang giếng xử lý}}{\text{Mật độ quang giếng đối chứng}} \times 100$$

Giá trị IC_{50} được xác định bằng phần mềm chuyên dụng GraphPad Prism 9.5.0 [12].

2.4. Phương pháp phân tích sự biến đổi kiểu nhân tế bào bằng thuốc nhuộm DAPI

Tế bào được xử lý với dịch chiết các cây thuốc Cơm cháy tròn, Hoa ông lão, Ba chạc và Dạ cẩm ở nồng độ 50; 100 $\mu\text{g/mL}$. Sau đó, tế bào được cố định bởi dung dịch ethanol 95% trong 10 phút. Sau khi cố định với ethanol, ethanol được loại bỏ bằng cách rửa 2 lần với PBS 1X. Sau khi rửa xong bổ sung mỗi giếng 200 μL dung dịch nhuộm nhân tế bào DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride) (Thermo Fisher, Mỹ) với nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ trong 5 phút, thực hiện ở điều kiện không có ánh sáng. Tiếp theo rửa tế bào 2 lần với PBS 1X và đem soi trên kính hiển vi huỳnh quang Nilkon T2U ở độ phóng đại 200 lần ở kính lọc sắc dành cho kênh màu DAPI [12].

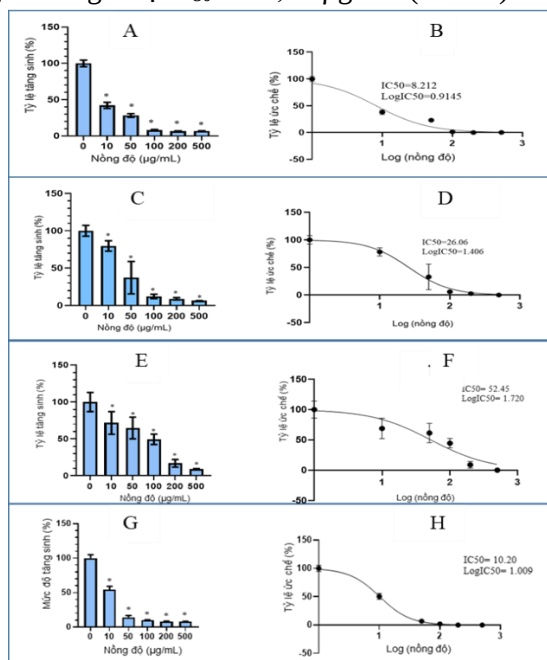
2.5. Phân tích và xử lý số liệu

Toàn bộ dữ liệu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm thống kê GraphPad Prism 9.5.0 theo kiểm định Mann-Whitney test, $P < 0,05$.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tác động của dịch chiết các cây thuốc lên sự tăng sinh tế bào ung thư dạ dày AGS

Tác động ức chế tăng sinh tế bào thay đổi khác nhau tùy thuộc vào từng loài cây, trong đó, Cơm cháy tròn có khả năng ức chế mạnh nhất với sự phát triển của dòng tế bào AGS với giá trị IC_{50} được xác định là 8,21 $\mu\text{g/mL}$, tiếp theo là Dạ cẩm với giá trị IC_{50} 10,2 $\mu\text{g/mL}$, Ba chạc là 26,06 $\mu\text{g/mL}$ và Hoa ông lão có giá trị IC_{50} là 52,45 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 1).

