

ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG GÂY ĐỘC TẾ BÀO UNG THƯ MÁU CẤP DÒNG TUYẾT CỦA CAO CHIẾT TỪ CÂY LÁ ĐẮNG (*VERNONIA AMYGDALINA* DEL.)

EVALUATE THE CYTOTOXIC EFFECTS OF BITTER LEAF EXTRACT (*VERNONIA AMYGDALINA* DEL.) ON ACUTE MYELOID LEUKAEMIA CELL LINES

Nguyễn Trung Quân¹, Phan Thị Minh Tâm¹, Hoàng Kim Sơn¹, Hoàng Thành Chí², Bùi Thị Kim Lý^{2,3*}

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc Gia Tp. HCM

²Trường Đại học Thủ Dầu Một, Thành phố Thủ Dầu Một, tỉnh Bình Dương

³Viện Nấm và Công nghệ Sinh học, Hà Nội

*Tác giả liên hệ: lybtk@tdmu.edu.vn

(Nhận bài: 31/5/2022; Chấp nhận đăng: 20/7/2022)

Tóm tắt – Cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.) là dược liệu khá phổ biến dùng trong y học dân tộc để chữa một số bệnh trên người. Trong lĩnh vực nghiên cứu khoa học, đây cũng là đối tượng thường xuyên được nghiên cứu, tuy nhiên tác động của cây lên bệnh ung thư máu vẫn chưa được tiến hành nghiên cứu cụ thể. Bằng phương pháp khảo nghiệm độc tính và xác định bằng kỹ thuật nhuộm trypan blue, tác động ức chế của cao chiết từ cây lá đắng lên các dòng ung thư bạch cầu cấp dòng tủy đã được khảo sát. Kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết lá đắng sử dụng dung môi ethanol 96% cho hiệu quả tác động ức chế tốt nhất so với cao chiết ethanol 70%, ethanol 30% và cao nước. Cao chiết ethanol 96% cho thấy độc tính mạnh trên cả 3 dòng tế bào AML biểu hiện bất thường FLT3 gồm THP-1; MOLM-13 và MV4-11 với giá trị IC50 ($\mu\text{g/mL}$) lần lượt là $24,17 \pm 3,33$; $11,45 \pm 2,12$ và $16,08 \pm 1,21$.

Từ khóa – Lá đắng; *Vernonia amygdalina* Del.; khả năng gây độc tế bào; Tế bào ung thư máu cấp; AML.

1. Đặt vấn đề

Ung thư là một trong những vấn đề sức khỏe nghiêm trọng hàng đầu trên toàn thế giới với hơn 19 triệu ca mắc mới và khoảng 10 triệu ca tử vong năm 2020 theo thống kê của GLOBOCAN trên 185 quốc gia và vùng lãnh thổ, số ca mắc mới được dự đoán tăng gấp 1,5 lần trong 20 năm tới [1, 2]. Trong số các nhóm ung thư phổ biến nhất, ung thư máu (còn gọi là lơ-xơ-mi, bệnh máu trắng, bệnh leukaemia hay bệnh ung thư bạch cầu) là nhóm ung thư có tỷ lệ tử vong cao đáng chú ý với 474.519 ca mắc mới và 311.594 ca tử vong trong năm 2020 [2]. Tùy theo mức độ biểu hiện và nguồn gốc ung thư mà bệnh ung thư máu được chia thành 4 nhóm chính bao gồm lơ-xơ-mi cấp dòng tủy, lơ-xơ-mi mạn dòng tủy, lơ-xơ-mi cấp dòng lympho, lơ-xơ-mi mạn dòng lympho [3, 4]. Bệnh lơ-xơ-mi cấp dòng tủy (còn gọi là bệnh AML) là dạng ung thư máu khá phổ biến chiếm khoảng 80% số ca mắc ung thư máu cấp ở người lớn và 15-20% ở trẻ em đặc trưng bởi sự gia tăng số lượng bạch cầu non trong máu ngoại vi lên hơn 20% [4, 5]. Nguyên nhân bệnh sinh được xác định do các đột biến trên DNA, trong đó 45% số ca mắc không phát hiện thấy bất thường trên nhiễm sắc thể đồ mà liên quan đến các đột biến trên gene cụ thể [5, 6]. *FLT3* là 1 gen tiền - sinh ung thư (proto-oncogene) quan trọng gây bệnh sinh AML, thống kê có

Abstract – Bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del.) is widely used in folk medicine to treat a variety of human ailments. This plant has been a frequently studied object in the field of scientific research, but the studies on the effect of the bitter leaf on blood cancer have not been conducted specifically. The effect of the bitter leaf extract on AML cell proliferation was determined by using a trypan blue exclusion assay. The results showed that, the bitter leaf extract using ethanol 96% inhibited the enzyme more effectively than 70% ethanol, 30% ethanol and water extract. The lethality of the ethanol 96% extract was classified as a strong toxicity in 3 AML abnormal cell lines, including THP-1, MOLM-13, and MV4-11 cell lines with IC50 ($\mu\text{g/mL}$) of 24.17 ± 3.33 ; 11.45 ± 2.12 ; and 16.08 ± 1.21 respectively.

