

SÀNG LỌC MỘT SỐ DƯỢC LIỆU CÓ HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TRÊN TẾ BÀO GAN

Bùi Thị Kim Lý⁽¹⁾, Hoàng Thành Chí⁽¹⁾

(1) Trường Đại học Thủ Dầu Một

Ngày nhận bài 29/2/2024; Ngày phản biện 18/3/2024; Chấp nhận đăng 25/3/2024

Liên hệ email: chiht@tdmu.edu.vn

<https://doi.org/10.37550/tdmu.VJS/2024.02.529>

Tóm tắt

Mục đích của nghiên cứu này là nhằm tìm kiếm những cây dược liệu có hoạt tính kháng tế bào ung thư biểu mô gan tại Việt Nam. Chúng tôi đã tiến hành thu thập 8 loại cây dược liệu dựa trên kết quả tổng hợp thông tin của các nghiên cứu trước đó. Sau đó tiến hành tách chiết và thu nhận cao chiết thô của 8 cây này và tiếp tục đánh giá tác động ức chế sự tăng sinh của chúng trên dòng tế bào ung thư biểu mô gan HEPG2 và HCCJ5 sử dụng phương pháp MTT. Kết quả sàng lọc so sánh với nhóm đối chứng (mặc định là 100%) cho thấy các cao chiết cho tác động ức chế mạnh nhất là Cúc Tần (phần trăm tế bào sống là $1,32 \pm 1,20$ % trên dòng tế bào HEPG2 và $0,1633 \pm 0,15$ % trên dòng tế bào HCCJ5). Các cao chiết gây ức chế trên 50% sinh trưởng tế bào gồm có Lá Đắng, Xuyên Tâm Liên và Sài Đất. Các cao chiết còn lại là Ngũ Gia Bì Gai, Kim Ngân Hoa, Thanh Táo và Kim Thắt Tai thì không có tác động đến khả năng sống của các tế bào ung thư biểu mô gan.

Từ khóa: dược liệu, HEPG2, HCCJ5, ung thư biểu mô gan

Abstract

SCREENING HERBAL MEDICINE PLANT FOR TOXIC ACTIVITY ON LIVER CANCER CELLS

This study attempts to identify medicinal plants in Vietnam that possess anti-hepatocarcinoma properties. We have gathered eight therapeutic herbs by integrating information from prior investigations. Next, isolate and store raw extracts from these eight plants and assess their ability to suppress the growth of HEPG2 and HCCJ5 liver cancer cells using the MTT assay. The screening results indicated that the extracts from Cuc Tan had the most potent inhibitory effect, with a percentage of viable cells at 1.32 ± 1.20 % on the HEPG2 cell line and 0.1633 ± 0.15 % on the HCCJ5 cell line as compared to the control group (default is 100%). Plant extracts that suppress more than 50% of cell growth are La Dang, Xuyen Tam Lien, and Sai Dat. The extracts Ngu Gia Bi Gai, Kim Ngan Hoa, Thanh Tao, and Kim That Tai did not affect the survival of liver cancer cells.

1. Đặt vấn đề

Gan đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa các hoạt động trao đổi chất và các quá trình sinh lý chẳng hạn như quá trình biến đổi chất dinh dưỡng thành chất bổ dưỡng, tạo mật và là nơi sinh tổng hợp protein, lipid và carbohydrate cũng như dự trữ vitamin cho cơ thể. Nhờ khả năng giải độc, loại bỏ những nguồn dinh dưỡng và năng lượng không có lợi cho cơ thể nên gan chiếm vị trí cực kỳ quan trọng trong bảo vệ và duy trì sức khỏe tốt. Những bệnh liên quan đến gan được xếp vào nhóm bệnh có nguy cơ và gây tử vong hàng đầu trên toàn thế giới. Những người có lối sống không lành mạnh, bị béo phì hoặc có những thói quen xấu trong ăn uống hàng ngày như tiêu thụ nhiều thức uống có cồn (rượu, bia), sử dụng thuốc kích thích thì gan thường có nguy cơ bị tổn thương. Ngoài ra, gan tổn thương còn do nhiều nguyên nhân khác chẳng hạn như do vi khuẩn, virus và ký sinh trùng gây viêm gan tấn công; hoặc cũng có thể là do hệ thống tự miễn bị bất thường (trường hợp viêm gan và xơ gan thứ cấp) (Madrigal-Santillan và nnk., 2014). Bệnh có thể diễn tiến qua các giai đoạn viêm gan cấp, viêm gan mạn rồi biến chuyển qua xơ gan hoặc ung thư gan.

