

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐẶNG NGỌC SÁNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ XÁC ĐỊNH
HOẠT TÍNH CỦA GYPENOSIDE TỪ NUÔI
CÂY TẾ BÀO CÂY GIẢO CỔ LAM
(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Huế, 2026

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

ĐẶNG NGỌC SÁNG

NGHIÊN CỨU THU NHẬN VÀ XÁC ĐỊNH
HOẠT TÍNH CỦA GYPENOSIDE TỪ NUÔI
CÂY TẾ BÀO CÂY GIẢO CỔ LAM
(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Người hướng dẫn khoa học
PGS.TS. TRẦN QUỐC DUNG
TS. HOÀNG TẤN QUẢNG

Huế, 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của chúng tôi. Các kết quả nghiên cứu, số liệu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được sử dụng để bảo vệ cho bất kỳ học vị nào trước đây. Các số liệu đã được công bố trên các Tạp chí, báo cáo Hội nghị chuyên ngành với sự đồng ý và chấp thuận của các đồng tác giả. Tôi cũng cam kết đã ghi rõ nguồn gốc tất cả các thông tin, số liệu, và tài liệu tham khảo sử dụng trong luận án. Mọi sự hỗ trợ, giúp đỡ trong quá trình thực hiện luận án đều đã được trân trọng ghi nhận và cảm ơn đầy đủ.

Nếu có bất kỳ vi phạm nào liên quan đến tính trung thực và bản quyền của luận án, tôi xin chịu hoàn toàn trách nhiệm theo quy định của đơn vị đào tạo.

Tác giả luận án

Đặng Ngọc Sáng

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành Luận án này, tôi xin gửi lời cảm ơn đặc biệt đến PGS. TS. Trần Quốc Dung và TS. Hoàng Tấn Quảng, những người Thầy đã hướng dẫn tận tình cho tôi kể từ khi nhập học đến khi hoàn thành Luận án.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Ban lãnh đạo, Phòng Nghiên cứu Khoa học, Đào tạo và hợp tác quốc tế, Bộ môn Sinh học và Công nghệ sinh học ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế đã tạo mọi điều kiện thuận lợi về thời gian cũng như hỗ trợ tối đa về mặt vật chất, kiến thức cho tôi hoàn thành luận án.

Xin được gửi lời cảm ơn tới các đồng nghiệp và các bạn học viên, sinh viên tại Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, đặc biệt là tại Phòng thí nghiệm công nghệ Gen, TS. Nguyễn Anh Tuấn, khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế đã giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện đề tài, xin chân thành cảm ơn những đồng nghiệp, học viên, sinh viên là đồng tác giả của các công trình đã công bố. Trong quá trình học tập tại Viện, tôi là sản phẩm đào tạo và đã nhận được sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài KHCN cấp Bộ Giáo dục và Đào tạo (mã số B2019-DHH-562-09 do TS. Hoàng Tấn Quảng làm chủ nhiệm) và nhóm Nghiên cứu mạnh cấp Đại học Huế (mã số NCM.DHH.2020.12 do TS. Hoàng Tấn Quảng làm trưởng nhóm), tôi xin gửi lời cảm ơn những sự hỗ trợ to lớn này.

Xin cảm ơn Ban Giám đốc, Ban Đào tạo Sau đại học của Đại học Huế; Ban lãnh đạo Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế; Ban giám hiệu, thầy cô giáo tổ Sinh – Công nghệ nông nghiệp, Trường THPT chuyên Võ Nguyên Giáp, Quảng Bình đã có nhiều giúp đỡ quý báu, tạo mọi điều kiện tốt nhất để chúng tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến bố, mẹ và các người thân trong gia đình đã tạo điều kiện tốt nhất cả về vật chất lẫn tinh thần cho tôi trong suốt quá trình thực hiện Luận án.

Cuối cùng, xin cảm ơn các đồng nghiệp, bạn bè đã nhiệt tình động viên, hỗ trợ chúng tôi hoàn thành luận án.

Huế, ngày 28 tháng 1 năm 2026

Tác giả

Đặng Ngọc Sáng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	I
LỜI CẢM ƠN	II
MỤC LỤC	IV
DANH MỤC CÁC BẢNG	VII
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	IX
MỞ ĐẦU	1
1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI.....	1
2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU	2
3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU	3
4. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU	3
5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI	4
6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	4
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	6
1.1. CÂY GIẢO CỔ LAM.....	6
1.1.1. Nguồn gốc và phân bố	6
1.1.2. Phân loại và đặc điểm thực vật học	6
1.1.3. Điều kiện sinh thái	7
1.1.4. Thành phần hoá học của cây Giảo cổ lam	7
1.1.5. Tác dụng dược lý của cây Giảo cổ lam.....	9
1.2. SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ NUÔI CẤY TẾ BÀO	11
1.2.1. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật	11
1.2.2. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào.....	13
1.2.3. <i>Chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào</i>	14
1.3. ELICITOR.....	15
1.3.1. Khái niệm.....	15
1.3.2. Phân loại.....	16
1.3.3. Cơ chế tác dụng của elicitor.....	17
1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kích kháng	18
1.3.5. Sản xuất hợp chất thứ cấp ở <i>thực vật có bổ sung elicitor</i>	19
1.4. CÁC NGHIÊN CỨU THEO HƯỚNG ĐỀ TÀI	22
1.4.1. Thu nhận gypenoside từ nuôi cấy cây Giảo cổ lam.....	22
1.4.2. Nghiên cứu biểu hiện của gene mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside.....	24

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	34
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	35
2.2.1. Nuôi cấy callus.....	35
2.2.2. Nuôi cấy tế bào huyền phù	35
2.2.3. Xử lý elicitor	39
2.2.4. Xác định đặc điểm của một số gene CYP và UGT	40
2.2.5. Xác định mức độ phiên mã của các gene CYP và UGT.....	42
2.2.6. Phân tách hợp chất thứ cấp	44
2.2.7. Thử nghiệm khả năng ức chế tế bào ung thư.....	45
2.2.8. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột của cao chiết.....	47
2.2.9. Xử lý thống kê.....	49
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	50
3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CÂY LÊN QUÁ TRÌNH TÍCH LŨY GYPENOSIDE TRONG TẾ BÀO HUYỀN PHỤ	50
3.1.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy gypenoside.....	50
3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù.....	54
3.1.3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù	57
3.1.4. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor 12 L	60
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR TRONG TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG SẢN XUẤT GYPENOSIDE TỪ NUÔI CÂY HUYỀN PHỤ.....	63
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside trong tế bào	63
3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	66
3.2.3. Ảnh hưởng của sự phối hợp nhiều elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	70
3.2.4. Xác định mức độ biểu hiện của các gene <i>CYP</i> và <i>UGT</i> trong tế bào huyền phù.....	74
3.3. THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH CỦA CHẾ PHẨM CÓ CHỨA GYPENOSIDE TỪ TẾ BÀO HUYỀN PHỤ	86
3.3.1. Sản xuất cao chiết và chế phẩm có chứa gypenoside	86
3.3.2. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư.....	87
3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết.....	93
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	96

NHỮNG CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	98
---	-----------

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp [43]	16
Bảng 2.1. Trình tự môi trường trong nhận diện các gene [134]	40
Bảng 2.2. Các môi trường được sử dụng để phân tích mức độ phiên mã	43
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên tích lũy gypenoside và Rb1 ...	51
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP hoặc KIN kết hợp với 0,5 mg/L IBA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside.....	55
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	56
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	58
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	60
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù trong bioreactor 12 L	62
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của MeJA và SA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	63
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của YE và Fox lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside ..	65
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	66
Bảng 3.10. Ảnh hưởng của phối hợp các elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	70
Bảng 3.11. Thành phần hợp chất có trong cao chiết methanol từ tế bào huyền phù Giảo cổ lam dựa trên phân tích HPLC.....	72
Bảng 3.12. Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm lý hóa của enzyme	79
Bảng 3.13. Mức độ biểu hiện của các gene <i>CYP</i> trong tế bào huyền phù	82
Bảng 3.14. Mức độ biểu hiện của các gene <i>UGT</i> trong tế bào huyền phù	84
Bảng 3.15. Sự tích lũy gypenoside trong mẫu cao chiết Giảo cổ lam	86
Bảng 3.17. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư của chế phẩm chứa gypenoside	90

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Cây Giảo cổ lam 5 lá.....	6
Hình 1.2. Cấu trúc chung của gypenoside kiểu dammarane.....	7
Hình 1.3. Sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án.....	29
Hình 1.4. Sơ đồ con đường sinh tổng hợp triterpen gypenoside.....	41
Hình 2.1. Callus thứ cấp cây Giảo cổ lam.....	43
Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù.....	44
Hình 3.2. Tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA.....	50
Hình 3.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù nuôi cấy trong bioreactor 12 L.....	59
Hình 3.4. Nuôi cấy tế bào huyền phù Giảo cổ lam trong bioreactor 12 L.	60
Hình 3.5. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung elicitor.....	68
Hình 3.6. Phổ HPLC tế bào huyền phù Giảo cổ lam.....	69
Hình 3.7. Cây di truyền dựa trên trình tự gene <i>CYP89A2</i>	74
Hình 3.8. Cây di truyền dựa trên các trình tự gene <i>UGT91A1</i>	75
Hình 3.9. Dự đoán cấu trúc không gian của enzyme <i>CYP89A2</i> (trái) và <i>UGT91A1</i> (phải).....	77
Hình 3.10. Mô hình cấu trúc không gian của <i>CYP89A2</i> (trên) và <i>UGT91A1</i> -QN (dưới) được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0.....	78
Hình 3.11. Vị trí các amino acid có thể glycosyl hóa của <i>CYP89A2</i>	79
Hình 3.12. Ảnh chụp khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy bám dính của dịch chiết chứa gypenoside.....	90