Keywords – Bitter leaf; *Vernonia amygdalina* Del.; Cytotoxicity effect; leukemia cells; AML.

khoảng 30% số ca bệnh có biểu hiện bất thường gen này [5, 6]. *FLT3* là một thụ thể thuộc họ protein tyrosine kinase, đóng vai trò quan trọng trong quá trình tồn tại, tăng sinh và biệt hoá của tế bào gốc máu [7]. Năm 1996, Nakao và cộng sự đã phát hiện ra đột biến lặp đoạn (ITD) trên vùng exon 14-15 của gene *FLT3* cho phép protein này có khả năng tự phosphoryl hóa thông qua sự dimer hoá thụ thể dẫn đến sự tăng sinh mất kiểm soát của tế bào [8, 9]. Chính vì vậy, các bất thường liên quan đến đột biến hay biểu hiện vượt quá *FLT3* thường có ý nghĩa quan trọng trong bệnh sinh AML do đó *FLT3* đang trở thành mục tiêu nghiên cứu các giải pháp để điều trị bệnh AML [10].

Trên phát đồ điều trị hiện tại cho ung thư máu, hoá trị và hoá trị kết hợp vẫn là phương pháp điều trị phổ biến, tuy nhiên tác dụng phụ xảy ra trong quá trình điều trị là vấn đề cần giải quyết [11]. Vì thế, công tác nghiên cứu nhằm tìm ra các liệu pháp hay phương thức điều trị thay thế nhằm tăng hiệu quả điều trị và giảm tác dụng phụ vẫn đang được chú trọng tiến hành [12]. Các cây thuốc sử dụng trong y học dân tộc được nhìn nhận như nguồn cung cấp các hợp chất quan trọng trong nghiên cứu ung thư, trên thực tế đã có nhiều thuốc điều trị và thử nghiệm được phân lập từ dược liệu [13, 14].

Cây lá đắng có tên khoa học là *Vernonia amygdalina*

¹ University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City (Nguyen Trung Quan, Phan Thi Minh Tam, Hoang Kim Son)

² Thu Dau Mot University, Thu Dau Mot City, Binh Duong Province (Hoang Thanh Chi, Bui Thi Kim Ly)

³ Institute of Fungal Research and Biotechnology, Hanoi (Bui Thi Kim Ly)

Del., còn gọi là cây mật gấu, phân bố rộng khắp cả nước, đây là đối tượng được sử dụng nhiều trong các bài thuốc dân gian [15, 16]. Bên cạnh đó, cây cũng là đối tượng được nghiên cứu khá phổ biến trên đa phương diện. Tại Việt Nam, các nghiên cứu tập trung vào nội dung khảo sát các hoạt tính sơ bộ, phương pháp tách chiết, mô tả thực vật, v.v [17-25]. Các nghiên cứu quốc tế đã chỉ ra hoạt tính kháng ung thư đáng chú ý của loại dược liệu này trên nhiều dòng tế bào ung thư khác nhau như ung thư vú, tiền liệt tuyến, ung thư gan, v.v [26-30]. Tuy nhiên, các nghiên cứu trên dòng tế bào ung thư máu nói chung và AML nói riêng còn rất hạn chế. Trong nghiên cứu trước đây, khả năng ức chế sự phosphoryl hoá FLT3 tái tổ hợp của cao chiết từ cây lá đắng đã được khảo sát và cho kết quả khả quan [31]. Đây là tiền đề trực tiếp để nhóm tác giả tiến hành thực hiện nghiên cứu khảo sát khả năng ức chế tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu cấp dòng tủy của cao chiết từ cây lá đắng trên các dòng tế bào có biểu hiện bất thường FLT3.

2. Vật liệu và phương pháp

2.1. Vật liệu, tế bào

Mẫu cây lá đắng được thu hái tại tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, được tiến hành định danh bởi TS. Đặng Lê Anh Tuấn, Đại học Khoa học Tự nhiên Tp. Hồ Chí Minh (số voucher là PHH0004908, mẫu lưu tại Bảo tàng Sinh học, trường Đại học Khoa học Tự nhiên TP HCM).

Dòng tế bào sử dụng là dòng AML có biểu hiện bất thường FLT3: Dòng tế bào FLT3 wild-type: THP-1 [32]; Dòng tế bào FLT3-ITD dị hợp tử: MOLM-13 [7, 33-35]; Dòng tế bào FLT3-ITD đồng hợp tử: MV4-11 [7, 35-37].