Năm 2020, toàn thế giới có khoảng 906.000 ca ung thư gan mắc mới và 830.000 ca ung thư gan tử vong trên toàn thế giới. Ung thư gan nguyên phát là loại ung thư được chẩn đoán nhiều thứ bảy và trở thành nguyên nhân đứng thứ hai gây tử vong do ung thư trên toàn thế giới (Sung và nnk., 2021). Ung thư gan nguyên phát gồm 3 loại chính: ung thư biểu mô tế bào gan (phát triển từ tế bào gan), ung thư biểu mô đường mật (phát triển từ đường mật nằm trong gan) và u nguyên bào gan. Trong đó, ung thư biểu mô tế bào gan (HCC) là loại phổ biến nhất (chiếm 75-85%), sau đó là ung thư biểu mô đường mật (chiếm 10-15%) (Sung và nnk., 2021). Hiện nay, có một số phương pháp chủ yếu được sử dụng để điều trị ung thư gan gồm có phẫu thuật cắt bỏ, ghép gan, đặt điện cực kim qua da vào khối u gan để đốt khối u bằng sóng cao tần, sử dụng nút mạch làm tắt nghẽn nhằm ngăn máu đến nuôi dưỡng khối u gan (TACE), hóa trị và liệu pháp phân tử nhắm đích như dùng sorafenib. Tuy nhiên, có rất nhiều vấn đề lớn phát sinh cần được quan tâm sau quá trình điều trị chẳng hạn như bệnh nhân vẫn tái phát bệnh hoặc bị ảnh hưởng bởi độc tính thuốc điều trị hoặc thuốc điều trị không hiệu quả làm ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng cuộc sống sau khi điều trị của bệnh nhân (Liu và nnk., 2015). Ví dụ, việc sử dụng lặp đi lặp lại phương pháp TACE khiến cho gan bị xơ hóa, nhiễm độc và làm suy giảm chức năng của gan. Ngoài ra, sorafenib cũng gây ra các tác dụng phụ như tăng huyết áp, xuất huyết, bệnh về thần kinh, giảm bạch cầu, giảm bạch cầu lympho, tiêu chảy, buồn nôn, nôn và khó thở (Anwanwan và nnk., 2020).

Một số hợp chất tự nhiên được chiết xuất từ trái cây, rau và gia vị đã được chứng minh là có thể gây ức chế cơ chế phát triển ung thư và kích thích các cơ chế liên quan đến phòng chống bệnh ung thư bằng cách kích hoạt hệ thống chống ung thư, chống tăng sinh tế bào ung thư, chống viêm và chống oxy hóa (Aouissi và nnk, 2018; Maiuolo và nnk, 2021). Đối với liệu pháp điều trị ung thư, các hợp chất tự nhiên cũng cho thấy có gây ra tác động chọn lọc trên hoạt động của một số enzyme dẫn đến phát sinh ung thư. Chẳng

hạn như alkaloid, phenol, các axit béo, quinon, v.v., được coi là chất ức chế chọn lọc hoạt động xúc tác của enzyme topoisomerase I/II, men chịu trách nhiệm biến đổi DNA, chu trình tế bào và sinh học tế bào khối u (D'yakonov và nnk., 2017).

Mục tiêu của nghiên cứu này là sàng lọc các cây dược liệu tiềm năng có khả năng ức chế tăng sinh tế bào biểu mô gan dòng HCC trên mô hình *in vitro*.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp chuẩn bị cao chiết từ dược liệu

Dược liệu (bảng 1) sau khi thu hái được rửa sạch và sấy khô trong tủ sấy ở 40°C đến khi khô hoàn toàn, tiếp đó cho mẫu cây khô vào máy xay thành bột mịn. Mẫu bột dược liệu được cân và tiến hành chiết bằng dung môi methanol (dung môi được thêm vào sao cho ngập bề mặt dược liệu từ 1 đến 2cm) bằng phương pháp chiết ngâm dầm trong 5 ngày và cứ mỗi 24 giờ dịch chiết được thu lại và dung môi được thay mới. Dịch chiết thu lại và lọc qua giấy lọc (whatman, d=240nm, No1), dịch chiết sau 5 ngày được gộp lại và tiến hành loại dung môi bằng phương pháp cô quay chân không dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 40°C để thu được cao thô. Cao thô tiếp tục sấy cho bay hơi dung môi ở nhiệt độ dưới 40°C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất thu nhận cao chiết được tính toán dựa trên tỷ lệ giữa khối lượng cao thô thu nhận được (g) và khối lượng bột dược liệu ban đầu (g).

