

# KHẢO SÁT HOẠT TÍNH CAO CHIẾT METHANOL TỪ *CAMELLIA CUONGIANA* THU HÁI TẠI VƯỜN QUỐC GIA BIDOUP – NÚI BÀ TRÊN TẾ BÀO UNG THƯ BIỂU MÔ GAN HCC-J5

EVALUATE THE EFFECT OF *CAMELLIA CUONGIANA* METHANOL EXTRACT COLLECTED IN BIDOUP - NUI BA NATIONAL PARK IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA HCC-J5 CANCER CELLS

Phạm Hoài Linh<sup>1</sup>, Bùi Thị Kim Lý<sup>2</sup>, Hoàng Thành Chí<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Thủ Dầu Một, Việt Nam

\*Tác giả liên hệ / Corresponding author: chiht@tdmu.edu.vn

(Nhận bài / Received: 04/02/2023; Sửa bài / Revised: 17/3/2023; Chấp nhận đăng / Accepted: 21/3/2023)

**Tóm tắt** – *Camellia cuongiana* là loài đặc hữu ở Việt Nam được phát hiện tại Vườn Quốc Gia Bidoup – Núi Bà. Đến nay, vẫn chưa có công bố khoa học trong nước và ngoài nước khảo sát khả năng kháng ung thư của loài này. Nghiên cứu được tiến hành nhằm đánh giá khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào, di chuyển và tạo khối u của cao chiết methanol từ *Camellia cuongiana* trên mô hình tế bào ung thư biểu mô gan (HCC-J5). Kết quả cho thấy, giá trị IC50 tương ứng với dòng tế bào lớn hơn 100 µg/mL. Nhuộm Wright-Giemsa cho thấy, tế bào bị ức chế tăng sinh dưới tác động của sự chết theo chương trình hoặc chết hoại tử. Ngoài ra, cao chiết còn ức chế tạo cụm hơn 50% tế bào ung thư so với đối chứng tại nồng độ 50 µg/mL. Khả năng di chuyển của các tế bào ung thư cũng bị ức chế khi xử lý ở các nồng độ 12,5 và 25 µg/mL.

**Từ khóa** – *Camellia cuongiana*; HCC-J5; ung thư gan; sự chết theo chương trình

## 1. Đặt vấn đề

Theo các thống kê, ung thư thuộc nhóm nguyên nhân gây tử vong hàng đầu và nó được coi là gánh nặng của hệ thống y tế ở các quốc gia đặc biệt là các nước đang phát triển như Việt Nam [1]. Các phương pháp tiếp cận phổ biến được sử dụng để điều trị ung thư bao gồm hóa trị, xạ trị, phẫu thuật, liệu pháp miễn dịch. Trong đó, kết hợp giữa phẫu thuật và hóa trị vẫn là phác đồ thông dụng nhất được sử dụng. Các thuốc hóa trị thường được tổng hợp hóa học và các tác dụng phụ của thuốc đối với sức khỏe người bệnh là rất nghiêm trọng [2, 3]. Do đó, việc phát triển các phương pháp điều trị ung thư mới vẫn đang được tiếp tục. Các hợp chất có nguồn gốc từ tự nhiên đang là hướng tiếp cận khả thi. Với nguồn tài nguyên thực vật chưa được khám phá toàn bộ, tiềm năng của hướng nghiên cứu này vẫn còn hiện hữu rõ ràng.

Việt Nam nằm trên vùng khí hậu nhiệt đới ôn hòa, nên sở hữu thảm thực vật phong phú và chưa được khám phá trọn vẹn. Những loài mới được phát hiện và công bố ở Việt Nam ít được quan tâm nghiên cứu về hoạt tính sinh học mà đặc biệt là hoạt tính kháng ung thư. *Camellia cuongiana* Orel & Curry lần đầu tiên được ghi nhận bởi nhà nghiên cứu Trương Quang Cường cùng với Orel và Anthony

**Abstract** – *Camellia cuongiana* is endemic to Vietnam, discovered in Bidoup - Nui Ba National Park. Thus far, there have been no scientific publications investigating the anti-cancer ability of this species. The study was conducted to evaluate the inhibition of cell proliferation, migration and colony-formation of the methanol extract from *Camellia cuongiana* in a hepatocellular carcinoma (HCC-J5) cell model. The IC50 value greater than 100 µg/mL. Wright-Giemsa staining shows that, cells are inhibited from proliferation under programmed cell death or necrosis. In addition, the extract inhibited colony-formation by more than 50% of cancer cells compared with the control at a concentration of 50 µg/mL. The migration of cancer cells was also inhibited when treated at concentrations of 12.5 and 25 µg/mL.