2.2. Phương pháp chuẩn bị cao chiết

Mẫu lá đắng được rửa sạch với nước cất hai lần sau đó sấy khô ở 40°C cho tới khi khô hoàn toàn. Mẫu lá khô được xay nhuyễn thành bột mịn. Bột dược liệu được làm ẩm với một lượng dung môi vừa đủ trong 4 giờ trước khi bổ sung thêm dung môi tới khi mức dung dịch cao hơn mức bột chiết 1-2 cm. Hỗn hợp được chiết lạnh trong 48 giờ trước khi chuyển sang bình chiết kiệt với dòng chảy dung môi liên tục tốc độ 2-3 giọt/giây. Dịch chiết được cô quay ở 40°C cho tới khi thu được cao khô. Cao chiết được cân và hoà tan với DMSO để thu được dung dịch chiết mẹ 200 mg/mL [38]. Các dung môi sử dụng cho nghiên cứu này bao gồm: Ethanol 96%, ethanol 70%, ethanol 30% và nước cất.

2.3. Phương pháp nuôi cấy tế bào

Dòng tế bào AML được nuôi cấy với môi trường Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 có bổ sung 10% FBS (fetal bovine serum) và 5% penicillin/streptomycin trong tủ nuôi cấy tế bào ở 37°C, 5% CO₂. Tế bào được tiến hành ly tâm và thay môi trường định kì sau 72 giờ và cấy chuyển khi mật độ tế bào chiếm khoảng 80% thể tích nuôi cấy.

2.4. Phương pháp đánh giá độc tính

Tế bào được cấy với mật độ đầu vào là 10⁵ tế bào/mL sau đó cho tiếp xúc với thuốc thử trong 72 giờ. Tỷ lệ tế bào sống sót được xác định bằng phương pháp nhuộm Trypan Blue và đếm trên buồng đếm hồng cầu được mô tả trong nghiên cứu trước đó [39].

2.5. Phương pháp thử nghiệm độc tính theo thời gian

Thí nghiệm được tiến hành tương tự thí nghiệm độc tính. Tế bào được cấy mật độ đầu vào là 10⁵ tế bào/mL và nồng độ cao chiết là 3,13 µg/mL cho dòng MOLM-13 và 6,25 µg/mL cho dòng MV4-11. Số lượng tế bào sống được xác định sau mỗi 24 giờ trong 5 ngày bằng cách hút 20 µL dịch sinh khối huyền phù sau đó đếm bằng phương pháp Trypan Blue. Tế bào được tiếp xúc liên tục với mẫu cao trong suốt 5 ngày thí nghiệm.

2.6. Phương pháp theo dõi hình thái tế bào

Hình thái tế bào được quan sát bằng kính hiển vi soi nổi với độ phóng đại x100 lần.

2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Các số liệu thí nghiệm được thu ít nhất 3 lần. Phương pháp hồi quy phi tuyến tính, phương pháp so sánh thống kê gồm t-test, anova được tiến hành bằng phần mềm Graphpad Prism version 9.0.0. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình cộng ± độ lệch chuẩn.

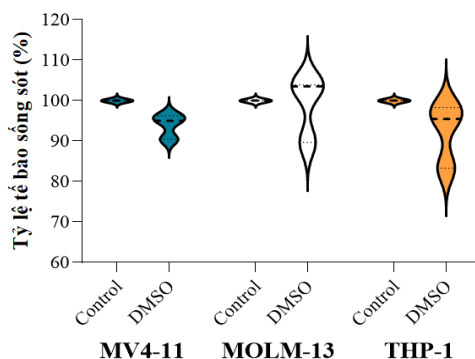
3. Kết quả và thảo luận

3.1. Tác động của dung môi DMSO lên dòng tế bào AML thử nghiệm

Nhằm đảm bảo tính an toàn của dung môi trong quá trình thử nghiệm, nhóm tác giả tiến hành thử nghiệm độc tính của dung môi DMSO dùng pha cao lên sự tăng sinh và phát triển của dòng tế bào THP-1, MOLM-13 và MV4-11. Nồng độ DMSO thử nghiệm là 0,1% tương đương với lượng DMSO có trong nghiệm thức độc tính ở nồng độ cao chiết cao nhất.

Bảng 1. Tác động của dung môi DMSO trên các dòng tế bào AML thử nghiệm

Dòng tế bào	Phần trăm tế bào sống DMSO 0,1%		
	Lần 1	Lần 2	Lần 3
THP-1	83,33	98,35	95,49
MOLM-13	103,50	89,70	103,92
MV4-11	95,00	90,45	96,30



Hình 1. Biểu đồ so sánh thống kê tỷ lệ sống sót của tế bào AML trong điều kiện có và không có tác động của DMSO

Tỷ lệ sống sót của tế bào AML dưới tác động của DMSO được tổng hợp trong Bảng 1. Kết quả cho thấy, tỷ lệ sống sót của tế bào sau 72 giờ tiếp xúc với DMSO 0,1% là hơn 90%. Kết quả so sánh T-test trên từng dòng tế bào cho thấy, không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê giữa lô thử nghiệm và lô đối chứng với giá trị p-value là 0,21; 0,99; 0,38 lần lượt cho dòng tế bào THP-1; MOLM-13; MV4-11.