2.2. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào ung thư biểu mô gan HEPG2 và HCCJ5 được nuôi cấy trong các đĩa có chứa môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) và kháng sinh 5% penicillin/streptomycin, sau đó đem nuôi cấy ở 37°C trong điều kiện được cấp ẩm và nạp CO₂ liên tục ở mức 5%.

2.3. Thử nghiệm độc tính của cao chiết trên tế bào

Thí nghiệm được tiến hành như sau: cho 100μl/giếng tế bào HepG2/HCCJ5 được nuôi trên đĩa 96 giếng với mật độ 3×10^4 tế bào/ml với môi trường chứa FBS, nuôi trong tủ nuôi cấy thứ cấp 37°C, 5% CO₂. Sau 24 giờ, thêm 100μl/giếng dược liệu với nồng độ 100μg/ml vào giếng, tiếp tục nuôi trong tủ nuôi cấy thứ cấp 37°C, 5% CO₂. Sau 48 giờ, hút bỏ môi trường cũ, cho 200μl/giếng môi trường mới không có FBS. Thêm 20μl/giếng 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) nồng độ 5mg/ml, ủ tối trong tủ nuôi cấy thứ cấp 37°C, 5% CO₂. Sau 2.5 giờ, nhẹ nhàng hút bỏ toàn bộ dung dịch trong giếng, cho 100μl/giếng DMSO để hòa tan tinh thể formazan. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 570nm bằng máy quang phổ UV-VIS. Thí nghiệm lặp lại 3 lần.

2.4. Phương pháp phân tích số liệu

Thí nghiệm được lặp lại ít nhất ba lần. Kết quả thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm Graphpad Prism 7. Phân tích thống kê ANOVA được sử dụng để so sánh có hay không có sự khác biệt giữa mẫu xử lý và mẫu đối chứng.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Kết quả lựa chọn dược liệu tham gia vào thử nghiệm

Dược liệu được lựa chọn để tiến hành trong phạm vi của nghiên cứu này dựa trên một số kết quả *in vitro* đã được công bố trước đó (bảng 1). Các dược liệu này đều cho thấy khả năng kháng ung thư gan hoặc có khả năng kháng oxy hóa cho thấy tiềm năng bảo vệ gan trước tác nhân gây stress oxy hóa.

Bảng 1. Dược liệu có tiềm năng điều trị các bệnh về gan

STT	TÊN DƯỢC LIỆU	TÊN KHOA HỌC	HỌ	TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU	BỘ PHẬN SỬ DỤNG	MÔ HÌNH NGHIÊN CỨU	TÀI LIỆU THAM KHẢO
1	Cúc tần	<i>Pluchea indica</i> (L.) Less	Họ cúc - Asteraceae	Chống lại độc tính gan gây ra bởi CCl ₄ : phân đoạn methanol của chiết xuất rễ	Rễ	<i>In vivo</i>	(Sen và nnk., 1993)
				Ức chế sự tăng sinh và di căn của các tế bào ung thư thông qua việc gây ra sự chết tế bào phụ thuộc p53: dịch chiết nước của lá hoặc rễ	Lá Rễ	<i>In vitro</i>	(Cho và nnk., 2012)
2	Kim ngân hoa	<i>Lonicera japonica</i> T hunb.	Kim ngân – Caprifoliaceae	Gây ra việc bắt giữ chu trình tế bào G2 / M và apoptosis trong tế bào HepG2 có ý nghĩa ngăn chặn sự di căn của tế bào ung thư gan: chiết xuất polyphenolic		<i>In vitro</i>	(Park và nnk., 2012)
3	Kim thất tai	<i>Gynura procumbens</i> (Lour) Merr.	Họ Cúc - Asteraceae	Dịch chiết ethanol từ lá kháng lại sự hình thành tế bào ung thư gan do DMBA(7.12-dimetilbenz [α] anthracen) gây ra ở chuột cái	Lá	<i>In vivo</i>	(Ayob và nnk., 2014).
4	Mật gấu	<i>Vernonia amygdalina</i> Del.	Họ Cúc - Asteraceae	Bảo vệ nhiễm độc gan do kết hợp INH và rifampicin: dịch chiết ethanol 95% của lá	Lá	<i>In vivo</i>	(Iwo và nnk., 2017)
5	Ngũ gia bì gai	<i>Acanthopanax senticosus</i> (Rupr. et Maxim.) Harms	Họ Nhân sâm – Araliaceae	Kháng oxy hóa :Cao chiết nước thô từ rễ và thân rễ	Rễ và thân rễ	<i>In vivo</i>	(Lin và nnk., 2000)
				Bảo vệ gan khỏi tác động gây độc của Acetaminophen và CCl ₄ :dịch chiết nước của thân và rễ (ở liều thấp)	Thân Rễ		
				Ức chế tăng trưởng và kích thích apoptosis của các tế bào KATO III		<i>In vitro</i>	(Hibasami và nnk., 2000)