**Keywords** – *Camellia cuongiana*; HCC-J5; hepatocellular carcinoma; apoptosis

Stephen Curry vào ngày 05/11/2012 [4, 5]. Loài này được thu thập từ một quần thể gồm khoảng 10 cây trưởng thành tại vị trí phát hiện thuộc vườn quốc gia. Sau đó, loài này đã được xác nhận là loài mới trên thế giới và là loài đặc hữu ở Việt Nam và danh pháp là *Camellia cuongiana* Orel & Curry [5, 6].

Theo đánh giá thực tế quần thể loài đang hiện hữu tại vườn quốc gia, *Camellia cuongiana* được sắp xếp vào nhóm “Ít quan tâm” (Least concern) theo phân nhóm của Sách Đỏ của Liên minh Bảo tồn Thiên nhiên Quốc tế [4]. Như vậy loài này có nguy cơ tuyệt chủng thấp, nhưng chúng vẫn quan trọng về mặt đa dạng sinh học toàn cầu. Việc đưa *Camellia cuongiana* vào Sách Đỏ cho phép các nhà nghiên cứu theo dõi tình trạng thay đổi của đa dạng sinh học của loài nhằm có các kế hoạch bảo tồn thích hợp để ngăn chúng bị đe dọa tuyệt chủng trong tương lai.

Hoạt tính kháng ung thư ở chi *Camellia* đã được nghiên cứu và công bố rộng rãi theo thời gian. Các thành phần chính mang lại hoạt tính kháng ung thư cho chi này chủ yếu thuộc nhóm polyphenol mà được nghiên cứu sâu rộng nhất là catechin. Catechin chiếm khoảng từ 25-35% tổng trọng lượng khô trong trà tươi [7], bao gồm các hợp chất chính như (+)- catechin, (-)- epicatechin, (+)- gallicocatechin,

<sup>1</sup> Vietnam National University, Ho Chi Minh City - University of Natural Sciences, Vietnam (Pham Hoai Linh)

<sup>2</sup> Thu Dau Mot University, Vietnam (Bui Thi Kim Ly, Hoang Thanh Chi)

(-)- epicatechin gallate, (-)- epigallocatechin, và (-)- epigallocatechin gallate (EGCG). Trong đó, EGCG là đối tượng được nghiên cứu cho thấy, có nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng và được ứng dụng nhiều nhất. Catechin đã được nghiên cứu cho thấy, có nhiều tiềm năng trong điều trị ung thư thông qua ức chế tăng sinh tế bào ung thư, cảm ứng quá trình apoptosis, và ức chế sự di căn của khối u và hình thành mạch [8]. Các cơ chế liên quan đến tính kháng ung thư của catechin bao gồm hoạt động chống oxy hóa, tương tác với enzym và điều hòa các con đường tín hiệu liên quan đến sự phát triển của khối u [9].

Tuy nhiên, thành phần hóa học của các loại trà biến đổi rất phức tạp, và thường phụ thuộc vào vị trí địa lý, thổ nhưỡng, chế độ dinh dưỡng. Do đó, những loại trà khác nhau thường mang những hoạt tính sinh học khác nhau. *C.camellia* hiện chưa có các nghiên cứu hoạt tính sinh học được công bố, do đó nghiên cứu thực hiện nhằm bước đầu xác định hoạt tính kháng ung thư cao chiết methanol từ *Camellia cuongiana* trên tế bào ung thư biểu mô gan HCC-J5.

## 2. Vật liệu và phương pháp

### 2.1. Phương pháp thu mẫu và chuẩn bị cao chiết

*Camellia cuongiana* được thu hái tại Vườn Quốc Gia Bidoup -Núi Bà và được định danh bởi Phòng Mỹ Trung. Lá trà được thu hái, rửa sạch, sấy khô ở 45°C, 4 giờ và xay thành bột mịn, bảo quản ở 4°C.