Hình 3.13. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên cấu trúc vi thể ống sinh tinh ở mô tinh hoàn chuột. 93

Hình 3.14. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên nồng độ testosterone trong máu chuột xử lý nhiệt 95

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

2,4 D	: 2,4 - Dichlorophenoxyacetic acid
BAP	: 6-benzylaminopurine
CYP	: Cytochrome P450
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DW	: Khối lượng khô
ĐC	: Đối chứng
ĐHST	: Điều hòa sinh trưởng
FPS	: Farnesyl pyrophosphate synthase
FPP	: Farnesyl pyrophosphate
FW	: Khối lượng tươi
KIN	: Kinetin
IUCN	: Liên minh Quốc tế Bảo tồn Thiên nhiên và tài nguyên Thiên nhiên
NAA	: Naphthaleneacetic acid
IBA	: 3-indolebutyric acid
HepG2	: Tế bào ung thư gan ở người
HPLC	: Sắc ký lỏng hiệu năng cao
MeJA	: Methyl jasmonate
MEP	: Methylerythritol Phosphate
MVA	: Mevalonate
MAPK	: Mitogen - activated protein kinase

MS	: Murashige và Skoog (1962)
NS	: Sai khác không có ý nghĩa thống kê
OSC	: Oxidative squalene cyclase
PCR	: Phản ứng chuỗi polymerase
PTN	: Phòng thí nghiệm
PPD	: Protopanaxadiol
PPT	: Protopanaxatriol
ROS	: Các loại oxygen phản ứng
SA	: Salicylic acid
SE	: Squalene - 2,3 - epoxidase
SS	: Gene sinh tổng hợp squalene
UGT	: UDP - glucuronosyltransferase
YE	: Dịch chiết nấm men
SYM	: Cả 3 loại elicitor là YE, SA và MeJA

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một loài dược liệu quý thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae), phân bố rộng rãi tại Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và các quốc gia Đông Nam Á, trong đó có Việt Nam [32]. Cây Giảo cổ lam có thân mảnh có khả năng bò hoặc leo, có nhiều tác dụng dược lý và được ghi nhận với các hoạt tính bảo vệ gan, chống khối u, chống viêm, cũng như duy trì cân bằng đường huyết và lipid máu. Là thành phần hoạt tính chính của cây Giảo cổ lam, các gypenoside thể hiện cấu trúc đặc trưng kiểu dammaran của nhóm tetracyclic triterpen. So với nhân sâm (*Panax ginseng*) thì cây Giảo cổ lam không chỉ tạo ra lượng triterpen saponin cao gấp gần năm lần mà còn có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn. Do đó, Giảo cổ lam được xem như một nguồn thay thế kinh tế để sản xuất ginsenosid trong tương lai [64], [174], [99].

Hiện nay, có hơn 180 loại saponin được tìm thấy trong cây Giảo cổ lam, được gọi chung là gypenoside; trong đó nhiều thành phần có cấu trúc giống với saponin của nhân sâm [38]. Do có vai trò tương tự nhân sâm, trong khi quá trình trồng dễ hơn và thời gian thu hoạch ngắn hơn so với nhân sâm, nên Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy triển vọng [99]. Tuy nhiên, nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm. Theo sách đỏ Việt Nam năm 2007, Giảo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d).

Việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giảo cổ lam tự nhiên là cần thiết. Nuôi cấy huyền phù tế bào được xem là giải pháp hiệu quả và đã được áp dụng thành công trên nhiều đối tượng khác nhau, nguyên liệu để nuôi cấy huyền phù chính là callus [12], [8], [169]. Nuôi cấy tế bào huyền phù có nhiều lợi thế hơn so với khai thác cây tự nhiên như sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, chủ động trong cung cấp nguyên liệu, không bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, cần ít diện tích sản xuất, ... [4]. Một

số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giảo cổ lam như Ao và cộng sự (1998) [21], tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào cây này chưa được thực hiện.

Trong tự nhiên, thực vật sản xuất các hợp chất thứ cấp để chống lại các yếu tố gây bệnh. Elicitor kích thích quá trình hình thành các hợp chất thứ cấp, bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy là phương thức để thu được các sản phẩm hợp chất thứ cấp một cách hiệu quả nhất. Do đó, việc nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam có sử dụng elicitor để thu nhận gypenoside hứa hẹn sẽ mang lại hiệu quả cao, thay thế dần cho việc khai thác cây Giảo cổ lam tự nhiên.

Xuất phát từ những lý do thực tiễn trên, chúng tôi tiến hành đề tài: ***“Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)”***.

2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU

Mục tiêu chung: Xây dựng và tối ưu quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) nhằm nâng cao sinh trưởng và tích lũy hoạt chất thứ cấp, hướng đến tạo nguồn nguyên liệu ổn định phục vụ sản xuất dược liệu.

Mục tiêu cụ thể:

Xây dựng được quy trình nuôi cấy và thu nhận gypenoside từ tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino).

Xác định loại, nồng độ và điều kiện xử lý elicitor thích hợp để thu được gypenoside từ tế bào huyền phù cao nhất.

Xác định hoạt tính của gypenoside tách chiết từ tế bào huyền phù về khả năng kháng tế bào ung thư trên một số dòng tế bào ung thư.

Xác định khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột từ cao chiết tổng số.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Cây Giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) *in vitro* có nguồn gốc từ cây tự nhiên tại xã Trà Linh, thành phố Đà Nẵng, được định danh hình thái và cung cấp bởi Trung tâm Ứng dụng và Thông tin Khoa học công nghệ Quảng Nam (cũ), nay là Trung tâm Ứng dụng và Thông tin Khoa học công nghệ Đà Nẵng, đồng thời đã tiến hành định danh phân tử ở Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.

Phạm vi nghiên cứu

- Phạm vi thời gian: từ tháng 3/2021 đến tháng 9/2025.
- Phạm vi đối tượng: tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam, các dòng tế bào ung thư gan, ung thư phổi, ung thư bạch cầu, tinh hoàn chuột.
- Phạm vi không gian:

Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế: tiến hành các thí nghiệm về nuôi cấy, phân tích hóa sinh, một số thí nghiệm về sinh học phân tử.

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế: tiến hành một số thí nghiệm về sinh học phân tử.

Khoa Cơ bản và Bộ môn Mô phôi, Giải phẫu bệnh và Pháp Y, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế: Các thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột.

Phòng Thử nghiệm sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm khoa học Việt Nam: Các thí nghiệm về khả năng ức chế tế bào ung thư.

4. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

Nội dung 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù.

Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của các elicitor trong việc tăng cường khả năng sản xuất gypenoside từ nuôi cấy huyền phù.

Nội dung 3: Nghiên cứu quá trình thu nhận và thử nghiệm hoạt tính của gypenoside từ tế bào huyền phù.

5. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN CỦA ĐỀ TÀI

Ý nghĩa khoa học

- Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp dẫn liệu khoa học mới về khả năng sản xuất gypenoside thông qua nuôi cấy huyền phù cây Giảo cổ lam có xử lý elicitor.

- Cung cấp dữ liệu về mức độ phiên mã của các gene tham gia vào chu trình sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào huyền phù, khả năng kháng tế bào ung thư và bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột của cao chiết tổng số và chế phẩm chứa gypenoside.

Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả luận án tạo cơ sở cho việc ứng dụng quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giảo cổ lam trong sản xuất các hoạt chất thứ cấp, góp phần chủ động nguồn nguyên liệu cho ngành dược. Đồng thời, hoạt tính sinh học của cao chiết cho thấy tiềm năng phát triển các chế phẩm dược liệu và nghiên cứu ứng dụng.

6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, luận án có một số đóng góp mới như sau:

1. Xây dựng được quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam. trong bình tam giác với môi trường lỏng MS bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA, tỷ lệ mẫu 3 g/50 mL môi trường, trên máy lắc tốc độ lắc 120 vòng/phút.

2. Sản xuất gypenoside thông qua nuôi cấy tế bào huyền phù có sử dụng elicitor. Khi sử dụng elicitor đơn lẻ thì hàm lượng gypenoside đạt cao nhất là 79,721 mg/g khô khi xử lý với 100 μ M SA sau 6 ngày nuôi cấy, gấp khoảng 2 lần mẫu tự nhiên. Sử dụng phối hợp ecicitor thì kết quả tối ưu nhất khi kết hợp đồng

thời cả ba loại elicitor cụ thể là: MeJA (50 μ M), SA (100 μ M) và YE (3 g/L), hàm lượng gypenoside thu được cao nhất đạt 103,810 mg/g khô và hàm lượng Rb1 đạt giá trị cao nhất là 0,127 mg/g khô.