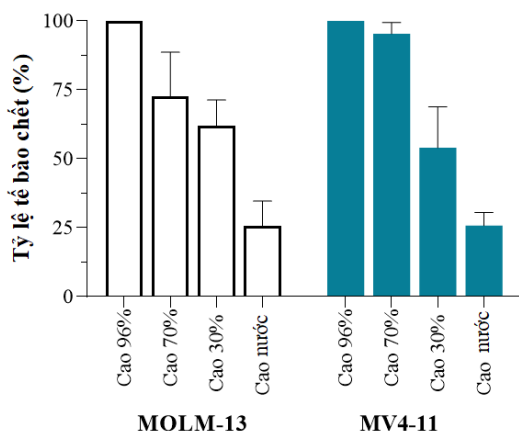
Hình 1 là biểu đồ thống kê so sánh cho thấy, không có sự khác biệt về tỉ lệ tế bào AML sống sót trong điều kiện có và không có tác động của dung môi DMSO 0,1%.

Trong nghiên cứu trước đây trên dòng nguyên bào sợi, DMSO được ghi nhận là có tính an toàn khi sử dụng ở nồng độ 0,1%, có tác dụng kích thích tăng sinh ở nồng độ thấp (0,01% - 0,001%) và chỉ gây độc tính khi nồng độ tác động trên 0,5% trong 4 ngày thử nghiệm [40]. Trên mô hình các tế bào ung thư, sự tác động của DMSO lên các dòng tế bào khác nhau là khác nhau và thể hiện độc tính ức chế ở nồng độ DMSO lớn hơn 1,25% với thời gian thử nghiệm là 2 ngày [41]. Tác động độc tính của DMSO trên dòng tế bào lympho được ghi nhận ở mức 10% cho 24 giờ tác động, 5% cho 120 giờ tác động và nồng độ DMSO ít hơn 2,5% không cho thấy độc tính [42]. Đối với dòng tế bào tủy, RPMI-8226/Dox40, DMSO cho thấy có tác dụng kích thích tăng sinh tế bào ở nồng độ 0,2% [43]. Từ các kết quả phân tích thống kê cho thấy, DMSO không có tác động gây độc lên 3 dòng tế bào AML thử nghiệm trong nghiên cứu này ở mức nồng độ 0,1% do đó dung môi là an toàn và không ảnh hưởng đến các kết quả thí nghiệm trong nghiên cứu.

3.2. Khảo sát tác động của cao chiết tổng số từ lá đắng lên các dòng tế bào AML

Tác động của một loại thuốc lên sự tăng sinh của tế bào được đánh giá bằng giá trị IC50. Đối với cao chiết tổng số từ thực vật, giá trị IC50 tác động lên dòng tế bào có giá trị ít hơn 100 µg/mL được đánh giá là có hiệu quả về độc tính trên tế bào [44, 45]. Trong thử nghiệm này 4 cao chiết tổng số từ cây lá đắng bao gồm cao còn 96%, cao còn 70%, cao còn 30% và cao chiết nước được tiến hành khảo sát độc tính tại mức nồng độ 100 µg/mL trên hai dòng tế bào MOLM-13 và MV4-11.

Kết quả cho thấy, tác động không đồng đều của các cao chiết lên cả hai dòng tế bào, trong đó cao chiết trong ethanol có nồng độ càng cao thì càng cho thấy hiệu quả ức chế tăng sinh. Cao chiết còn 96% cho hiệu quả tác động cao nhất khi không còn tế bào sống sót được ghi nhận trong các nghiệm thức. Cao chiết nước cho hiệu quả ức chế khá tương đồng trên 2 dòng tế bào với tỷ lệ tế bào sống là 25,79% và 25,51% đối với MV4-11 và MOLM-13, tương tự tỷ lệ này cho cao còn 30% là 54,08% và 61,84%, cao còn 70% là 95,36% và 72,51%.

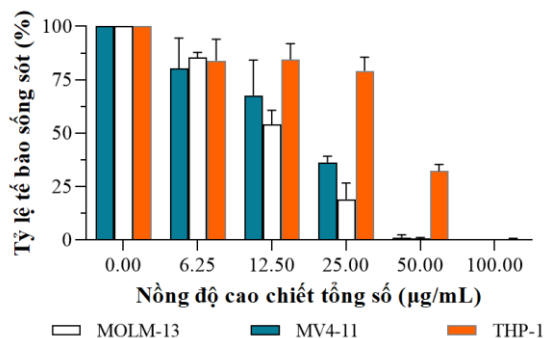


Hình 2. Tác động của các cao chiết tổng số từ lá đắng lên các dòng tế bào ở nồng độ 100 µg/mL

Không có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê trong tác động của các cao chiết tổng số lên tế bào MOLM-13 và MV4-11 với p-value lần lượt là 0,96 (cao nước); 0,49 (cao còn 30%); 0,08 (cao còn 70%). Cao chiết còn 96% là cao chiết có hiệu quả nhất nên được chọn để tiến hành các thí nghiệm tiếp theo, cao chiết còn 96% sẽ được viết tắt là LDE96.