6	Sài đất	<i>Wedelia chinensis</i> (Osbeck) Merr	Họ Cúc - Asteraceae	Chiết xuất ethanol của toàn cây <i>W. chinensis</i> đã được đánh giá về hiệu quả của nó đối với tác nhân gây độc gan là tetrachlorua cacbon (CCl ₄) gây ra ở chuột Wister albino	Toàn cây	<i>In vivo</i>	(Abdul Jalal, 2012)
				Dịch chiết nước có tác dụng bảo vệ gan khỏi tác nhân gây độc	CCl ₄ và Acetaminophen	<i>In vivo</i>	(Adams và nnk., 1994)
					D(+)-galactosmine	<i>In vivo</i>	
7	Thanh táo	<i>Justicia gendarussa</i> L. f.	Họ Ô rô - Acanthaceae	Chiết xuất Methanol của lá có tác dụng bảo vệ gan khỏi tác nhân gây độc CCl ₄	Lá	<i>In vivo</i>	(Phukan. B 2014)
8	Xuyên tâm liên	<i>Andrographis paniculata</i> (Burm. f.) Nees	Họ Ô rô – Acanthaceae	Tác dụng bảo vệ của dịch chiết nước của lá về tổn thương gan và thận do PbANKA (<i>Plasmodium berghei</i> ANKA) gây ra	Lá	<i>In vivo</i>	(Muangpruan và nnk, 2015)
				Tác dụng bảo vệ gan của dịch chiết cồn của lá gây độc bởi CCl ₄	Lá	<i>In vivo</i>	(Rana và nnk, 1991)
				Tác dụng bảo vệ của dịch chiết nước của lá về tổn thương gan do hexachloro xyclohexan (BHC) gây ra	Lá	<i>In vivo</i>	(Trivedi và nnk, 2001)

3.2. Kết quả tạo dịch chiết dược liệu thô trong methanol

Các dược liệu sau khi thu nhận được tiến hành sơ chế và xay thành bột. Sau đó 100g bột được chiết ngâm đậm cùng với dung môi methanol như trong phần mô tả mục 2.1. Mỗi thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần và kết quả hiệu suất thu nhận cao khô được thể hiện như trong bảng 2.

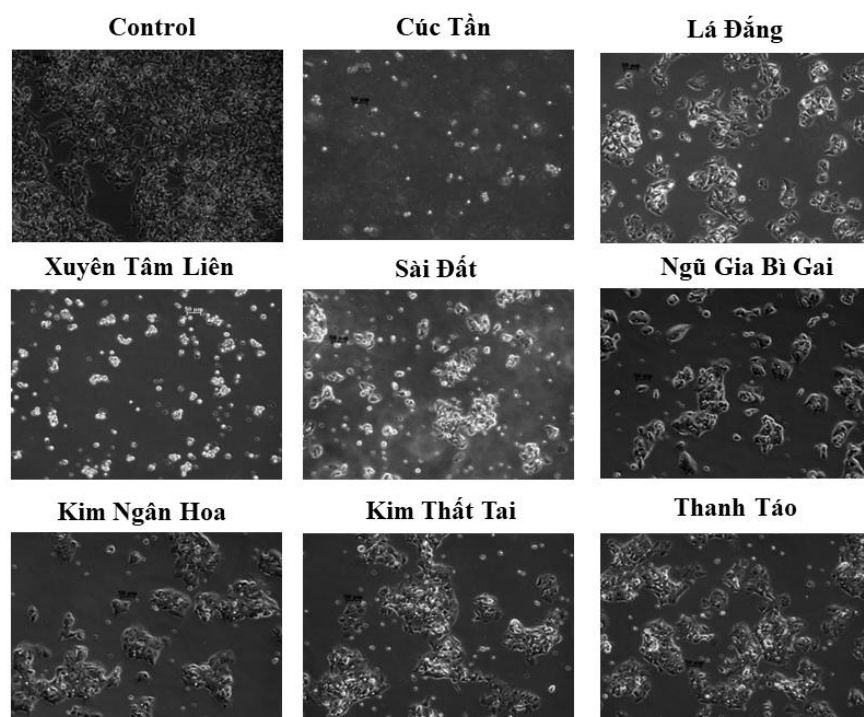
Bảng 2. Kết quả hiệu suất thu nhận cao chiết thô từ các dược liệu