3. Đã đánh giá được mức độ phiên mã của 12 gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam dưới ảnh hưởng của các loại elicitor khác nhau. Gene *CYP86A8* tăng 8,25 lần, gene *CYP94A1* tăng 10,01 lần và gene *CYP89A2* tăng 11,14 lần so với đối chứng khi được xử lý MeJA. Gene *UGT73B4* phiên mã mạnh nhất khi xử lý SYM, tăng 15,35 lần so với đối chứng.

4. Xác định được khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột của cao chiết tế bào cây Giảo cổ lam: tăng khả năng sinh tinh và tăng nồng độ testosterone trong máu chuột xử lý nhiệt.

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN VỀ VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. CÂY GIẢO CỔ LAM

1.1.1. Nguồn gốc và phân bố

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) có nguồn gốc từ các vùng núi của miền nam Trung Quốc, Nhật Bản và Đông Nam Á. Cây phát triển tự nhiên trong rừng, trong các thung lũng, mọc leo trên các cây gỗ hay các bụi tại các nơi ẩm ướt ở độ cao từ 300-3.200 m [1]. Trên thế giới, Giảo cổ lam phân bố ở Ấn Độ, Srilanka, Myanma, Trung Quốc, Triều Tiên, Nhật Bản, Thái Lan, Lào và bán đảo Malaysia [37]. Tại Việt Nam Giảo cổ lam phân bố khắp các vùng núi thuộc miền bắc và miền trung, chủ yếu ở các vùng có núi đá vôi. Cây mọc nhiều trong rừng, rừng thưa, lùm bụi từ vùng đồng bằng đến độ cao 2000 m như Lào Cai, Lạng Sơn, Cao Bằng, Hoà Bình.

1.1.2. Phân loại và đặc điểm thực vật học

Giảo cổ lam còn có tên gọi khác là: cỏ thần kì, cây bồ đắng, cây đèn toong hoặc sâm phương nam. Giảo cổ lam là một loài cây leo sống nhiều năm thuộc chi *Gynostemma*, họ Cucurbitaceae [37], [1]. Do bị khai thác quá mức để lấy nguyên liệu làm thuốc nên Giảo cổ lam đã được xếp trong thang bậc phân hạng IUCN 1994 sách đỏ VN: EN A1a,c trong sách đỏ Việt Nam [14].

Giảo cổ lam là cây thân thảo dạng dây leo, có tua cuốn, thường mọc bám trên cây khác hoặc vách đá. Lá kép hình chân vịt, gồm 3 – 7 lá chét, lá mọc cách. Hoa nhỏ, màu trắng, quả dạng quả khô, hình cầu, chứa 2 – 3 hạt [6].

Hình 1.1 là cây Giảo cổ lam 5 lá được trồng ở Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế.



Hình 1.1. Cây Giảo cổ lam 5 lá

1.1.3. Điều kiện sinh thái

Giảo cổ lam là cây ưa ẩm, ưa ánh sáng tán xạ, sinh trưởng tốt ở vùng khí hậu ẩm, trên nhiều loại đất có khả năng thoát nước tốt và giàu dinh dưỡng. Cây có khả năng chịu lạnh khá và phát triển trong khoảng nhiệt độ tương đối rộng [11].

1.1.4. Thành phần hoá học của cây Giảo cổ lam

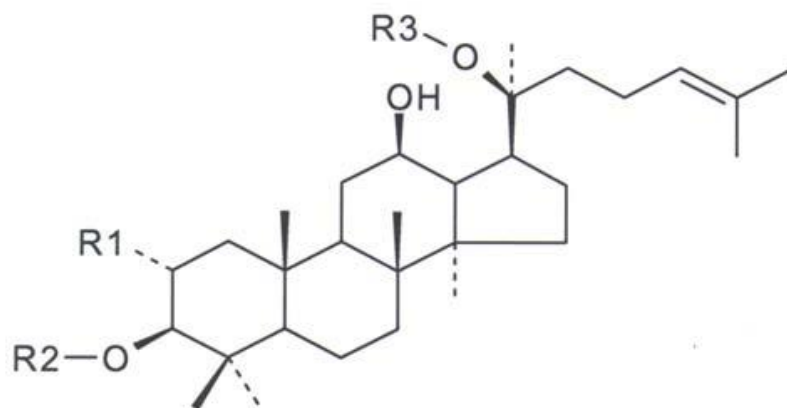
Trong thành phần của Giảo cổ lam chứa hơn 180 saponin cấu trúc triterpen kiểu dammaran còn được gọi là gypenoside, trong đó có nhiều loại giống với nhân sâm và tam thất. Dammarane triterpenoids được đặc trưng bởi khung tetracyclic C_{30} dạng dammarane, mang các nhóm hydroxyl chủ yếu tại C - 3, C - 6 và C - 20, cùng với chuỗi đường glycoside gắn tại C - 3 hoặc C - 20. Những biến đổi hậu hydroxyl hóa và mô hình glycosyl hóa tạo ra hàng trăm dẫn xuất khác nhau, quyết định phổ tính sinh học đặc trưng của nhóm saponin dammarane. Minh họa ở hình 1.2 thể hiện gypenoside bao gồm cả phần sapogenin kỵ nước và phần đường ưa nước trong phân tử (trong đó R1 và R2 = glucose, rhamnose; R3 = glucose, xylose) [159], [168].

Dammarane triterpenoids được chia thành ba nhóm chính gồm protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) và ocotillol - type dựa trên kiểu

hydroxyl hóa ở khung dammarane và mức độ biến đổi ở vị trí C - 20. Hai nhóm PPD và PPT chiếm ưu thế trong họ Araliaceae và họ Cucurbitaceae, trong khi nhóm ocotillol-type xuất hiện hạn chế hơn. Các biến thể như acetyl hóa, malonyl hóa và epoxy hóa tạo ra các dạng dẫn xuất thứ cấp đặc biệt, góp phần làm phong phú phổ hoạt tính sinh học của nhóm saponin dammarane [96], [107], [89]. Các nghiên cứu đã công bố đều cho thấy thành phần chính của Giảo cổ lam là các dammarane-type triterpene saponin và được đặt tên là gypenoside, cấu trúc khá giống với ginsenoside, được xem là thành phần có hoạt tính sinh học chính của Giảo cổ lam [143].

Có chứa nhiều flavonoid, chất có tác dụng sinh học cao và chống lão hoá mạnh. Flavonoids là một nhóm polyphenol phổ biến bậc nhất trong thực vật bậc cao, được hình thành từ con đường shikimate và acetate–malonate, với bộ khung C6 – C3 – C6 đặc trưng. Tính đa dạng của flavonoids xuất phát từ sự biến đổi ở mức độ hydroxyl hóa, methyl hóa, glycosyl hóa, acyl hóa và dimer hóa. Trong lĩnh vực dược lý, flavonoids là nhóm hoạt chất được quan tâm đặc biệt nhờ phổ tác dụng sinh học rộng, gồm chống oxy hóa mạnh, chống viêm, bảo vệ tim mạch, chống ung thư, điều hòa miễn dịch, chống virus và hỗ trợ kiểm soát đường huyết [175], [73], [176].

Chứa nhiều amino acid tan trong nước, nhiều vitamin và các nguyên tố vi lượng như Zn, Fe, Se. Số saponin của Giảo cổ lam nhiều gấp 3 - 4 lần so với nhân sâm. Trong đó, một số có cấu trúc hoá học giống như cấu trúc có trong Nhân sâm (ginsenoside). Ngoài ra Giảo cổ lam còn chứa các vitamin và các chất khoáng như selen, kẽm, sắt, mangan,...[13], [95], [166].



Hình 1.2. Cấu trúc chung của gypenoside kiểu dammarane [92].

1.1.5. Tác dụng dược lý của cây Giảo cổ lam

Giảo cổ lam có vị đắng, tính ôn trung, bổ âm và trợ dương, là thuốc dùng tăng sức đề kháng với vi khuẩn cũng như các tác nhân gây viêm khác. Giảo cổ lam được dùng trong các bệnh tăng lipid máu, đánh trống ngực, chứng chóng mặt, đau đầu, ù tai và chứng tự ra mồ hôi, cơ thể suy nhược, các chứng bệnh tâm tỳ khí kém, đàm huyết ứ trệ. Do đó, Giảo cổ lam đã được đưa vào hầu hết các từ điển thảo dược Trung Quốc dùng để giải độc, làm thuốc ho, điều trị triệu chứng đánh trống ngực, các triệu chứng mệt mỏi, viêm phế quản cấp và mãn tính [14], [18], [44].

Nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu cho thấy dịch chiết nước (tỷ lệ 1:1) của cây Giảo cổ lam có tác dụng giảm 71% lượng cholesterol trong máu chuột thí nghiệm ở liều sử dụng 10 g/kg [1]. Giảo cổ lam có tác dụng tăng đáp ứng miễn dịch trên chuột ở cả hai mô hình gây ức chế miễn dịch bằng cyclophosphamid và tia xạ với liều thí nghiệm 3,4 mg cao đặc/20 g chuột/ngày. Mô hình gây ức chế miễn dịch bằng Cyclophosphamid cho thấy thuốc Giảo cổ lam có tác dụng tăng đáp ứng miễn dịch tế bào [2].