200g bột được ngâm với 200mL dung môi methanol, ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ dịch chiết được thu nhận và bổ sung lại dung môi methanol vào bình chiết như trên, quá trình được lặp lại 5 lần. Dịch chiết được lọc qua giấy lọc và tiến hành cô quay thu cao chiết thô. Sau đó, cao chiết được hòa tan với DMSO để thu dung dịch mẹ nồng độ 250mg/mL và bảo quản ở -20°C [10].

### 2.2. Tế bào và phương pháp nuôi cấy

Dòng tế bào HCC-J5 (ung thư biểu mô gan) được cung cấp bởi TS.BS Huỳnh Thanh Tuấn (Bệnh viện Tâm Anh). Tế bào được nuôi cấy với môi trường Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), có bổ sung 10% fetal bovine serum và 1% Penicillin-Streptomycin (100U/mL), điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Khi tế bào phủ lớp đơn đến 80% bề mặt đĩa nuôi cấy, cấy chuyển tế bào được thực hiện với trypsin 0,05%.

### 2.3. Khảo sát khả năng ức chế tăng sinh tế bào bằng phương pháp nhuộm MTT

Các tế bào sống có khả năng chuyển hóa thuốc nhuộm MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid) thành các sản phẩm formazan có màu tím [11]. Tế bào HCC-J5 nuôi ở mật độ  $1 \times 10^5$  tế bào/mL và được xử lý với cao chiết với dãy nồng độ từ 0 đến 200µg/mL, nuôi cấy 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. DMSO được bổ sung vào giếng đối chứng. Sau 72 giờ, thay môi trường cũ bằng 200µL môi trường không huyết thanh và 20µL dung dịch MTT, ủ 3 giờ ở 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Hút bỏ môi trường cũ và bổ sung 100µL DMSO. Đo độ hấp thụ quang học ở bước sóng 490nm và bước sóng tham chiếu 630nm [12].

$$\text{Tỉ lệ tế bào sống (\%)} = \frac{A_{XL} - A_0}{A_{DC} - A_0} \times 100$$

Trong đó,  $A_{XL}$  là giá trị OD của mẫu xử lý,  $A_{DC}$  là giá trị OD của mẫu đối chứng và  $A_0$  là giá trị OD của mẫu trắng.

### 2.4. Nhuộm Wright-Giemsa xác định hình thái tế bào

Tế bào xử lý được nhuộm Wright-Giemsa với cao chiết ở nồng độ 150 µg/mL để quan sát rõ hình thái nhân và tế bào chất [13]. Cố định tế bào với ethanol 100%, phủ thuốc nhuộm Wright-Giemsa và đệm phosphate trong 1 phút. Rửa lại mẫu nhuộm với nước cất, để khô tự nhiên và quan sát dưới kính hiển vi soi ngược Olympus CK2 (Trinocular), vật kính 20X.

### 2.5. Thử nghiệm ức chế tạo khúm (clonogenic assays)

Thử nghiệm được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của cao chiết *Camellia cuongiana* đến khả năng tạo cụm của các tế bào ung thư. 100 đến 200 tế bào được nuôi cấy trong đĩa 6 giếng và bổ sung thêm cao chiết nồng độ 25 và 50 µg/mL, DMSO được bổ sung vào giếng đối chứng. Tế bào được nuôi trong điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub> từ 1 đến 3 tuần, cho đến khi các cụm tế bào được hình thành trong giếng đối chứng [14]. Sau đó, nhuộm đĩa với dung dịch crystal violet 0,2% và hình ảnh được thu nhận. Hình ảnh được chuyển về định dạng 8-bit và phân tích bằng công cụ analyze particles của ImageJ.

### 2.6. Thử nghiệm ức chế xâm lấn (scratch assay)

Hiện tượng di chuyển của tế bào thường đặc trưng cho quá trình tăng sinh, di cư hay di căn của tế bào [15]. Các tế bào được nuôi cấy dưới dạng đơn lớp trong môi trường nuôi cấy DMEM (10% FBS và 1% Penicillin-Streptomycin) cho đến khi độ bao phủ đạt 70–80% diện tích đĩa nuôi cấy. Sau đó, hút bỏ môi trường cũ và dùng đầu pipet 200µL rạch một đường, bổ sung thêm cao chiết. Tế bào được nuôi trong điều kiện 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Hình ảnh được thu nhận ở các thời điểm 0 giờ, 24 giờ [15]. Diện tích khoảng trống ở các thời điểm được xác định bằng công cụ Measure của phần mềm ImageJ. Tỉ lệ tế bào xâm lấn được xác định dựa trên phần diện tích chênh lệch giữa mốc thời điểm 0 giờ và 24 giờ [16].

$$\text{Tỉ lệ tế bào xâm lấn (\%)} = \frac{D_{0h} - D_{24h}}{D_{0h}} \times 100$$

Trong đó,  $D_{0h}$  là diện tích (mm<sup>2</sup>) khoảng trống ở mốc thời điểm 0 giờ,  $D_{24h}$  là diện tích khoảng trống mốc ở thời điểm 24 giờ. Khả năng xâm lấn của cao chiết sau đó được tính tỉ lệ so với mẫu đối chứng.