STT	Dược liệu	Bộ phận sử dụng	Trung bình khối lượng cao (g)	Hiệu suất tách chiết (%)
1	Cúc Tần	Lá	0,88 ± 0,18	2,93
2	Kim Ngân Hoa	Hoa	8,95 ± 1,25	29,86
3	Kim Thất Tai	Lá	4,14 ± 0,54	13,81
4	Lá Đẳng	Lá	3,78 ± 0,65	12,60
5	Ngũ Gia Bì Gai	Thân	0,75 ± 0,03	2,51
6	Thanh Táo	Lá	2,47 ± 0,15	8,24
7	Xuyên Tâm Liên	Lá	1,25 ± 0,06	4,18
8	Sài đất	Toàn cây	2,44 ± 0,12	4,06

Dịch chiết methanol thô của các dược liệu được bảo quản ở -20°C. Từ kết quả tạo dịch chiết cho thấy hiệu suất tách chiết nằm trong khoảng từ 2,51-29,86 %, đa số các dược liệu đạt ở mức dưới 10%, riêng Kim Ngân Hoa và Kim Thất Tai đạt hiệu suất trên 10%.

3.3. Đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư biểu mô gan HepG2 của các dược liệu

Các cao chiết dược liệu được tiến hành pha loãng ở nồng độ 100 μ g/ml, sau đó tiến hành nuôi chung với tế bào HEPG2 như mô tả ở mục 2.3. Kết quả về sự thay đổi hình thái tế bào được thể hiện ở hình 1 và kết quả về tỷ lệ ức chế sự tăng sinh tế bào HEPG2 bởi tác động của các cao chiết dược liệu thể hiện trong hình 2.

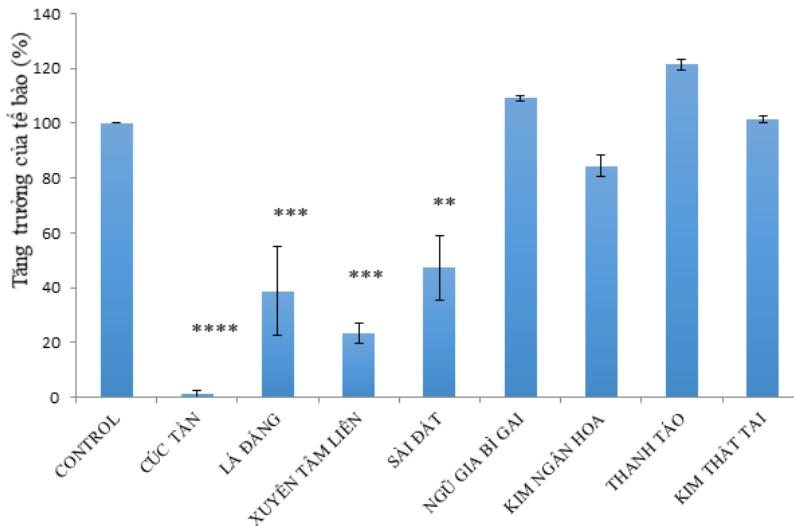


Hình 1. Hình thái tế bào HEPG2 dưới tác dụng của cao chiết methanol của các dược liệu được khảo sát ở nồng độ 100 μ g/ml.

Về mặt hình thái, ở giếng đối chứng (control), tế bào vẫn bám xuống bề mặt đĩa nuôi cấy trong khi ở các giếng chứa các dược liệu gồm có Cúc Tần, Lá Đắng, Xuyên Tâm Liên, và Sài Đất thì các tế bào bị mất khả năng bám xuống bề mặt đĩa nuôi cấy, co lại và nổi trong môi trường, hình thái tế bào hoàn toàn bị thay đổi. Ở các giếng còn lại hình thái tế bào chưa thấy có sự khác biệt nhiều so với giếng đối chứng.