Bằng chứng về saponin Giảo cổ lam có tác dụng như một chất chống ung thư hiệu quả để điều trị trên mô hình chuột bị ung thư đại trực tràng ApcMin / + đã được công bố bởi Tai và cộng sự (2016). Kết quả cho thấy điều trị bằng saponin Giảo cổ lam có thể ức chế đáng kể sự hình thành polyp ở chuột bị ung thư đại trực

tràng. Tác dụng chống ung thư của saponin được thể hiện qua trung gian điều biến tín hiệu JNK/p38 MAPK, điều chỉnh Prdx1 và Prdx2, và ức chế tín hiệu Ras, RAF/MEK/ERK/STAT, PI3K/AKT/mTOR. Hơn nữa, saponin Giảo cổ lam có thể tăng cường hiệu quả chống ung thư của 5-FU như một chất hỗ trợ trong điều trị ung thư đại trực tràng [148]. Mặc dù có nhiều báo cáo cho thấy tác dụng chống ung thư của chiết xuất Giảo cổ lam tự nhiên trên cả *in vitro* và *in vivo*, nhưng không có bằng chứng nào giải thích liệu huyền phù tế bào Giảo cổ lam có thể ức chế ung thư hay không. Do đó, chúng tôi đã chọn một số dòng tế bào đã được công bố để thử nghiệm khả năng gây độc của cao chiết.

Li và cộng sự (2016) đã phân lập một chiết xuất không phân cực EA1.3A từ Giảo cổ lam (bao gồm các alkaloid, ester hữu cơ, terpene và catechol) cho thấy khả năng ức chế ung thư mạnh chống lại bốn dòng tế bào ung thư (Dòng tế bào ung thư biểu mô vú ở người MDA-MB-453 và MCF7, ung thư biểu mô tuyến tiền liệt ở người LNCaP và dòng tế bào ung thư biểu mô trực tràng ở người HCT116). Chiết xuất không phân cực EA1.3A từ Giảo cổ lam ngăn chặn sự tăng sinh của tế bào ung thư thông qua các con đường tín hiệu làm trung gian cho quá trình apoptosis và bất giữ chu kỳ tế bào [97].

Từ thành phần saponin tổng số của Giảo cổ lam, Shi và cộng sự (2018) đã tiến hành phân tích thành phần hoá học và xác định được 27 hợp chất triterpenes loại dammarane trong đó có 3 hợp chất mới là Gypenoside C, Gypenoside D, Gypenoside E và 24 hợp chất đã biết. Tất cả các hợp chất phân lập được đánh giá về hoạt động ức chế sự phát triển của Tế bào hình sao ở gan người (t - HSC/Cl-6). Kết quả nghiên cứu cho thấy, các hợp chất 2, 9, 10, 17, 24, 25, 26, 27 có tác động gây độc tế bào đáng kể. Trong số đó, hợp chất 27 thể hiện các hoạt động ức chế cao với giá trị IC_{50} (24,4 μ M) thấp hơn 10 lần so với silymarin được sử dụng làm đối chứng dương. Việc phát hiện ra chất ức chế t - HSC/Cl-6 mới từ Giảo cổ lam cho thấy nó có tiềm năng sử dụng để làm thực phẩm chức năng giúp bảo vệ sức khoẻ con người [143].

Wang và cộng sự (2018) đã tìm thấy bốn hợp chất (bao gồm 3,4 - dihydroxy phenyl-O- β -D-glucoside, gypenoside XLVI, gypenoside L và ginsenoside Rd) trong dịch chiết Giảo cổ lam với dung môi ethyl acetate và n-butanol. Gypenoside L và ginsenoside Rd cho thấy tác động can thiệp đến sự gia tăng của dòng tế bào ung thư vú (MCF-7) và ung thư phổi (A549) [158]. Cheng và cộng sự (2011) khi thử nghiệm dịch chiết flavonoid và saponin từ Giảo cổ lam cho thấy cả hai phần đều gây ra quá trình chết theo chu kỳ của tế bào ung thư tuyến tiền liệt PC - 3 ở cả hai pha S và G2/M. Dịch chiết Giảo cổ lam gây ra sự gia tăng cả quần thể tế bào apoptosis sớm và muộn khi phụ thuộc vào liều lượng [41]. Xing và cộng sự (2019) cho rằng Damulin B, một saponin loại dammarane được phân lập từ Giảo cổ lam, có tác dụng ức chế tăng trưởng các tế bào ung thư biểu mô phổi A549 ở người. Damulin B thể hiện tác dụng chống ung thư bằng cách gây ra quá trình apoptosis, ngăn chặn sự di cư và chu kỳ tế bào ở giai đoạn đầu G0/G1 [162].

Cơ chế tác động của gypenoside từ Giảo cổ lam đối với tế bào SW - 480 ung thư đại trực tràng ở người đã được nghiên cứu bởi Yan và cộng sự (2014). Gypenosides từ Giảo cổ lam có thể là làm tổn thương ty thể, tạo ROS và gây ra quá trình apoptosis trên các tế bào ung thư đại trực tràng ở người [165]. Năm 2020, Hussain và cộng sự đã báo cáo tiềm năng chống ung thư của chiết xuất Giảo cổ lam đối với quá trình bắt giữ và cảm ứng apoptosis của tế bào ung thư gan (HepG2). Chiết xuất Giảo cổ lam ức chế sự phát triển của tế bào HepG2 bằng cách gây ra chu kỳ chết tế bào pha G0/G1 thông qua việc điều chỉnh biểu hiện gene. Ngoài ra, chiết xuất Giảo cổ lam gây ra quá trình apoptosis của tế bào HepG2 [68].

1.2. SẢN XUẤT HỢP CHẤT THỨ CẤP TỪ NUÔI CẤY TẾ BÀO

1.2.1. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật

Nuôi cấy huyền phù là phương pháp nuôi cấy trong đó các tế bào đơn lẻ hoặc các tập hợp tế bào nhỏ được nhân lên ở trạng thái lơ lửng trong môi trường lỏng được khuấy trộn. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật thường được ứng dụng

đề sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp; nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự tăng trưởng và biệt hóa cũng như vai trò của các hợp chất và chất chuyển hóa; phát triển phôi soma [45].

Nghiên cứu của Liu và cộng sự (2022) về hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào đối với loài *La hán quả* đã được thiết kế để tăng cường khả năng sinh tổng hợp polyphenol. Tối ưu hóa tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng giúp tăng sinh khối và hàm lượng polyphenol lần lượt xấp xỉ 32,18% và 13,86% so với điều kiện ban đầu. Hệ huyền phù thu được có tính đồng nhất cao, tốc độ tăng trưởng nhanh, đạt tối đa khoảng 25,5 g/L sinh khối khô và khoảng 30,75 mg/g polyphenol. Các phân tích cho thấy 15 polyphenol được sinh tổng hợp trong quá trình nuôi cấy huyền phù đều đóng góp tích cực vào hoạt tính chống oxy hóa của dịch chiết tế bào, khẳng định tiềm năng của hệ thống nuôi cấy huyền phù như một nền tảng sản xuất hợp chất sinh học trong họ Cucurbitaceae [101].

Các nghiên cứu trong và ngoài nước về nuôi cấy tế bào huyền phù thực vật đã chứng minh đây là một phương pháp tiềm năng để sản xuất các hợp chất thứ cấp, đặc biệt ở những loài có giá trị dược liệu. Nhiều công trình quốc tế trên các loài thuộc họ Cucurbitaceae cho thấy tế bào huyền phù có thể tích lũy các nhóm triterpen, phenolic hoặc cucurbitacin khi được tối ưu hóa môi trường và xử lý elicitor [83], [125], [22].

Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật tồn tại nhiều hạn chế mang tính hệ thống. Việc mất cấu trúc mô làm rối loạn điều hòa sinh lý và thường không thuận lợi cho sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp. Quần thể tế bào có hiện tượng kết tụ, tạo vi môi trường không đồng nhất trong cùng hệ nuôi cấy. Khi mở rộng quy mô, tế bào dễ chịu stress cơ học và suy giảm sinh trưởng trong bioreactor. Nuôi cấy huyền phù bị ràng buộc bởi thể tích làm việc và mật độ tế bào tối ưu; nếu không kiểm soát tốt thiết kế bioreactor và điều kiện vận hành, hiệu suất và chất lượng có thể giảm. Ngoài ra, tính không ổn định di truyền và hiệu quả kinh tế hạn chế làm giảm khả năng ứng dụng lâu dài ở quy mô công nghiệp [27].

Bên cạnh đó, năng suất sản phẩm thường không tỷ lệ thuận với sinh khối tế bào, gây khó khăn cho việc tối ưu hóa quy trình. Hoạt tính sinh tổng hợp có xu hướng suy giảm theo số lần cấy chuyển do áp lực chọn lọc trong điều kiện nhân tạo. Việc kiểm soát chính xác trạng thái sinh lý tế bào trong huyền phù vẫn còn nhiều thách thức về mặt kỹ thuật.

Số lượng nghiên cứu chuyên sâu trên *Giáo cổ lam* còn hạn chế, chủ yếu dừng ở mức tạo callus hoặc khảo sát sơ bộ sinh trưởng tế bào, trong khi các yếu tố quyết định như thời điểm xử lý elicitor, cơ chế điều hòa gene *CYP*, *UGT* và mối liên hệ giữa phiên mã và tích lũy gypenoside chưa được làm rõ.