### 2.7. Phương pháp phân tích số liệu

Các thí nghiệm được lặp lại ít nhất 3 lần. Số liệu được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (mean ± SD). Phương pháp nội suy, phương pháp so sánh thống kê anova và kiểm định Turkey được tiến hành bằng phần mềm Graphpad Prism version 8.0 (với giá trị P - value < 0,05 được coi là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê).

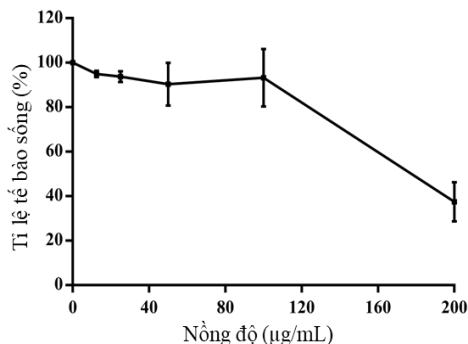
## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Khả năng ức chế tăng sinh tế bào

Cao chiết *Camellia cuongiana* được khảo sát tác động lên sự tăng trưởng của tế bào ung thư biểu mô gan, theo dãy nồng độ dịch chiết từ 12,5 µg/mL; 25 µg/mL; 50 µg/mL; 100 µg/mL; 200µg/mL.

Kết quả cho thấy, theo chiều tăng dần nồng độ cao

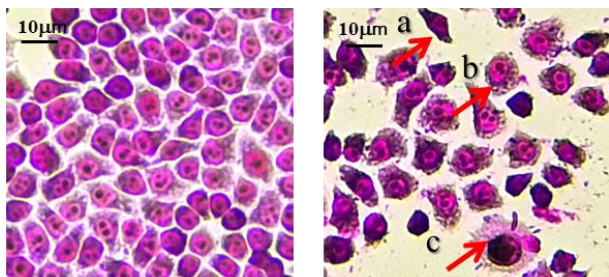
chiết, tỉ lệ tế bào ung thư sống giảm dần (Hình 1), và giảm mạnh ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ . Giá trị nồng độ cao chiết gây chết 50% số tế bào (IC50) lớn hơn 100  $\mu\text{g/mL}$ .



**Hình 1.** Tác động của cao chiết lên tỉ lệ tế bào HCC-J5

### 3.2. Thay đổi hình thái tế bào khi xử lý với cao chiết

Dung dịch thuốc nhuộm Wright bao gồm hai thành phần chính là Eosin Y và methylene blue. Trong đó, methylene blue có khả năng bám vào các nucleic acid có trong nhân tế bào, giúp phân biệt rõ nhân và tế bào chất. Tế bào được xử lý với cao chiết *Camellia cuongiana* ở nồng độ 150  $\mu\text{g/mL}$  và DMSO trong 72 giờ và thực hiện phương pháp nhuộm như đã đề cập ở trên. Kết quả hình ảnh được thu nhận bằng kính hiển vi quang học với độ phóng đại 200 lần. Quan sát được các giếng thử nghiệm có hiện tượng gây độc lên tế bào, tế bào thay đổi rõ ràng về kích thước và hình dạng so với giếng đối chứng (Hình 2).