3.3. Nồng độ IC50 của LDE96 trên các dòng tế bào AML

Cao chiết LDE96 được chuẩn bị trong môi trường RPMI 1640 thành dãy các nồng độ từ 100 – 0 µg/mL trong thí nghiệm xác định giá trị IC50. Kết quả sơ bộ cho thấy, theo chiều nồng độ tăng dần, số lượng tế bào chết được ghi nhận càng tăng và hầu như không còn tế bào sống ở nồng độ 100 µg/mL. Quan sát thấy, tế bào MOLM-13 có tính nhạy cảm cao nhất với LDE96 và THP-1 có tính kháng cao nhất.



Hình 3. Tác động của cao chiết LDE96 lên các dòng tế bào AML theo nồng độ

Bằng phương pháp phân tích hồi quy phi tuyến tính theo mô hình $Y=100/(1+(IC50/X)^{HillSlope})$, các giá trị IC50 được xác định và trình bày cụ thể trong Bảng 2. Cao chiết LDE96 thể hiện hoạt tính kháng ung thư mạnh với giá trị IC50 trên cả 3 dòng tế bào thử nghiệm đều dưới ngưỡng 30 µg/mL. Độc tính cao chiết LDE96 được ghi nhận là mạnh nhất lên tế bào MOLM-13 và kém nhất trên dòng tế bào THP-1, p-value = 0,0018. Các giá trị IC50 cho thấy, tác động của cao chiết LDE96 được xếp vào nhóm có độc tính từ vừa tới mạnh đối với sự tăng sinh của tế bào ung thư máu cấp dòng tủy [44, 45]. Theo hướng dẫn của Viện nghiên cứu ung thư quốc gia của Hoa Kỳ (NCI), đối với các cao chiết tổng số có giá trị IC50 trên tế bào ung thư dưới 30 µg/mL sẽ được xếp vào nhóm được liệu có tiềm năng trong điều trị ung thư và cần được nghiên cứu chuyên sâu [44, 45].

Bảng 2. Giá trị IC50 của cao LDE96 trên các dòng tế bào AML

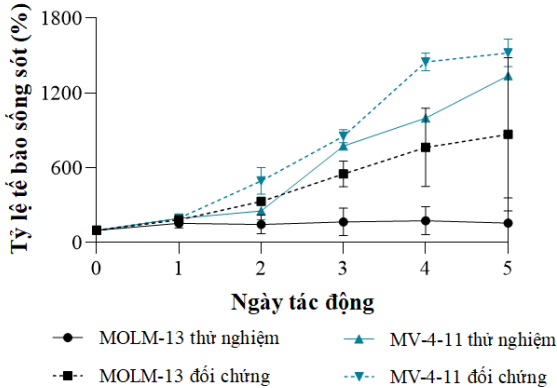
Dòng tế bào	Giá trị IC50 (µg/mL)	
	Trung bình	Độ lệch chuẩn
MOLM-13	11,45	2,12
MV4-11	16,08	1,21
THP-1	24,17	3,33

Sự khác biệt trong tác động của LDE96 lên ba dòng tế bào mang kiểu gene khác nhau của FLT3 cho phép dự đoán về mục tiêu tác động của cao chiết lên sự tăng trưởng của tế bào có thể liên quan đến biểu hiện của protein FLT3 này. THP-1 mang kiểu hình FLT3-WT trong khi MOLM-13 và MV4-11 mang đột biến FLT3-ITD, điều này cho thấy

hiều khả năng FLT3-ITD nhạy cảm với tác động của LDE96 hơn là FLT3-WT. Tuy nhiên, đây chỉ là dự đoán ban đầu, cần phải thực hiện nhiều nghiên cứu chuyên sâu khác để có thể chứng minh giả thuyết này.

3.4. Tác động của LDE96 lên tế bào AML theo thời gian

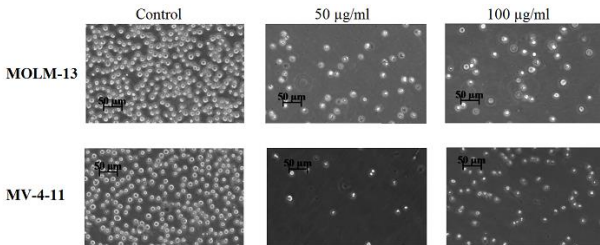
Nhằm kiểm tra sự tác động của LDE96 theo thời gian và sự đáp ứng tác động của các dòng tế bào, hai dòng tế bào MOLM-13 và MV4-11 đã được tiến hành nuôi cấy trong môi trường RPMI 1640 có chứa nồng độ thấp của LDE96 trong vào 5 ngày, số tỷ lệ tế bào sống – chết được tiến hành kiểm tra và ghi nhận sau mỗi 24 giờ.