1.2.2. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Mỗi tế bào thực vật trong nuôi cấy *in vitro* chứa đựng các thông tin di truyền hoàn chỉnh và vì thế nó có khả năng sản xuất các hợp chất hóa học giống như cây gốc [132]. Những thành tựu đạt được trong lĩnh vực công nghệ sinh học, đặc biệt là phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật, đã cung cấp một phương thức mới cho quá trình thương mại hóa các chất hóa học có nguồn gốc từ thực vật [114]. Phương pháp này sẽ mở rộng và tăng khả năng thu hồi các hóa chất có giá trị, một sự thay thế từ quy mô nông nghiệp truyền thống lên quy mô công nghiệp trong sản xuất các hợp chất thứ cấp.

Nuôi cấy tế bào thực vật được phát triển nhằm nâng cao hiệu suất sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học. Kỹ thuật này cho phép tổng hợp hợp chất thứ cấp trong điều kiện kiểm soát, độc lập với khí hậu và canh tác, hạn chế ảnh hưởng của sinh vật gây hại, đồng thời có khả năng tự động hóa quá trình sinh trưởng và chuyển hóa, góp phần giảm chi phí và tăng năng suất sản phẩm [5], [108], [17], [126].

Nhiều nghiên cứu cho thấy, một số hợp chất thứ cấp ở tế bào thực vật nuôi cấy được tích lũy cao hơn so với cây bố mẹ, chẳng hạn như sự tích lũy anthocyanin trong nuôi cấy tế bào cây Nho, Xương rắn và Tía tô lần lượt cao gấp 1,6; 13,3 và 16 lần; anthraquinone trong tế bào nuôi cấy cây Nhàu cao gấp 8 lần; berberin

trong tế bào nuôi cấy cây Hoàng liên và Phấn hương lần lượt cao gấp 3,3 và 1000 lần; rosmarinic acid trong tế bào nuôi cấy cây Lá gấm cao gấp 9,3 lần; shikonin trong tế bào nuôi cấy cây Cỏ ngọc cao gấp 9,3 lần so với các cây ngoài tự nhiên. Điều này cho thấy ưu điểm của việc sản xuất các hợp chất trao đổi thứ cấp đặc trưng của thực vật thông qua phương thức nuôi cấy tế bào [142].

Trong thời gian qua, đã có nhiều nghiên cứu thành công về sản xuất các hợp chất dược liệu từ nuôi cấy tế bào. Nguyễn Hoàng Lộc và cộng sự (2010) đã nghiên cứu sản xuất solasodine từ callus cây Cà gai leo *in vitro* và kết quả thu được cho thấy, hàm lượng solasodine tích lũy trong callus cao hơn khoảng 8,5 lần so với tách chiết từ rễ cây tự nhiên 1 năm tuổi [102]. Nhóm tác giả tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tế bào Cà gai leo trong chai tam giác để thu solasodine và nhận thấy, solasodine tích lũy trong tế bào cao hơn trong callus [106]. Quách Ngô Diễm Phương và cộng sự (2010) đã tiến hành nuôi cấy mô sẹo và dịch huyền phù tế bào cây Bưởi cho mục tiêu thu nhận quinone. Kết quả ghi nhận hàm lượng plumbagin trong sinh khối tế bào là 0,02% [9]. Vincristine và vinblastine được sản xuất bằng nuôi cấy tế bào ở cây Dừa cạn là các indole alkaloid đã trở thành thuốc có giá trị trong hóa trị liệu ung thư [155].

1.2.3. Chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào

Trong nuôi cấy tế bào, lựa chọn cẩn thận các tế bào có khả năng tăng trưởng và điều kiện nuôi cấy tối ưu sẽ giúp gia tăng khả năng tích lũy hoạt chất thứ cấp ở mức cao hơn. Để thu được hiệu suất cao cho khai thác thương mại, người ta đã sử dụng nhiều phương pháp nhằm kích thích hoạt động sinh tổng hợp hoạt chất thứ cấp của các tế bào nuôi cấy. Tế bào nuôi cấy tích lũy một lượng lớn hợp chất thứ cấp ở điều kiện tối ưu: chọn lựa thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp, chọn lựa các dòng tế bào năng suất cao, bổ sung tiền chất nuôi cấy và các chất kích kháng bảo vệ thực vật (elicitor) [114].

Tối ưu hóa điều kiện nuôi cấy: Các nhân tố hóa học và vật lý như thành phần môi trường, chất kích thích sinh trưởng, pH, nhiệt độ nuôi cấy, sự thông khí,

sự lắng hoặc khuấy và ánh sáng ảnh hưởng đến hàm lượng các hợp chất thứ cấp đã được nghiên cứu nhiều. Một vài sản phẩm tích lũy trong tế bào ở mức cao hơn so với ở trong cây trồng tự nhiên khi được nuôi cấy ở điều kiện tối ưu [4], [33].

Chọn lọc các dòng tế bào cho năng suất cao:

Việc nâng cao tích lũy hợp chất thứ cấp thường bắt đầu từ lựa chọn vật liệu ban đầu có hàm lượng hoạt chất cao để cảm ứng tạo callus và thiết lập các dòng tế bào. Bên cạnh đó, các phương pháp gây đột biến và tạo stress có kiểm soát được áp dụng nhằm tạo biến dị di truyền và sinh lý trong quần thể tế bào. Sau xử lý, chỉ những dòng tế bào có khả năng sinh trưởng ổn định và tích lũy sản phẩm ở mức cao được tuyển chọn và duy trì, từ đó thu nhận các dòng tế bào có năng suất vượt trội [132].

Cung cấp tiền chất: Bổ sung các tiền chất của quá trình sinh tổng hợp nội bào vào môi trường nuôi cấy cũng có thể tăng sinh khối, do một số hợp chất trung gian nhanh chóng bắt đầu sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp vì thế làm tăng lượng sản phẩm cuối cùng. Phương pháp này hữu ích khi dùng các tiền chất có giá thành rẻ [112].

Sự kích kháng bảo vệ thực vật: Elicitor báo hiệu việc hình thành các hợp chất thứ cấp. Sử dụng các elicitor đơn lẻ hoặc kết hợp cùng với loại bỏ các sản phẩm cuối và sự tích lũy trong pha tách chiết đã được chứng minh là một hướng thích hợp để gia tăng hiệu suất chuyển hóa [142].

Sản xuất các hợp chất thứ cấp ở tế bào thực vật: Ứng dụng công nghệ chuyển hóa ở tế bào thường là kết quả của kỹ thuật DNA tái tổ hợp. Ngoài ra, còn có thể thiết kế hệ thống các phản ứng hóa sinh để đạt được một mục tiêu nào đó. Ví dụ, tăng tốc độ sản xuất các sản phẩm mong muốn, giảm các sản phẩm không mong muốn, hoặc phân hủy các chất độc [142].

1.3. ELICITOR

1.3.1. Khái niệm

Elicitor (chất kích kháng) có thể được định nghĩa như là một chất cơ bản khi

đưa với các nồng độ nhỏ vào hệ thống tế bào sống thì khởi động hoặc cải thiện sự sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp [118]. Sự kích kháng thực vật là quá trình cảm ứng tăng cường sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp do sự bổ sung theo hàm lượng của elicitor. Ngoài ra, elicitor là các phân tử mà kích thích các đáp ứng phòng vệ hoặc cảm ứng chống chịu trong thực vật [141].

1.3.2. Phân loại

Elicitor được phân loại hoặc dựa trên bản chất tự nhiên của chúng là elicitor phi sinh học và elicitor sinh học, hoặc dựa trên nguồn gốc của chúng là elicitor ngoại sinh và elicitor nội sinh (Bảng 1.1). Elicitor sinh học là các chất có nguồn gốc sinh vật, bao gồm các polysaccharide có nguồn gốc từ thành tế bào thực vật (pectin hoặc cellulose), các vi sinh vật (chitin hoặc glucan) và các glycoprotein, G-protein hay các protein nội bào có chức năng gắn với các receptor và tác động bằng cách hoạt hóa hoặc bất hoạt một số các enzyme hoặc các kênh ion. Elicitor phi sinh học là các chất không có nguồn gốc từ sinh vật, chủ yếu là các muối vô cơ và các tác nhân vật lý như ion Cu^{2+} và Cd^{2+} , Ca^{2+} và pH cao. Elicitor ngoại sinh là các chất có nguồn gốc bên ngoài tế bào như các polysaccharide, polyamine và các acid béo. Ngược lại, elicitor nội sinh là các chất có nguồn gốc bên trong tế bào như là galacturonide hoặc hepta- β -glucoside,... [118].