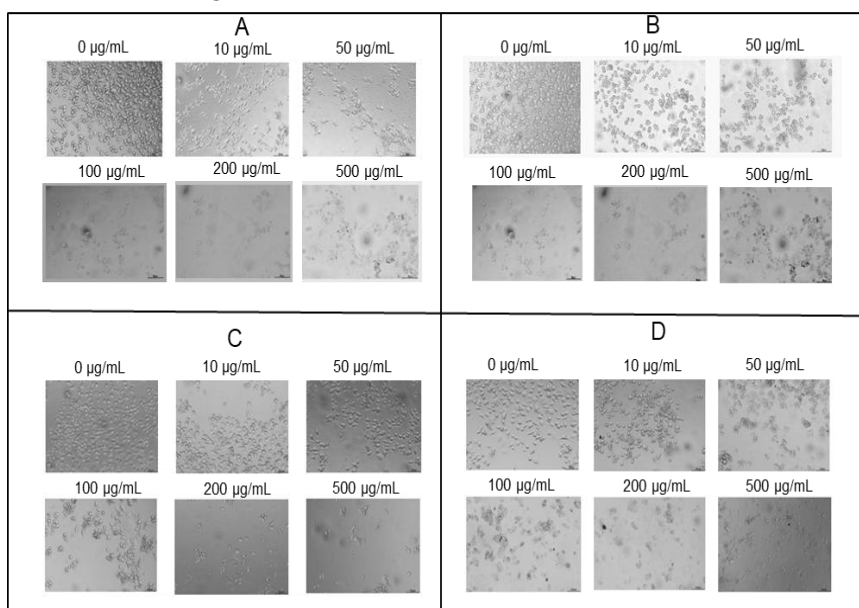


Hình 1. Tác động của dịch chiết lá cây Cơm cháy tròn (A,B), Ba chạc (C,D), Hoa ông lão (E,F) và Dạ cẩm (G,H) lên sự tăng sinh tế bào ung thư dạ dày AGS sau 48 giờ. Sự thay đổi về tỷ lệ % mức độ tăng sinh (A,C,E,G) và biểu đồ xác định giá trị IC_{50} (b,d,f,h), * $P < 0,05$; $n = 4$

Nghiên cứu trước đó cho thấy, một số loài thuộc chi Cơm cháy (*Sambucus*) có khả năng ức chế sự tăng sinh của nhiều loại tế bào ung thư khác nhau [5]. Thêm vào đó, dịch chiết Cơm cháy có độc tính cao với tế bào ung thư, ít độc với tế bào thông thường và các vitamin C, E có khả năng làm giảm độc tính của dịch chiết Cơm cháy đối với các tế bào thông thường [13]. Khả năng ức chế của dịch chiết Dạ cẩm *Hedyotis diffusa* lên sự phát triển của dòng tế bào ung thư đại trực tràng thông qua ức chế con đường tín hiệu STAT3 cũng đã được đề cập [14]. Một nghiên cứu gần đây cho thấy, chiết xuất oligosacarid từ cây Ba chạc có khả năng ức chế sự tăng sinh của các tế bào ung thư Sjsa-1 và MDA-MB-231 phụ thuộc vào liều lượng, nhưng không có tác dụng rõ ràng đối với tế bào A549 và HCT-116 [8].