**Hình 2.** Tác động của cao chiết đến hình thái tế bào.

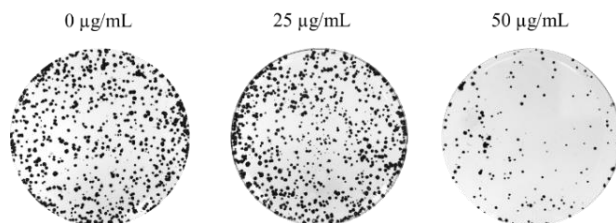
Hình bên trái được ghi nhận ở nhóm tế bào đối chứng và hình bên phải được ghi nhận ở nhóm tế bào xử lý

Các hình thái bất thường quan sát thấy, bao gồm tế bào hoặc nhân tế bào co nhỏ, không còn màng tế bào nguyên vẹn gây rò rỉ tế bào chất, có nhiều mảnh vụn tế bào xuất hiện trong môi trường. Hình thái chết của tế bào từ lâu đã được biết đến là có liên quan mật thiết đến cách thức chết của tế bào [17]. Dấu hiệu apoptosis sớm có thể quan sát được là sự tách rời, mất khả năng liên kết giữa các tế bào với nhau (Hình 2b). Hiện tượng này có thể do cơ chế hình thành vòng actin và myosin bao quanh nhằm tách các tế bào apoptosis khỏi các tế bào khỏe mạnh [18]. Các thể apoptotic quan sát được trong mẫu nhuộm cho thấy, cao chiết có cảm ứng đến sự chết theo chương trình của các tế bào (Hình 2b). Các tế bào ở giai đoạn apoptosis muộn hơn quan sát được ở dạng tế bào bị co nhỏ lại và nhuộm đậm màu thuốc nhuộm (Hình 2a). Bên cạnh đó, một số kiểu hình tế bào chết hoại tử (necrosis) như rò rỉ màng tế bào cũng xuất hiện (Hình 2c). Tuy nhiên, để xác định chính xác được cách thức cảm ứng chết của cao chiết cần có các phương pháp bổ sung khác, do việc hình thái tế bào chết

theo chương trình cũng có sự trùng lặp với hình thái tế bào hoại tử [19].

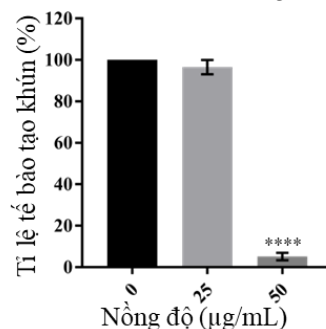
### 3.3. Khả năng ức chế tạo khúm của cao chiết

Nghiên cứu sự tạo khúm trên mô hình tế bào ung thư là một phương pháp gián tiếp trong khảo sát khả năng ức chế tạo u bướu của tế bào ung thư [14]. Cao chiết được bổ sung ở nồng độ 25 và 50  $\mu\text{g/mL}$ . Sau 10 đến 14 ngày, tùy vào từng dòng tế bào, giếng đối chứng tạo được các cụm có khoảng 50 tế bào khi đếm trực tiếp dưới kính hiển vi, thí nghiệm sẽ dừng và ghi nhận kết quả (Hình 3). Kết quả hình ảnh cho thấy, khi xử lý với cao chiết, các cụm tế bào hình thành ít hơn so với khi không xử lý cao chiết.



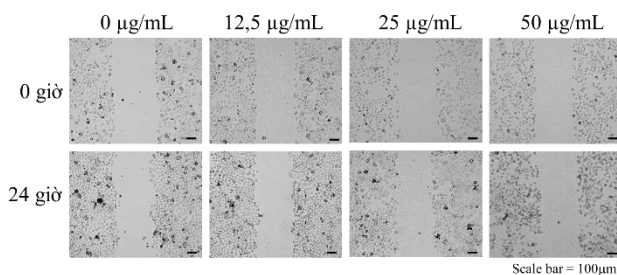
**Hình 3.** Khả năng ức chế tạo khúm của cao chiết

Phân tích hình ảnh với phần mềm ImageJ cho thấy, tỉ lệ tế bào hình thành khúm ở các dòng tế bào (Hình 4). Cao chiết ở nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$  ức chế hơn 90% khả năng tạo khúm của tế bào ung thư, khác biệt đáng kể so với đối chứng ( $p < 0,001$ ). Khảo sát đã thực hiện trước đó cho thấy, 10  $\mu\text{M}$  ECGC có khả năng ức chế 40,4% sự hình thành khúm của tế bào ung thư biểu mô gan SMMC-7721 [20]. Ngoài ra, các hợp chất catechin cũng đã được tìm thấy có khả năng ức chế sự di căn một số loại ung thư khác như ung thư đại trực tràng, ung thư bàng quang, ung thư phế quản [21-23]. ECGC là một polyphenol phổ biến trong thành phần hóa học của cây thuộc chi *Camellia*, do đó nhóm hợp chất này có khả năng góp phần cho hoạt tính ức chế di căn của cao chiết *Camellia cuongiana*.