Hình 4. Tác động của cao chiết LDE96 lên các dòng tế bào AML theo thời gian

Kết quả cho thấy, tác động kìm hãm tăng sinh của cao chiết LDE96 trên cả 2 dòng tế bào thử nghiệm, tuy nhiên tác động trên dòng tế bào MOLM-13 là rõ ràng hơn. Trong vòng 5 ngày thử nghiệm, không có sự khác biệt trong tỷ lệ tế bào sống sót giữa các ngày với nhau đối với nghiệm thức tế bào MOLM-13 có tác động của cao chiết LDE96, p -value > 0,99. Trong khi đó, có sự khác biệt mang ý nghĩa thống kê trong tỷ lệ tăng trưởng tế bào MOLM-13 giữa các ngày trong lô đối chứng, p -value = 0,0143. Kết hợp cùng kết quả độc tính theo nồng độ, nhóm nghiên cứu nhận định tác động ức chế tăng sinh của cao chiết LDE96 là theo thời gian và nồng độ tác động.

3.5. Tác động của LDE96 lên tế bào AML theo thời gian



Hình 5. Tác động của cao chiết LDE96 lên hình thái tế bào

Song song với quá trình thử nghiệm độc tính, sự thay đổi trong hình thái tế bào cũng được tiến hành quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại x100. Các dấu hiệu về hình thái tế bào dưới tác động của tác nhân từ nghiệm phản ánh con đường chết của tế bào [46]. Kết quả quan sát phản ánh sự thay đổi về mật độ tế bào phù hợp với kết quả độc tính ghi nhận, mật độ tế bào giảm dần theo chiều tăng của nồng độ cao chiết. Ở nồng độ cao chiết cao 100 µg/mL, quan sát thấy nhiều mảnh vỡ tế bào và hầu như không còn

tế bào sống sót cho thấy độc tính mạnh của cao chiết. Ở các nồng độ cao chiết thấp từ 50 µg/mL trở xuống, bên cạnh các tế bào chết và mảnh vỡ tế bào, nhóm tác giả còn quan sát thấy các tế bào bị co rút (Hình 5). Các dấu hiệu về co rút tế bào, giảm thể tích tế bào, gián đoạn màng tế bào là các dấu hiệu cho thấy tế bào đang chết theo lập trình (apoptosis) [47, 48]. Song kết quả quan sát chưa phản ánh chính xác được con đường chết của tế bào mà đòi hỏi các nghiên cứu chuyên trong tương lai.

4. Kết luận

Từ các kết quả nghiên cứu trên, nhóm tác giả nhận định dung môi ethanol 96% cho ra cao chiết có hiệu quả tác động ức chế cao nhất trên dòng tế bào AML so với các nồng độ ethanol thử nghiệm khác. Cao chiết ethanol 96% từ cây lá đắng cho thấy độc tính mạnh lên các dòng tế bào AML có biểu hiện bất thường FLT3 phụ thuộc vào liều lượng và thời gian tác động với giá trị IC50 thấp.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.02-2019.50.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] R. L. Siegel, K. D. Miller, H. E. Fuchs, and A. Jemal, "Cancer Statistics, 2021", *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (1), 2021, 7-33.
- [2] H. Sung, J. Ferlay, and R. L. Siegel, "Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries", 71 (3), 2021, 209-249.
- [3] F. Huang, P. Guang, F. Li, X. Liu, W. Zhang, and W. Huang, "AML, ALL, and CML classification and diagnosis based on bone marrow cell morphology combined with convolutional neural network: A STARD compliant diagnosis research", *Medicine*, 99 (45), 2020, e23154-e23154.
- [4] S. M. Hwang, "Classification of acute myeloid leukemia", *Blood research*, 55 (S1), 2020, S1-S4.
- [5] F. A. Lagunas-Rangel, V. Chávez-Valencia, M. Á. Gómez-Guijosa, and C. Cortes-Penagos, "Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis", *International journal of hematology-oncology and stem cell research*, 11 (4), 2017, 328-339.
- [6] T. J. Ley, C. Miller, L. Ding, B. J. Raphael, A. J. Mungall, A. Robertson, et al., "Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia", *N Engl J Med*, 368 (22), 2013, 2059-2074.
- [7] H. Quentmeier, J. Reinhardt, M. Zaborski, and H. G. Drexler, "FLT3 mutations in acute myeloid leukemia cell lines", *Leukemia*, 17 (1), 2003, 120-124.
- [8] M. Nakao, S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, et al., "Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia", *Leukemia*, 10 (12), 1996, 1911-1918.
- [9] D. L. Stirewalt and J. P. Radich, "The role of FLT3 in haematopoietic malignancies", *Nat Rev Cancer*, 3 (9), 2003, 650-665.
- [10] E. Weisberg, C. Boulton, L. M. Kelly, P. Manley, D. Fabbro, T. Meyer, et al., "Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412", *Cancer Cell*, 1 (5), 2002, 433-443.
- [11] C.-Y. Huang, D.-T. Ju, C.-F. Chang, P. Muralidhar Reddy, and B. K. Velmurugan, "A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer", *BioMedicine*, 7 (4), 2017, 23-23.
- [12] A. Pearce, M. Haas, R. Viney, S.-A. Pearson, P. Haywood, C. Brown, et al., "Incidence and severity of self-reported chemotherapy side effects in routine care: A prospective cohort study", *PLoS one*, 12 (10), 2017, e0184360-e0184360.
- [13] R. Hussein and A. El-Anssary, "Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants", ed, 2019.