3.2. Tác động của dịch chiết các cây thuốc lên kiểu hình tế bào ung thư dạ dày AGS

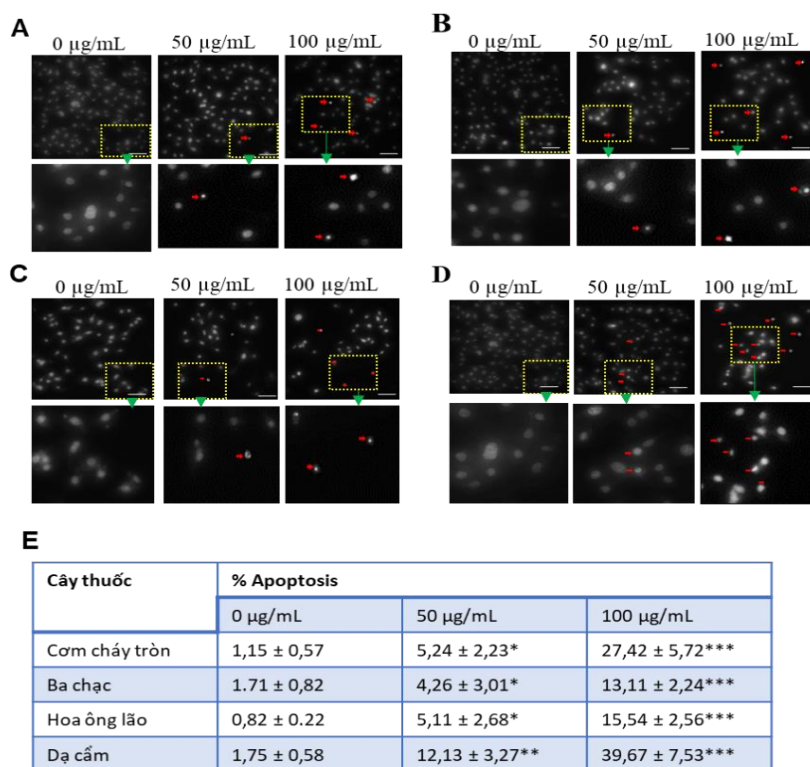
Quan sát hình thái và số lượng tương đối của tế bào AGS trong cùng một diện tích nuôi cấy có thể thấy được sau 48 giờ tiếp xúc, dịch chiết ethanol của mỗi loại cây khác nhau có những ảnh hưởng tương tự nhau đến hình thái tế bào ở các mức độ khác nhau (Hình 2). Ban đầu, các tế bào có hình ovan dài điển hình với tế bào chất đồng đều. Sau 48 giờ nuôi cấy trong môi trường có bổ sung dịch chiết ethanol, trong đĩa nuôi cấy có xuất hiện các tế bào có hình dạng bất thường với kích thước nhỏ hơn, tế bào chất đặc hơn. Tỷ lệ tế bào bất thường tăng lên cùng với sự tăng nồng độ dịch chiết. Cùng với đó, ở cùng một nồng độ cao chiết, cao chiết của loài có giá trị IC_{50} thấp hơn sẽ có tỷ lệ tế bào bất thường hình thái cao hơn.



Hình 2. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây Cơm cháy tròn (A), Ba chạc (B), Hoa ông lão (C) và Dạ cẩm (D) lên kiểu hình tế bào ung thư dạ dày AGS. Thang đo 100 µm; Độ phóng đại x200

3.3. Tác động của dịch chiết các cây thuốc lên kiểu hình nhân tế bào ung thư dạ dày AGS

Sự thay đổi trong kiểu nhân tế bào nuôi cấy AGS đã được quan sát thấy các đĩa nuôi cấy tế bào được xử lý với dịch chiết của các cây thuốc Cơm cháy tròn, Hoa ông lão, Ba chạc, Dạ cẩm (Hình 3). Các tế bào nuôi cấy trong điều kiện không chứa dịch chiết ethanol (nồng độ µg/mL) có kiểu nhân điển hình với vùng chứa nhân bắt màu đồng đều với chất nhuộm (Hình 3A-D). Trong khi đó, trong các đĩa nuôi cấy có chứa dịch chiết ethanol (nồng độ 50 và 100 µg/mL) đã quan sát được các tế bào có kiểu nhân apoptosis với đặc trưng là nhân cô đặc, nhỏ và bắt màu đậm với chất nhuộm nhân (Hình 3A-D). Như vậy, có thể thấy dịch chiết của các cây thuốc Cơm cháy tròn, Hoa ông lão, Ba chạc, Dạ cẩm có tác động ức chế sự tăng sinh, làm chết các tế bào nuôi cấy AGS thông qua quá trình apoptosis.