**Hình 4.** Tỉ lệ tế bào tạo khúm dưới tác động của cao chiết

### 3.4. Khả năng ức chế xâm lấn

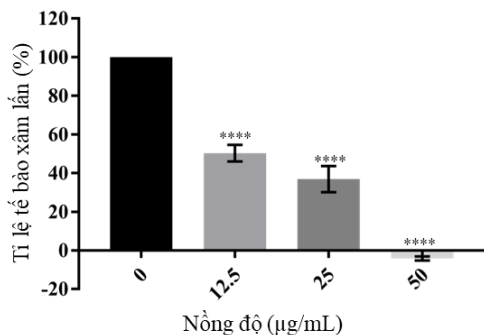


Scale bar = 100 $\mu\text{m}$

**Hình 5.** Khả năng ức chế tế bào ung thư di chuyển của cao chiết

Thử nghiệm được thực hiện bằng cách dùng đầu pipet tạt ra một đường trong giếng nuôi cấy, và khoảng trống có xu hướng được lấp lại bằng sự di chuyển của tế bào và phát triển về phía trung tâm của khoảng trống. Kết quả hình ảnh thu nhận được ghi nhận ở thời điểm 0 giờ và 24 giờ khi xử lý cao chiết ở các nồng độ 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ; 25  $\mu\text{g/mL}$ ; 50  $\mu\text{g/mL}$  (Hình 5).

Ở cả 3 nồng độ thử nghiệm đều cho thấy *Camellia cuongiana* ức chế sự di chuyển của các tế bào ung thư gan so với đối chứng, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ). Ở nồng độ 50  $\mu\text{g/mL}$ , các tế bào bắt đầu chết khi xử lý với cao chiết ở các nồng độ lớn. Vì vậy diện tích vết rạch lớn hơn so với thời điểm 0 giờ, dẫn đến tỉ lệ tế bào xâm lấn bé hơn 0%. Kết quả thử nghiệm cũng thống nhất với một số nghiên cứu trước đó. Nghiên cứu thực hiện với dịch chiết nước *C. sinensis* cũng cho thấy khả năng ức chế sự di chuyển của các tế bào ung thư vú [24]. Ngoài ra, ECGC cũng có khả năng ức chế sự di cư của 28,9% tế bào SMMC-7721 [20]. Một số nghiên cứu về cơ chế cho thấy các hợp chất thuộc nhóm catechin có khả năng ức chế sự tổng hợp của một số matrix metalloproteinases (MMPs), nhóm protein có vai trò quan trọng trong quá trình xâm lấn và hình thành mạch dẫn đến sự di căn của các khối u [25].



Hình 6. Tác động của cao chiết *Camellia cuongiana* đến sự di chuyển của tế bào HCC-J5