- [14] H. I. C. Lowe, D. Daley-Beckford, N. J. Toyang, C. Watson, S. Hartley, and J. Bryant, "The Anti-cancer Activity of Vernonia divaricata Sw against Leukaemia, Breast and Prostate Cancers In Vitro", *The West Indian medical journal*, 63 (4), 2014, 285-288.
- [15] I. Oyeyemi, A. Akinlabi, A. Aderiike, A. Aleshinloye, and O. Oyeyemi, "Vernonia amygdalina: A folkloric herb with anthelmintic properties", *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7 2017, 1-7.
- [16] P. Anjarwalla, D. Ofori, R. Jamnadass, P. Stevenson, and P. Smith, "Vernonia amygdalina", 2013, 1-3.
- [17] Hồ Thị Dung, Trần Thị Oanh, Nguyễn Thị Minh Thủy, Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Thu Hằng, and Đ. T. V. Anh, "Nghiên cứu đặc điểm thực vật của dược liệu lá đắng thu hái ở Nghệ An", *Tạp chí Khoa học - Công Nghệ Nghệ An* 12 2018, 30-34.
- [18] Đoàn Thanh Hiếu, Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Nguyễn Thị Mai Hồng, and N. T. T. Huyền, "Nghiên cứu đặc điểm vi học và định tính sơ bộ thành phần hoá học của cây lá đắng thu hái tại Thái Nguyên", *TNU Journal of Science and Technology*, 225 (01), 2020, 150-154.
- [19] N. H. Anh, "Nghiên cứu điều chế cao định chuẩn từ lá cây lá Đắng (*Vernonia amygdalina* Del. Asteraceae)", Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, 2018.
- [20] H. Anh, "Sterols and flavone from the leaves of Vernonia amygdalina Del. growing in Thua Thien Hue", *Vietnam Journal of Science and Technology*, 56, 2018, 681.
- [21] H. Anh, V. Le Ba, L. Lien, P. Cuong, M. Arai, T. Ha, *et al.*, "In vitro study on α -amylase and α -glucosidase inhibitory activities of a new stigmastane-type steroid saponin from the leaves of Vernonia amygdalina", *Natural Product Research*, 2019, 1-7.
- [22] Trần Lý Minh Châu and H. T. P. Liên, "Khảo sát độc tính cấp và tác dụng hạ Lipid máu của cao chiết lá cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del., Asteraceae)", *TNU Journal of Science and Technology*, 226 (10), 2021, 71-75.
- [23] Nguyễn Thị Chi, Phạm Việt Trang, Lê Xuân Tiến, and N. V. Thanh, "Nghiên cứu khả năng kháng oxy hóa và ức chế enzym α -glucosidase của cao chiết từ lá cây lá đắng (*Vernonia amygdalina* Del.), họ Cúc (Asteraceae)", *Tạp chí Dược học*, 58 (7), 2018, 25-29.
- [24] D. C. Duong, N. Y. N. Thi, H. L. J. S. Hoa, T. D. Journal-Engineering, and Technology, "Effect of extraction conditions on the antioxidant activity of Vernonia amygdalina Del.(Asteraceae)", 1 (3), 2018, 37-46.
- [25] N. P. T. Thanh and T. T. Tran, "Investigation of the bioactivities of extracts from Vernonia Amygdalina Del", *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 947 (1), 2021, 012040.
- [26] W. Johnson, P. B. Tchounwou, and C. G. Yedjou, "Therapeutic Mechanisms of Vernonia amygdalina Delile in the Treatment of Prostate Cancer", *Molecules*, 22 (10), 2017,
- [27] O. A. Longe, O. J. Momoh, and I. I. Asoro, "Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of phytochemicals in the root, stem bark and leaf of Vernonia amygdalina", 6 (2), 2017, 35-49.
- [28] P. A. Z. Hasibuan, U. Harahap, P. Sitorus, and D. Satria, "The anticancer activities of Vernonia amygdalina Delile. Leaves on 4T1 breast cancer cells through phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway", *Heliyon*, 6 (7), 2020, e04449.
- [29] F. C. Wong, C. C. Woo, A. Hsu, and B. K. H. Tan, "The anti-cancer activities of Vernonia amygdalina extract in human breast cancer cell lines are mediated through caspase-dependent and p53-independent pathways", *PLoS one*, 8 (10), 2013, e78021-e78021.
- [30] J. Joseph, V. Lim, H. Rahman, H. Othman, and N. Samad, "Anti-cancer effects of Vernonia amygdalina: A systematic review", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 19 2020, 1775-1784.