Kết quả đánh giá tác động ức chế tăng trưởng của dược liệu trên dòng tế bào HEPG2 bằng phương pháp MTT cho thấy các dược liệu có tác động ức chế tăng sinh tế bào lên đến trên 50% bao gồm có cao chiết từ Lá Đắng (38,76 $\pm$ 16,20 %), Xuyên Tâm Liên (51 $\pm$ 3,67 %) và Sài Đất (47,23 $\pm$ 11,72 %), và gây ức chế tăng sinh tế bào gần như hoàn toàn đối với cao chiết từ cây Cúc Tần với phần trăm tế bào sống chỉ đạt 1,32 $\pm$ 1,20 (%). Dựa trên phân tích thống kê ANOVA và phân tích hậu định Dunett giữa các nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng, cho thấy có sự khác biệt của các nhóm dược liệu này với đối chứng về mặt thống kê. Dịch chiết của các dược liệu còn lại là: Ngũ Gia Bì

Gai, Kim Ngân Hoa, Thanh Táo và Kim Thất Tai cho thấy tác động lên dòng tế bào HEPG2 ở mức thấp, tỉ lệ tế sống đối với dịch chiết Kim Ngân Hoa, dịch chiết Kim Thất Tai dường như không có tác động hoặc kích thích tăng sinh tế bào đối với dịch chiết Thanh táo và Ngũ Gia Bì Gai. Dựa trên phân tích thống kê ANOVA, cho thấy không có sự khác biệt với đối chứng về mặt thống kê. Kết quả này phù hợp với kết quả hình thái quan sát được ở hình 1.



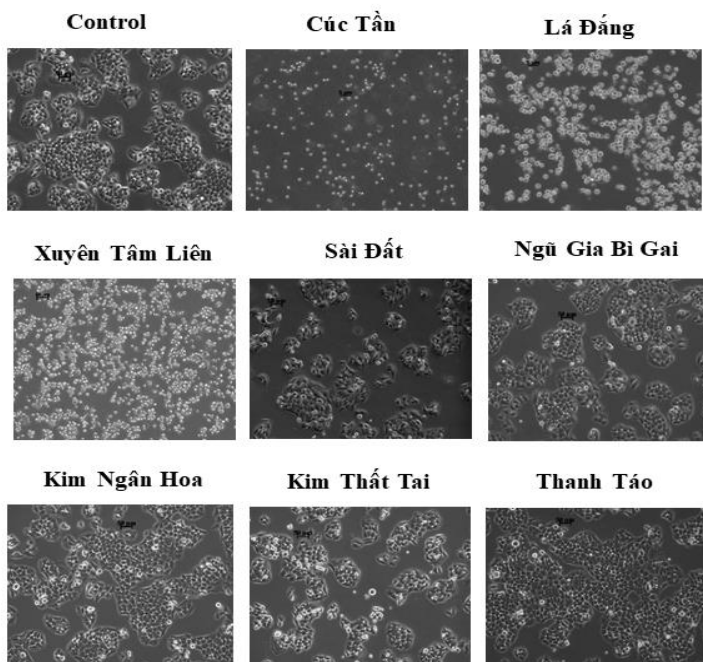
Hình 2. Tác động ức chế tăng sinh tế bào HEPG2 của cao chiết methanol của các dược liệu ở nồng độ 100µg/ml. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$.

3.4. Đánh giá khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư biểu mô gan HCCJ5 của các dược liệu

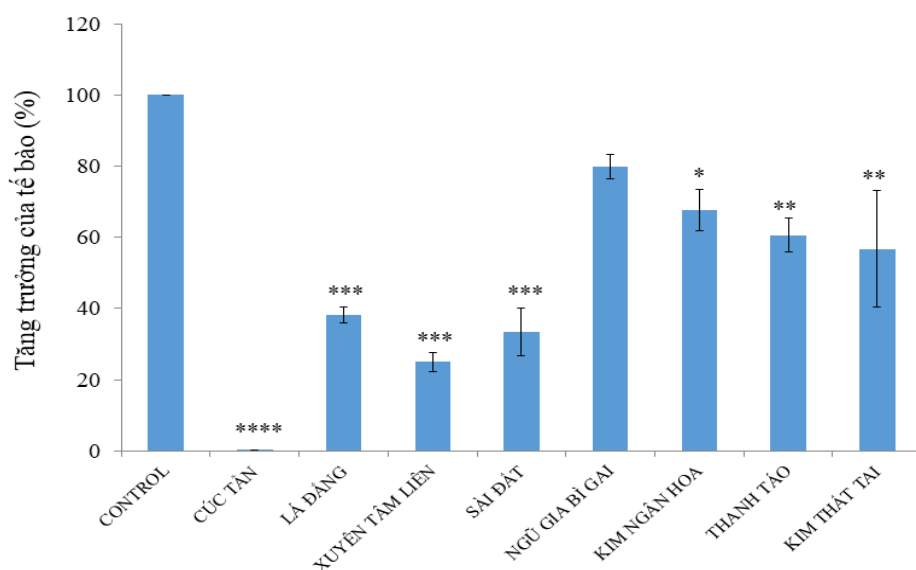
Tương tự như vậy, các cao chiết dược liệu được tiến hành pha loãng ở nồng độ 100µg/ml, sau đó tiến hành nuôi chung với tế bào HCCJ5 như mô tả ở mục 2.3. Kết quả về sự thay đổi hình thái tế bào được thể hiện ở hình 3 và kết quả về tỷ lệ ức chế sự tăng sinh tế bào HCCJ5 bởi tác động của các cao chiết dược liệu thể hiện trong hình 4.