#### 4. Kết luận

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dịch chiết methanol từ cây *Camellia cuongiana* có khả năng ức chế tăng sinh của các tế bào ung thư biểu mô gan HCC-J5 với giá trị IC50 lớn hơn 100  $\mu\text{g/mL}$ . Quan sát hình thái cho thấy, các tế bào ung thư bị tác động qua sự chết theo chu trình của tế bào hoặc hoại tử. Nghiên cứu cũng cho thấy cao chiết *Camellia cuongiana* có tiềm năng ức chế sự tạo cụm và sự di chuyển của các tế bào ung thư.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] F. Bray, M. Laversanne, E. Weiderpass, and I. Soerjomataram, "The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide", *Cancer*, vol. 127, no. 16, pp. 3029-3030, 2021.
- [2] J.-J. Monsuez, J.-C. Charniot, N. Vignat, and J.-Y. Artigou, "Cardiac side-effects of cancer chemotherapy", *International journal of cardiology*, vol. 144, no. 1, pp. 3-15, 2010.
- [3] R. R. Love, H. Leventhal, D. V. Easterling, and D. R. Nerenz, "Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy", *Cancer*, vol. 63, no. 3, pp. 604-612, 1989.
- [4] G. Orel and A. S. Curry, *In pursuit of hidden camellias: 32 new 'Camellia' species from Vietnam and China*. Orel & Curry, 2015.
- [5] IPNI. The International Plant Names Index [Online]. Available: <https://www.ipni.org/n/60469403-2> [Accessed February 01, 2023]
- [6] V. Quach, V. Luong, V. Doudkin, D. Bui, and N. Duy, "Diversity of the genus *Camellia* L. (Theaceae) in Lam Dong Province, Vietnam", *Academia Journal of Biology*, vol. 43, no. 4, pp. 129-138, 2021.
- [7] D. A. Balentine, S. A. Wiseman, and L. C. Bouwens, "The chemistry of tea flavonoids", *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, vol. 37, no. 8, pp. 693-704, 1997.
- [8] Y. Yu, Y. Deng, B.-m. Lu, Y.-x. Liu, J. Li, and J.-k. Bao, "Green tea catechins: a fresh flavor to anticancer therapy", *Apoptosis*, vol. 19, no. 1, pp. 1-18, 2014.
- [9] Z. Cheng *et al.*, "A review on anti-cancer effect of green tea catechins", *Journal of Functional Foods*, vol. 74, p. 104172, 2020.
- [10] N. K. P. Phung, *Methods for Isolation of Organic Compounds*, National University Publishing House Ho Chi Minh City, 2007, pp. 73-78.
- [11] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, vol. 65, no. 1-2, pp. 55-63, 1983.
- [12] D. Akilbekova, M. Shaimerdenova, S. Adilov, and D. Berillo, "Biocompatible scaffolds based on natural polymers for regenerative medicine", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 114, pp. 324-333, 2018.
- [13] A. Haque, A. Das, L. Hajiaghamohseni, A. Younger, N. Banik, and S. Ray, "Induction of apoptosis and immune response by all-trans retinoic acid plus interferon-gamma in human malignant glioblastoma T98G and U87MG cells", *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, vol. 56, pp. 615-625, 2007.
- [14] N. A. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman, and C. v. Bree, "Clonogenic assay of cells in vitro", *Nat Protoc*, vol. 1, no. 5, 2315-2319, 2006.
- [15] C.-C. Liang, A. Y. Park, and J.-L. Guan, "In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro", *Nature protocols*, vol. 2, no. 2, pp. 329-333, 2007.
- [16] A. Grada, M. Otero-Vinas, F. Prieto-Castrillo, Z. Obagi, and V. Falanga, "Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay", *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 137, no. 2, pp. e11-e16, 2017.
- [17] P. G. Clarke and S. Clarke, "Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena", *Anatomy and embryology*, vol. 193, no. 2, pp. 81-99, 1996.
- [18] J. Rosenblatt, M. C. Raff, and L. P. Cramer, "An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism", *Current biology*, vol. 11, no. 23, pp. 1847-1857, 2001.
- [19] C. Kitanaka and Y. Kuchino, "Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology", *Cell Death & Differentiation*, vol. 6, no. 6, pp. 508-515, 1999.
- [20] D. Z. Wei, J. Y. Yang, J. W. Liu, and W. Y. Tong, "Inhibition of Liver Cancer Cell Proliferation and Migration by a Combination of (-)-Epigallocatechin-3- Gallate and Ascorbic Acid", *Journal of Chemotherapy*, vol. 15, no. 6, pp. 591-595, 2003.
- [21] K. Luo, J. Xia, B. Cheng, H. Gao, L. Fu, and X. Luo, "Tea polyphenol EGCG inhibited colorectal-cancer-cell proliferation and migration via downregulation of STAT3. Gastroenterol Rep (Oxf). 2021; 9 (1): 59-70", ed: PUBMED.
- [22] K.-W. Luo, W.-Y. Lung, X.-L. Luo, and W.-R. Huang, "EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/AKT pathway", *Oncotarget*, vol. 9, no. 15, p. 12261, 2018.
- [23] S. Hazgui *et al.*, "Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibits the migratory behavior of tumor bronchial epithelial cells", *Respiratory Research*, vol. 9, no. 1, p. 33, 2008.
- [24] R. A. Santos *et al.*, "Green Tea (*Camellia sinensis*) Extract Induces p53-Mediated Cytotoxicity and Inhibits Migration of Breast Cancer Cells", *Foods*, vol. 10, no. 12, p. 3154, 2021.
- [25] S. Garbisa, S. Biggin, N. Cavallarin, L. Sartor, R. Benelli, and A. Albini, "Tumor invasion: molecular shears blunted by green tea", *Nat Med*, vol. 5, no. 11, p. 1216, 1999.