Bảng 1.1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp [59]

Phân loại dựa tính chất tự nhiên của elicitor		
Elicitor sinh học	Là dạng chiết xuất thô hoặc tinh sạch có nguồn gốc từ mầm bệnh (nấm, vi khuẩn, nấm men) hoặc của chính thực vật, có 2 loại:	
	Loại	Thành phần
	<i>Xác định</i>	Polysaccharide, glycoprotein, glucan, chitin, chitosan, pectin, alginate, xanthan, elicitin, enzyme bất hoạt, ...
	<i>Chưa xác định</i>	Dịch chiết thô nấm men, dịch chiết vi khuẩn, dịch

		nấm,...	
	Loại	Thành phần	
Elicitor phi sinh học	Hóa học	Muối và các kim loại nặng	Ag ₂ S ₂ O ₃ , AgNO ₃ , CdCl ₂ , CuCl ₂ , CuSO ₄ , VOSO ₄ , NiSO ₄ , selenium, ...
		Stress thẩm thấu	Mannitol, sorbitol, sodium chloride, potassium chloride, cadmium chloride, polyvinyl pyrrolidone, ...
		Cơ chất dạng khí	NO, ethylene, ...
	Vật lý	Tia UV, thay đổi trạng thái nhiệt độ, muối, hạn hán,...	
	Các phân tử tín hiệu nội bào	Jasmonic acid, methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA), acetyl salicylic acid, systemin, ...	
Phân loại dựa vào nguồn gốc của elicitor			
Elicitor ngoại sinh	Glucomannose, glucan, chitosan, monilicolin, polyamine, glycoprotein, polygalacturonase, endopolygalacturonic, acid lyase, cellulose, arachidonic acid, eicosapentanoic acid, ...		
Elicitor nội sinh	Jasmonic acid, methyl jasmonate, salicylic acid, acetyl salicylic acid, systemin,		

1.3.3. Cơ chế tác dụng của elicitor

Có nhiều giả thuyết khác nhau về cơ chế tác dụng của elicitor lên thực vật như:

Giả thuyết cho rằng Ca²⁺ gắn vào màng nguyên sinh chất từ môi trường bên

ngoài tế bào và nguồn Ca^{2+} bên trong tế bào kích hoạt quá trình kích kháng [144]. Một số tác giả nhấn mạnh đến sự thay đổi nhanh quá trình phosphoryl hóa protein và kích hoạt protein kinase chính là cơ chế của quá trình kích kháng [80]. Trong khi đó, nhiều tác giả khác nhận thấy sự tích lũy mitogen-activated protein kinase (MAPK) và kích hoạt G-protein trong quá trình kích kháng [172]. Sản xuất các ROS (reactive oxygen species) như anion superoxide và H_2O_2 tạo ra hiệu ứng kháng khuẩn trực tiếp cũng như góp phần tạo ra các dẫn xuất của acid béo có hoạt tính sinh học. Tương tự, ROS tham gia vào quá trình liên kết với protein giàu proline gắn trên thành tế bào sau đó hoạt động như là tín hiệu thứ cấp và kích hoạt dịch mã các gene bảo vệ [121]. Kích hoạt sự phiên mã của các gene bảo vệ trong quá trình kích kháng cũng đã được công bố [127], [86], [31].

1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kích kháng

Độ tuổi nuôi cấy, dòng tế bào, chất điều hòa sinh trưởng, thành phần dinh dưỡng và chất lượng của thành tế bào là những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến quá trình sản xuất các hợp chất chuyển hóa thứ cấp. Một số thông số như loại, nồng độ và thời gian tiếp xúc với elicitor cũng ảnh hưởng quyết định đến quá trình kích kháng [116].

Nồng độ elicitor: Nồng độ elicitor thích hợp đóng một vai trò rất quan trọng trong quá trình kích kháng. Nghiên cứu của tác giả Benavides và cộng sự (2023) cho thấy nồng độ tối ưu của MeJA và SA nằm trong khoảng từ 50 μM đến 200 μM [25]. Công bố của Naik và cộng sự (2016) cho thấy xử lý elicitor ở nồng độ cao đã gây ra phản ứng quá mẫn cảm dẫn đến chết tế bào, chỉ khi nồng độ ở mức tối ưu mới gây ra cảm ứng cần thiết cho quá trình kích kháng [116].

Thời gian tiếp xúc với elicitor: Nuôi cấy tế bào huyền phù loài dây thìa canh xử lý với MeJA sau 72 giờ cho kết quả hàm lượng gymnemic acid đạt giá trị cực đại, tăng gấp 15,4 lần so với các mẫu đối chứng không xử lý elicitor. Xử lý bằng SA sau 48 giờ xử lý tạo ra một lượng lớn gymnemic acid (43,27 mg/g) [116].

Độ tuổi nuôi cấy: Độ tuổi nuôi cấy đóng vai trò quan trọng trong sản xuất

các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học được xử lý với các elicitor. Xử lý với MeJA và SA trong nuôi cấy tế bào rễ tơ loài Sâm Ấn Độ sau 40 ngày cho tích lũy hàm lượng withanolide A, withanone và withaferin A cao nhất. Nuôi cấy mô loài Dừa cạn 20 ngày tuổi có xử lý các elicitor khác nhau cho sản lượng ajmalicine cao hơn so với đối chứng không sử dụng elicitor. Khi xử lý bằng MeJA ở nồng độ 10 μ M và 100 μ M vào ngày thứ 6 của sự sinh trưởng tế bào, hàm lượng ajmalicine và serpentine đều tăng [116].

Thành phần dinh dưỡng: Thành phần của môi trường cũng đóng một vai trò quan trọng trong quá trình kích kháng. Trong nuôi cấy callus cây Cô ca, hàm lượng cocaine, cinnamoylcocaine, chlorogenic acid và 4 - coumaroyl quinate bị ảnh hưởng đáng kể bởi môi trường nuôi cấy. Quá trình sản xuất cocaine tăng mạnh khi nuôi cấy ở các môi trường Anderson rhododendron, Gamborg B5 và môi trường Murashige - Tucker. Quá trình tổng hợp cinnamoylcocaine cũng chịu ảnh hưởng theo cách tương tự [116].

Nghiên cứu của tác giả Isah (2019) cho thấy có nhiều chiến lược để tăng sản xuất hợp chất thứ cấp ở thực vật thông qua các cảm ứng sinh lý được tạo ra bằng cách thay đổi môi trường nuôi cấy *in vitro*, tăng hoặc giảm các thành phần dinh dưỡng của môi trường so với mức tối ưu cũng ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp [71]. Hiệu quả của quá trình kích kháng còn phụ thuộc vào tính đặc trưng của các loại elicitor khác nhau, các dòng tế bào khác nhau hoặc các loài vi sinh vật được sử dụng cùng với sự có mặt của chất điều hòa sinh trưởng, thành phần dinh dưỡng của môi trường và điều kiện nuôi cấy [26].

1.3.5. Sản xuất hợp chất thứ cấp ở thực vật có bổ sung elicitor

Saponin là một nhóm hợp chất thứ cấp phổ biến trong thế giới thực vật. Các hợp chất saponin có hoạt tính sinh học cao nên rất có giá trị trong lĩnh vực y dược. Hiện nay, việc tách chiết và sản xuất các hợp chất saponin bằng phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật có bổ sung elicitor đã và đang được nghiên cứu nhiều nhằm

tối đa hóa lượng saponin. Saponin của rau má được biết đến với tên gọi là centelloside, có hoạt tính sinh học giúp điều trị nhiều chứng bệnh khác nhau như da khô, phong và bệnh vẩy nến. Hidalgo và cộng sự (2017) đã xây dựng hệ thống tối ưu cho việc sản xuất centelloside trên cơ sở sử dụng elicitor trong nuôi cấy tế bào. Kết quả cho thấy, việc sử dụng coronatine kết hợp với các resin giàu amyrin làm tăng khả năng sản xuất centelloside một cách mạnh mẽ. Quá trình nuôi cấy này có thể được mở rộng sản xuất ở quy mô lớn nhằm giúp tăng sản lượng sinh khối và centelloside [63].

Methyl jasmonate (MeJA) là một dạng chất dẫn truyền tín hiệu đặc hiệu ở thực vật, đóng vai trò quan trọng trong kích hoạt hàng rào đáp ứng với tác nhân bên ngoài, trong quá trình phát triển và tổng hợp các hợp chất thứ cấp [74, 160]. Hiệu quả của MeJA trong quá trình sinh tổng hợp triterpene saponin (ở Giảo cổ lam thì gọi là gypenoside) đã được công bố. Theo Liang và cộng sự (2019), một số gene tham gia sinh tổng hợp gypenoside trong Giảo cổ lam như including 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase, farnesyl pyrophosphate synthase (FPS), squalene epoxidase (SE), and squalene synthase (SS) được cảm ứng bởi MeJA [99]. Guo và cộng sự (2016) nhận thấy squalene epoxidase trong cây Giảo cổ lam (*GpSEI*) biểu hiện rất mạnh trong lá non so với lá trưởng thành cũng như trong rễ. Kết quả này cho thấy khả năng biểu hiện đặc hiệu mô của *GpSEI* và nhận định rằng lá non của cây Giảo cổ lam là nơi diễn ra quá trình sinh tổng hợp gypenoside chính. Xử lý MeJA tăng cường biểu hiện của *GpSEI* trong lá non cao hơn trong lá trưởng thành, biểu hiện cao nhất khi được xử lý 50 μ M MeJA [55].