Kết quả sàng lọc dược liệu trên dòng tế bào HCCJ5 tại nồng độ 100µg/ml cho thấy tỉ lệ tế bào sống ở những dịch chiết dược liệu của các cây Lá Đắng là $38,12 \pm 2,24$ (%), Xuyên Tâm Liên là $24,99 \pm 2,68$ (%) và Sài Đất là $33,37 \pm 6,74$ (%). Như vậy so với HCCJ5, các cao chiết này còn có tác động đáng kể hơn với khả năng ức chế tăng sinh tế bào lên đến 70%. Đồng thời với dòng tế bào HCCJ5, cao chiết Cúc Tần cũng cho thấy khả năng ức chế tăng sinh tế bào hoàn toàn với phần trăm tế bào sống chỉ còn $0,1633 \pm 0,15$ (%). Dịch chiết của các dược liệu còn lại là: Ngũ Gia Bì Gai, Kim Ngân Hoa, Thanh Táo và Kim Thất Tai cho thấy tác động lên dòng tế bào HCCJ5 ở mức thấp, ức chế tăng sinh tế bào dưới 50% tại nồng độ 100µg/ml. Dựa trên phân tích thống kê ANOVA và phân tích hậu định Dunett giữa các nhóm thử nghiệm so với nhóm đối chứng, cho thấy có sự khác biệt với đối chứng về mặt thống kê.

Từ kết quả trên cho thấy từ các dược liệu đã chọn lọc ra được các dịch chiết methanol từ các cây Cúc Tần, Lá Đắng, Xuyên Tâm Liên, Sài Đất có tiềm năng điều trị bệnh ung thư gan và cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để cung cấp thêm bằng chứng sinh học phân tử trước khi được ứng dụng lâm sàng hay bào chế dược phẩm.



Hình 3. Hình thái tế bào HCCJ5 dưới tác dụng của cao chiết methanol của các dược liệu được khảo sát ở nồng độ 100 μ g/ml.



Hình 4. Tác động ức chế tăng sinh tế bào HEPG2 của cao chiết methanol của các dược liệu ở nồng độ 100 μ g/ml. **** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$.