Hình 3. Ảnh hưởng của dịch chiết lá cây Cơm cháy tròn (A), Ba chạc (B), Hoa ông lão (C) và Dạ cẩm (D) lên kiểu hình nhân tế bào ung thư dạ dày AGS. Tỷ lệ % kiểu nhân apoptosis được đếm trên kính hiển vi huỳnh quang (E), Mũi tên chỉ tế bào có kiểu hình apoptosis, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; Mann-Whitney Test. Thang đo 50 µm; Độ phóng đại x200

Tỷ lệ kiểu nhân apoptosis ở các tế bào xử lý với cao chiết ở nồng độ 50 µg/mL của cả 4 loại thảo dược đều có sự tăng đáng kể so với đối chứng (* $P < 0,05$ và ** $P < 0,001$) (Hình 3E). Ở nồng độ cao hơn (100 µg/mL), cao chiết của cả 4 loại đều làm tăng rõ rệt kiểu hình nhân apoptosis, trong đó cao chiết từ Cơm cháy tròn và cao chiết từ Dạ cẩm gây ra tỷ lệ apoptosis cao nhất lần lượt là $27,42 \pm 5,72\%$ và $39,67 \pm 7,52\%$ (*** $P < 0,001$) (Hình 3E). Nhiều kết quả nghiên cứu gần đây cũng chỉ ra kết quả tác động ức chế tế bào ung thư của dịch chiết từ nhóm thực vật này. Dịch chiết của loài *Sambucus ebulus* cùng họ với Cơm cháy tròn cũng đã được chứng minh là có độc tính cao đối với nhiều loại tế bào ung thư khác nhau trên chuột và người [13], [15]. Trong một nghiên cứu khác, các chiết xuất từ *Clematis montana* - cùng chi với cây Hoa ông lão, đã được chỉ ra có khả năng ức chế sự phát triển của các tế bào ung thư và gây chết các tế bào ung thư nuôi cấy thông qua quá trình apoptosis [16]. Đối với dịch chiết Ba chạc đã có nghiên cứu phân tích một số thành phần chính của cây với nhiều tác dụng khác nhau trong điều trị bệnh, trong đó có cả điều trị HIV và điều trị ung thư [17]. Tại Trung Quốc, Dạ cẩm được sử dụng trong điều trị ung thư gan, phổi, ruột kết, não và tuyến tụy [18], [19].