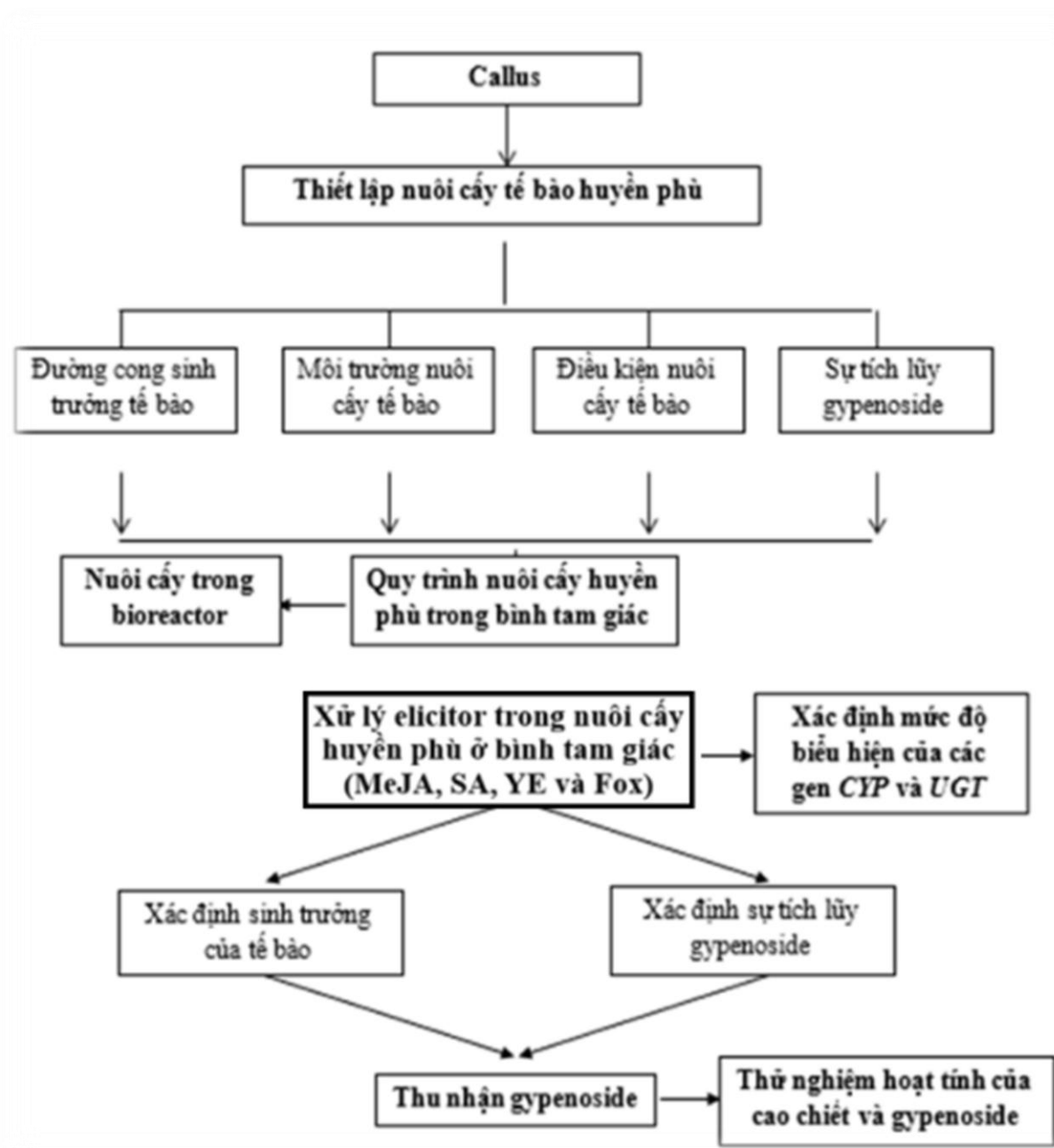
Mức độ phiên mã của các gene *PgSS*, *PgSE*, and *PgDS* tham gia chính vào quá trình sinh tổng hợp ginsenoside trong cây Nhân sâm tăng lên trong rễ tơ hay rễ bất định sau khi xử lý MeJA, dẫn đến làm tăng hàm lượng ginsenoside [74, 156]. Xử lý MeJA tăng cường biểu hiện của gene *BfSSI* trong rễ cây Sài hồ lá liềm [75]. Tuy nhiên trên một số gene, xử lý MeJA không cho sự khác biệt so với

đối chứng. Kim và cộng sự (2009) nghiên cứu sinh tổng hợp triterpene trong tế bào rễ tơ cây Nhân sâm nhận thấy không có sự khác biệt lớn về mức độ biểu hiện của họ cytochrome P450 khi xử lý MeJA so với đối chứng [74].

Alkaloid là những hợp chất hữu cơ có chứa nitơ, đa số có nhân dị vòng, có phản ứng kiềm, thường gặp ở thực vật và đôi khi cả ở động vật, thường có được tính mạnh và cho những phản ứng hoá học với một số thuốc thử gọi là thuốc thử chung của alkaloid. Huang và cộng sự (2021) tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của elicitor MeJA, SA và gây thương tổn lên quá trình tổng hợp benzophenanthridine alkaloids bao gồm sanguinarine, chelerythrine, protopine và allocryptopine lên loài Anh túc hồng. Hàm lượng của các hợp chất thứ cấp nhóm alkaloid tăng đáng kể sau khi được xử lý bởi MeJA so với các elicitor khác ($P < 0,05$) tại thời điểm 120 giờ [66]. Maqsood và cộng sự (2017) đã nghiên cứu thành công tăng sản lượng vinblastine và vincristine lên nhiều lần bằng cách sử dụng YE làm elicitor trong quá trình nuôi cấy *in vitro* cây Dừa cạn [109].

Các hợp chất phenol tự nhiên đóng một vai trò quan trọng trong việc phòng và điều trị ung thư [67]. Để tăng cường sản xuất các hợp chất phenol và flavonoid từ cây Chà là, Al-Khayri và cộng sự (2020) tiến hành nghiên cứu xử lý elicitor trong quá trình nuôi cấy tế bào cây Chà là, kết quả thể hiện có sự tăng cường sản xuất các hợp chất phenol và flavonoid so với đối chứng không sử dụng elicitor [19].

Từ các tài liệu đã được tổng hợp cho thấy, việc sử dụng elicitor nhằm tăng cường sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp thông qua nuôi cấy tế bào thực vật là hướng nghiên cứu được quan tâm rộng rãi trong khoảng hai thập kỷ gần đây. Tuy nhiên, nhiều loài cây dược liệu vẫn chưa được khảo sát đầy đủ, do đó hướng tiếp cận này còn nhiều tiềm năng khai thác. Đối với cây Giảo cổ lam, việc nghiên cứu hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào kết hợp elicitor để sản xuất các hợp chất thứ cấp, đặc biệt là gypenoside, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn quan trọng, góp phần mở rộng nguồn nguyên liệu chủ động cho khai thác hoạt chất.



Hình 1.3. Sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án

1.4. CÁC NGHIÊN CỨU THEO HƯỚNG ĐỀ TÀI

1.4.1. Thu nhận gypenoside từ nuôi cấy cây Giảo cổ lam

Các nghiên cứu về nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam để thu nhận gypenoside chưa được thực hiện, chỉ có một số công bố liên quan đến nuôi cấy callus hay nuôi cấy rễ tơ được công bố. Chang và cộng sự (2005) đã tiến hành nuôi cấy rễ tơ Giảo cổ lam. Thí nghiệm đã được tiến hành bằng cách lây nhiễm mô lá với chủng

Agrobacterium rhizogenes. Sau 49 ngày nuôi cấy trong môi trường MS, sinh khối rễ tơ khô thu được khoảng 7,3 g/L với hàm lượng gypenoside đạt xấp xỉ 38 mg/g chất khô [35].

Zhonghua và cộng sự (1998) đã nghiên cứu ảnh hưởng của một số tác nhân gây stress lên sự tích lũy gypenoside của callus cây Giảo cổ lam, tác giả nhận thấy hàm lượng gypenoside tăng lên khoảng 91% khi nồng độ Mn^{2+} tăng lên 20 lần trong môi trường, manitol làm tăng gypenoside lên khoảng 83% ở nồng độ 680 mM. Ngoài ra, Cu^{2+} không có ảnh hưởng trong khi NaCl làm giảm sự tích lũy gypenoside trong tế bào callus [21].

Theo Hoàng Tấn Quảng và cộng sự (2021), callus sơ cấp được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L kinetin và 0,5 mg/L indole-3-butyric acid sinh trưởng tốt nhất; tỷ lệ tạo callus thứ cấp cao (100%); callus đáp ứng được tiêu chuẩn để nuôi cấy huyền phù. Hàm lượng gypenoside và Rb1 trong callus khoảng 36,298 và 0,009 mg/g chất khô; gypenoside thấp hơn trong lá (65,58%) và gần tương đương với mẫu thân (92,38%) của sản phẩm thu mua từ thị trường [10].