4. Kết luận

Từ kết quả trên cho thấy từ các dược liệu đã chọn lọc ra được các dịch chiết methanol từ các cây Cúc Tần, Lá Đắng, Xuyên Tâm Liên, Sài Đất là có tiềm năng điều trị bệnh ung thư gan và cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để cung cấp thêm bằng chứng sinh học phân tử trước khi được ứng dụng lâm sàng hay bào chế dược phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] A. Abdul Jalal, S. S., R. Nallathambi, G. Jeevaprakash, S.L. Dheivanai, S. Senthilvelan (2012). Hepatoprotective Activity Of *Wedelia Chinensis* Against Carbon Tetrachloride Induced Liver Damage In Rats. *International Journal Of Phytopharmacology*, 3(2), 121-125.
- [2] Adams, J. D., Jr., Klaidman, L. K., Huang, Y. M., Cheng, J. J., Wang, Z. J., Nguyen, M., . . . Kuda, A. (1994). The Neuropathology Of Intracerebroventricular T-Butylhydroperoxide. *Mol Chem Neuropathol*, 22(2), 123-142.
- [3] Anwanwan, D., Singh, S. K., Singh, S., Saikam, V., & Singh, R. (2020). Challenges In Liver Cancer And Possible Treatment Approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1873(1), 188314.
- [4] Aouissi, H., Gourine, N., Wang, H., Chen, X., Bombarda, I., Boudjeniba, M., & Yousfi, M. (2018). Chemical Composition, Antioxidative, Antimicrobial And Anti-Cancer Activities Of *Asteriscus Graveolens* (Forssk) Essential Oil. *Oriental Pharmacy And Experimental Medicine*, 18, 217-223.
- [5] Ayob, Z., & Mohd Bohari, S. P. (2014). Cytotoxic Activities Against Breast Cancer Cells Of Local *Justicia Gendarussa* Crude Extracts. 732980.
- [6] Cho, J. J., Cho, C. L., Kao, C. L., Chen, C. M., Tseng, C. N., Lee, Y. Z., . . . Hong, Y. R. (2012). Crude Aqueous Extracts Of *Pluchea Indica* (L.) Less. Inhibit Proliferation And Migration Of Cancer Cells Through Induction Of P53-Dependent Cell Death. *Bmc Complement Altern Med*, 12, 265.
- [7] D'yakonov, V. A., Dzhemileva, L. U., & Dzhemilev, U. M. (2017). Advances In The Chemistry Of Natural And Semisynthetic Topoisomerase I/Ii Inhibitors. *Studies In Natural Products Chemistry*, 54, 21-86.
- [8] Hibasami, H., Fujikawa, T., Takeda, H., Nishibe, S., Satoh, T., Fujisawa, T., & Nakashima, K. (2000). Induction Of Apoptosis By *Acanthopanax Senticosus* Harms And Its Component, Sesamin In Human Stomach Cancer Kato Iii Cells. *Oncol Rep*, 7(6), 1213-1216.
- [9] Iwo, M. I., Sjahlim, S. L., & Rahmawati, S. F. (2017). Effect Of *Vernonia Amygdalina* Del. Leaf Ethanolic Extract On Intoxicated Male Wistar Rats Liver. *Sci Pharm*, 85(2).
- [10] Lin, C. C., & Huang, P. C. (2000). Antioxidant And Hepatoprotective Effects Of *Acanthopanax Senticosus*. *Phytother Res*, 14(7), 489-494.
- [11] Liu, C. Y., Chen, K. F., & Chen, P. J. (2015). Treatment Of Liver Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(9), A021535.
- [12] Madrigal-Santillan, E., Madrigal-Bujaidar, E., Alvarez-Gonzalez, I., Sumaya-Martinez, M. T., Gutierrez-Salinas, J., Bautista, M., . . . Morales-Gonzalez, J. A. (2014). Review Of Natural Products With Hepatoprotective Effects. *World J Gastroenterol*, 20(40), 14787-14804.

- [13] Maiuolo, J., Gliozzi, M., Carresi, C., Musolino, V., Oppedisano, F., Scarano, F., . . . Macri, R. (2021). Nutraceuticals And Cancer: Potential For Natural Polyphenols. *Nutrients*, 13(11), 3834.
- [14] Muangpruan, P., Janruengsri, T., Chutoam, P., Klongthlay, S., & Somsak, V. (2015). *Protective Effects Of Andrographis Paniculata Leaf Extract On Liver And Renal Damage And Hypoglycemia During Plasmodium Berghei Infection*, Vol. 4.
- [15] Park, H. S., Park, K. I., Lee, D. H., Kang, S. R., Nagappan, A., Kim, J. A., . . . Kim, G. S. (2012). Polyphenolic Extract Isolated From Korean Lonicera Japonica Thunb. Induce G2/M Cell Cycle Arrest And Apoptosis In Hepg2 Cells: Involvements Of Pi3k/Akt And Mapks. *Food Chem Toxicol*, 50(7), 2407-2416.
- [16] Phukan. B , K. B. B., Verma. V. K, Kumar. A. (2014). Hepatoprotective Activity Of Justicia Gendarusa Linn. Leaves In Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury In Mice. *Journal Of Natural Remedies*, 12(6), 132 - 137.
- [17] Rana, A. C., & Avadhoot, Y. (1991). Hepatoprotective Effects Of Andrographis Paniculata Against Carbon Tetrachloride-Induced Liver Damage. *Arch Pharm Res*, 14(1), 93-95.
- [18] Sen, T., Basu, A., Ray, R., & Nag Chaudhuri, A. (1993). Hepatoprotective Effects Of Pluchea Indica (Less) Extract In Experimental Acute Liver Damage In Rodents. *Phytotherapy Research*, 7(5), 352-355.
- [19] Sung, H. A.-O., Ferlay, J., Siegel, R. A.-O., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: Globocan Estimates Of Incidence And Mortality Worldwide For 36 Cancers In 185 Countries. *Ca Cancer J Clin*, 71(3), 209-249.
- [20] Trivedi, N. P., & Rawal, U. M. (2001). Hepatoprotective And Antioxidant Property Of Andrographis Paniculata (Nees) In Bhc Induced Liver Damage In Mice. *Indian J Exp Biol*, 39(1), 41-46.