4. Kết luận

Dịch chiết của các cây thuốc Cơm cháy tròn, Ba chạc, Hoa ông lão, Dạ cẩm có tác động ức chế sự tăng sinh của tế bào ung thư AGS với các giá trị IC_{50} xác định được lần lượt là 8,21 µg/mL; 26,06 µg/mL; 52,45 µg/mL và 10,2 µg/mL. Dịch chiết ethanol của các cây thuốc đã làm thay đổi hình thái tế bào và gây ra kiểu hình nhân apoptosis, trong đó Cơm cháy tròn và Dạ cẩm có tác động mạnh nhất lên kiểu nhân của tế bào. Các thảo dược này có tiềm năng chống lại các tế bào ung thư dạ dày. Các phân tích xa hơn về sự biểu hiện gen của các con đường tín hiệu phân tử là cần thiết để làm rõ cơ chế của sự ức chế tế bào ung thư AGS bởi dịch chiết của các thảo dược này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of Cancer: The Next Generation," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [2] H. Sung *et al.*, "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
- [3] S. S. Joshi and B. D. Badgwell, "Current treatment and recent progress in gastric cancer," *CA A Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 264–279, May 2021, doi: 10.3322/caac.21657.
- [4] A. Ranjan *et al.*, "Role of Phytochemicals in Cancer Prevention," *IJMS*, vol. 20, no. 20, Oct. 2019, Art. no. 4981, doi: 10.3390/ijms20204981.
- [5] M. Jabbari, B. Daneshfard, M. Emtiazy, A. Khiveh, and M. H. Hashempur, "Biological Effects and Clinical Applications of Dwarf Elder (*Sambucus ebulus* L): A Review," *J Evid Based Complementary Altern Med*, vol. 22, no. 4, pp. 996–1001, Oct. 2017, doi: 10.1177/2156587217701322.
- [6] M. Mostafa, J. R. Appidi, M. T. Yakubu, and A. J. Afolayan, "Anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic properties of the aqueous extract of *Clematis brachiata* leaf in male rats," *Pharmaceutical Biology*, vol. 48, no. 6, pp. 682–689, Jun. 2010, doi: 10.3109/13880200903257966.
- [7] W.-T. Li *et al.*, "A new indole alkaloidal glucoside from the aerial parts of *Clematis terniflora* DC.," *Natural Product Research*, vol. 27, no. 24, pp. 2333–2337, Dec. 2013, doi: 10.1080/14786419.2013.838239.
- [8] F. Xiong *et al.*, "Characterization, Antioxidant and Antitumor Activities of Oligosaccharides Isolated from *Evodia lepta* (Spreng) Merr. by Different Extraction Methods," *Antioxidants*, vol. 10, no. 11, p. 1842, Nov. 2021, doi: 10.3390/antiox10111842.
- [9] C.-C. Lin, L.-T. Ng, J.-J. Yang, and Y.-F. Hsu, "Anti-Inflammatory and Hepatoprotective Activity of Peh-Hue-Juwa-Chi-Cao in Male Rats," *Am. J. Chin. Med.*, vol. 30, no. 02n03, pp. 225–234, Jan. 2002, doi: 10.1142/S0192415X02000405.
- [10] V. C. Vo, *Dictionary of Vietnamese medical plants*. Medical Publishing House, 2012.
- [11] N. T. Nguyen, *Research Methods in Plant Sciences*. Hanoi National University Publishing House, 2007.
- [12] T. T. H. Le, M. Q. Nguyen, V. P. Nguyen, V. H. Hoang, and P. H. Nguyen, "Methanol Extract of *Ficus pumila* L. Inhibits Proliferation, Induces Apoptosis and Arrests the Cell Cycle in HepG2 Live Cancer Cells," *Asian J. of Plant Sciences*, vol. 22, no. 3, pp. 423–433, Jun. 2023, doi: 10.3923/ajps.2023.423.433.
- [13] S. S. Saravi, M. Shokrzadeh, and F. H. Shirazi, "Cytotoxicity of *Sambucus ebulus* on cancer cell lines and protective effects of vitamins C and E against its cytotoxicity on normal cell lines," *African Journal of Biotechnology*, vol. 12, no. 21, pp. 3360–3365, 2013, doi: 10.5897/AJB09.1577
- [14] Q. Cai *et al.*, "Hedyotis diffusa Willd Inhibits Colorectal Cancer Growth in Vivo via Inhibition of STAT3 Signaling Pathway," *IJMS*, vol. 13, no. 5, pp. 6117–6128, May 2012, doi: 10.3390/ijms13056117.
- [15] S. S. Saravi, M. Shokrzadeh, and M. Mirzayi, "Cytotoxic effects of ethyl acetate extract of *Sambucus ebulus* compared with Etoposide on normal and cancer cell lines," *Planta Med*, vol. 75, no. 09, Jul. 2009, Art. no. s-0029-1234633, doi: 10.1055/s-0029-1234633.
- [16] H. Peng *et al.*, "Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities," *Peptides*, vol. 30, no. 10, pp. 1805–1815, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.peptides.2009.06.027.
- [17] E. M. Eliaser, J. H. Ho, N. Mohd. Hashim, Y. Rukayadi, G. C. L. Ee, and A. F. A. Razis, "Phytochemical Constituents and Biological Activities of Melicope lunu-ankenda," *Molecules*, vol. 23, no. 10, Oct. 2018, Art. no. 2708, doi: 10.3390/molecules23102708.
- [18] H.-Y. Hung *et al.*, "Chemical Constituents of *Hedyotis diffusa* and Their Anti-Inflammatory Bioactivities," *Antioxidants*, vol. 11, no. 2, Feb. 2022, Art. no. 335, doi: 10.3390/antiox11020335.
- [19] R. Ahmad, K. Shaari, N. H. Lajis, A. S. Hamzah, N. H. Ismail, and M. Kitajima, "Anthraquinones from *Hedyotis capitellata*," *Phytochemistry*, vol. 66, no. 10, pp. 1141–1147, May 2005, doi: 10.1016/j.phytochem.2005.02.023.