- [31] Hoang Thanh Chi and B. T. K. Ly, "Screening for the Potent FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) Inhibitors from Vietnamese Traditional Herbal Medicines", *International journal of pharmaceutical research*, 14 (1), 2022, 2890-2900.
- [32] T. Tsuchiya, M. Hagihara, Y. Shimakura, Y. Ueda, B. Gansuud, B. Munkhbat, *et al.*, "The generation of immunocompetent dendritic cells from CD34+ acute myeloid or lymphoid leukemia cells", *Int J Hematol*, 75 (1), 2002, 55-62.
- [33] Y. Matsuo, R. A. MacLeod, C. C. Uphoff, H. G. Drexler, C. Nishizaki, Y. Katayama, *et al.*, "Two acute monocytic leukemia (AML-M5a) cell lines (MOLM-13 and MOLM-14) with interclonal phenotypic heterogeneity showing MLL-AF9 fusion resulting from an occult chromosome insertion, ins(11;9)(q23;p22p23)", *Leukemia*, 11 (9), 1997, 1469-1477.
- [34] T. Taketani, T. Taki, K. Sugita, Y. Furuichi, E. Ishii, R. Hanada, *et al.*, "FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant ALL with MLL rearrangements and pediatric ALL with hyperdiploidy", *Blood*, 103 (3), 2004, 1085-1088.
- [35] Y. Furukawa, H. A. Vu, M. Akutsu, T. Odgerel, T. Izumi, S. Tsunoda, *et al.*, "Divergent cytotoxic effects of PKC412 in combination with conventional antileukemic agents in FLT3 mutation-positive versus -negative leukemia cell lines", *Leukemia*, 21 (5), 2007, 1005-1014.
- [36] F. Kuchenbauer, W. Kern, C. Schoch, A. Kohlmann, W. Hiddemann, T. Haferlach, *et al.*, "Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia", *Haematologica*, 90 (12), 2005, 1617-1625.
- [37] B. Lange, M. Valtieri, D. Santoli, D. Caracciolo, F. Mavilio, I. Gemperlein, *et al.*, "Growth factor requirements of childhood acute leukemia: establishment of GM-CSF-dependent cell lines", *Blood*, 70 (1), 1987, 192-199.
- [38] Nguyễn-Kim-Phi-Phụng, *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Tp. HCM: Nhà xuất bản Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, 2007.
- [39] Nicholas Greco and L. O'Donnel., "Determining cellular viability using Trypan blue. Cellular Therapy: Principle, Method and Regulation," M. A. Bethesda, ed, 2009, 565 - 566.
- [40] M. Singh, "Effect of dimethyl sulfoxide on in vitro proliferation of skin fibroblast cells", 8 2017, 78-82.
- [41] S. Nguyen, H. Nguyen, and K. Truong, "Comparative cytotoxic effects of methanol, ethanol and DMSO on human cancer cell lines", *Biomedical Research and Therapy*, 7 2020, 3855-3859.
- [42] L. de Abreu Costa, M. Henrique Fernandes Ottoni, M. G. Dos Santos, A. B. Meireles, V. Gomes de Almeida, W. de Fátima Pereira, *et al.*, "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- α , IFN- γ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes", *Molecules*, 22 (11), 2017, 1-10.
- [43] J. Wen, Y. Tong, and Y. Zu, "Low Concentration DMSO Stimulates Cell Growth and In vitro Transformation of Human Multiple Myeloma Cells", *British Journal of Medicine and Medical Research*, 5, 2015, 65-74.
- [44] S. Vijayarathna and S. Sasidharan, "Cytotoxicity of methanol extracts of *Elaeis guineensis* on MCF-7 and Vero cell lines", *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2 (10), 2012, 826-829.
- [45] G. Indrayanto, G. S. Putra, and F. Suhud, "Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research", *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 46, 2021, 273-307.
- [46] A. Apraiz, M. D. Boyano, and A. Asumendi, "Cell-centric view of apoptosis and apoptotic cell death-inducing antitumoral strategies", *Cancers*, 3 (1), 2011, 1042-1080.
- [47] F. Doonan and T. G. Cotter, "Morphological assessment of apoptosis", *Methods*, 44 (3), 2008, 200-204.
- [48] M. A. Model and E. Schonbrun, "Optical determination of intracellular water in apoptotic cells", *The Journal of physiology*, 591 (23), 2013, 5843-5849.