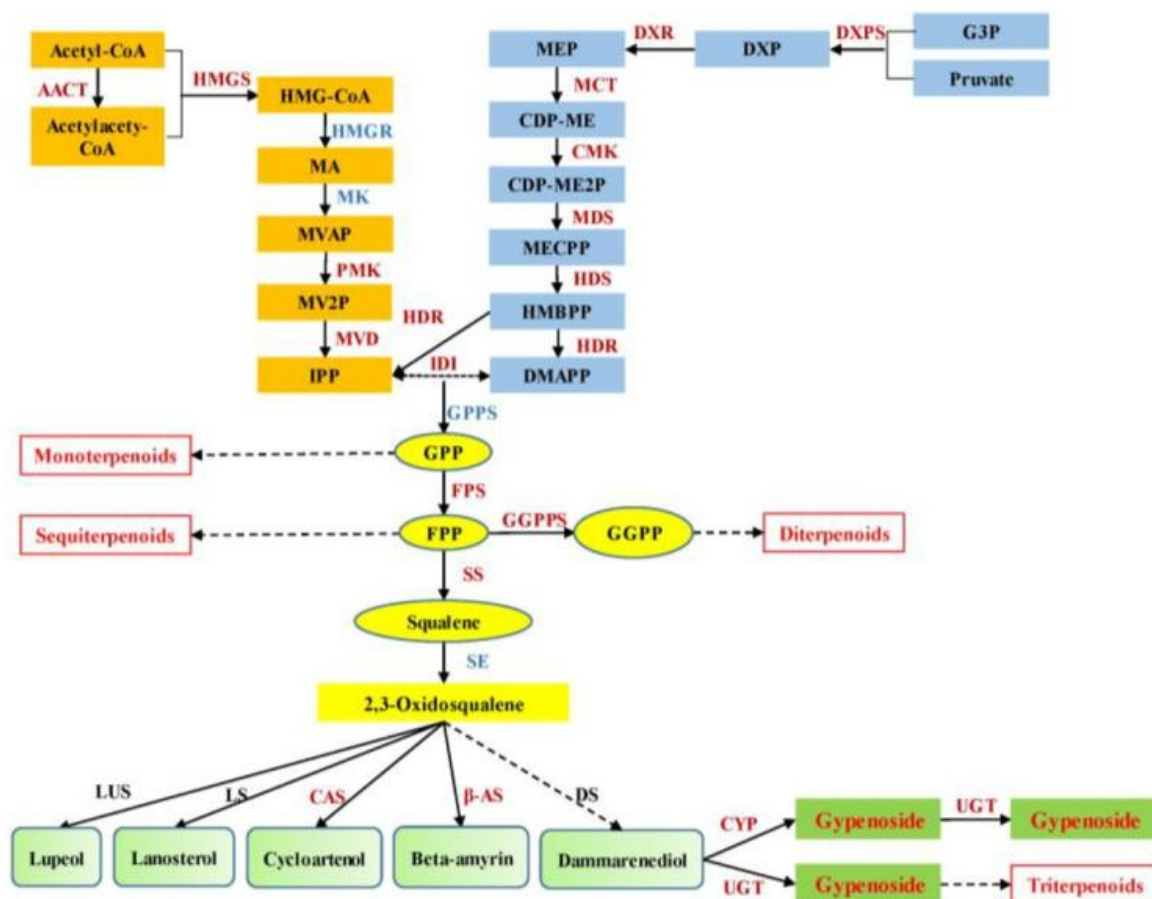
Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã thực hiện nuôi cấy callus hoặc rễ tơ Giảo cổ lam và ghi nhận sự biến động hàm lượng gypenoside dưới tác động của một số yếu tố môi trường, các công trình này chỉ dừng lại ở mức mô tả rời rạc và chưa tiếp cận hệ thống nuôi cấy huyền phù vốn là nền tảng quan trọng để phát triển quy trình sản xuất ở quy mô lớn. Đặc biệt, chưa có công bố nào đánh giá động học sinh trưởng, khả năng tích lũy gypenoside hay đáp ứng của tế bào huyền phù đối với các elicitor như MeJA, SA hoặc YE. Việc thiếu phân tích sâu về hạn chế của hệ thống callus và rễ tơ cho thấy khoảng trống đáng kể trong lĩnh vực.

Do đó, có thể nhận định rằng mặc dù đã tồn tại một số nghiên cứu tiền đề về callus và rễ tơ, quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giảo cổ lam có bổ sung elicitor vẫn chưa được triển khai, và đây chính là điểm mới và đóng góp độc đáo của luận án. Khoảng trống khoa học này tạo ra cơ sở rõ ràng cho việc phát triển một quy trình tối ưu hóa nhằm nâng cao sinh tổng hợp gypenoside là mục tiêu

trọng tâm của đề tài.

1.4.2. Nghiên cứu biểu hiện của gene mã hóa các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside

1.4.2.1. Các gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside



Hình 1.4. Sơ đồ con đường sinh tổng hợp triterpen gypenoside [173]

Hình 1.4 minh họa con đường sinh tổng hợp triterpen gypenoside ở thực vật, từ các tiền chất isoprenoid thông qua các phản ứng oxy hóa do CYP xúc tác và glycosyl hóa do UGT xúc tác.

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu về cách thức các enzyme điều hòa góp phần vào sự đa dạng khổng lồ của cấu trúc triterpen saponin ở cây Giảo cổ lam đã thu hút sự chú ý ngày càng tăng. Các họ *CYP* và *UGT* là những yếu tố then chốt trong sự đa dạng cấu trúc của gypenosid thông qua hai con đường đã được báo cáo [113]. Giải trình tự lại của transcriptome của Giảo cổ lam đã cải

thiện độ chính xác trong dự đoán trình tự, xác định rằng *GpOSCI*, *GpCYP89* và *GpUGT35* là các ứng viên hàng đầu cho quá trình sinh tổng hợp gypenosid thông qua phân tích các gene đồng biểu hiện [99].

Farnesyl pyrophosphate synthase gene (*FPS*)

Farnesyl pyrophosphate synthase (FPS) là một enzyme then chốt trong con đường sinh tổng hợp isoprenoid, xúc tác phản ứng ngưng tụ tuần tự giữa isopentenyl pyrophosphate và dimethylallyl pyrophosphate để tạo ra geranyl pyrophosphate, sau đó là farnesyl pyrophosphate (FPP). FPP đóng vai trò là tiền chất trung tâm cho nhiều hợp chất isoprenoid quan trọng, bao gồm sterol, sesquiterpenoid, dolichol, ubiquinone và đặc biệt là triterpenoid saponin như gypenoside ở cây Giảo cổ lam [39].

So với nhân sâm, nơi gene *PgFPS* cũng thể hiện biểu hiện ưu tiên tại rễ tơ và callus nuôi cấy, Giảo cổ lam cho thấy đặc điểm sinh học khác biệt khi tập trung tích lũy gypenoside chủ yếu ở lá và tua cuốn [94]. Về điều hòa biểu hiện, transcriptome phân giải đơn bào (scRNA-seq) chứng minh rằng *GpFPS* có mức phiên mã cao trong tế bào mô mềm, đặc biệt tại vùng chồi non. Sự cảm ứng bởi methyl jasmonate (MeJA) đã được ghi nhận làm tăng cường biểu hiện của *FPS*, qua đó thúc đẩy sự tích lũy triterpenoid saponin [65]. Ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại đã chứng minh giá trị của *FPS*. Biểu hiện của *GpFPS* trong nấm men giúp tái lập thành công con đường dẫn tới quá trình tổng hợp squalene và triterpenoid [136].

Tóm lại, gene *FPS* giữ vai trò trung tâm trong việc cung cấp FPP là tiền chất trực tiếp cho sinh tổng hợp triterpenoid. Đặc điểm biểu hiện ưu tiên ở lá non, sự cảm ứng bởi tín hiệu jasmonate và khả năng khai thác trong hệ thống dị sinh đã khẳng định *FPS* là một mắt xích chiến lược, có tiềm năng lớn trong cả nghiên cứu cơ bản lẫn ứng dụng công nghệ sinh học nhằm nâng cao sản xuất gypenoside.

Squalene synthase gene (*SS*)

Squalene synthase (SS) là enzyme đầu tiên trong nhánh sinh tổng hợp triterpenoid, xúc tác phản ứng kết hợp hai phân tử farnesyl pyrophosphate (FPP)

để tạo thành squalene. Đây là bước chuyển hóa then chốt, vì nó đánh dấu sự tách biệt khỏi con đường sterol, đồng thời định hướng FPP về phía quá trình hình thành 2,3-oxidosqualene-tiền chất trực tiếp của các hợp chất triterpenoid saponin như gypenoside. Do đó, SS thường được coi là van điều tiết trong hệ thống isoprenoid [39].

So sánh liên loài cho thấy gene *SS* được bảo tồn mạnh mẽ trong quá trình tiến hóa. Ở nhân sâm, gene *PgSS* được chứng minh là có biểu hiện cao trong rễ và được cảm ứng mạnh bởi methyl jasmonate (MeJA). Trong khi đó, cây Giảo cổ lam lại có đặc điểm sinh học khác biệt, khi gene *SS* được biểu hiện mạnh ở lá cơ quan tích lũy gypenoside chủ yếu [65].

Gene *SS* giữ vai trò trung tâm trong quá trình định hướng FPP vào nhánh triterpenoid. Sự ưu tiên biểu hiện ở lá non, tính cảm ứng bởi elicitor đã khẳng định *SS* là một điểm nút quan trọng, có giá trị trong nghiên cứu cơ bản lẫn ứng dụng công nghệ sinh học để tăng cường sinh tổng hợp gypenoside.

Squalene-2,3-epoxidase gene (*SE*)

Squalene-2,3-epoxidase (*SE*) là enzyme then chốt xúc tác bước oxy hóa squalene thành 2,3-oxidosqualene bằng cơ chế phụ thuộc FAD và NADPH. Đây là phản ứng quyết định vì 2,3-oxidosqualene chính là tiền chất trực tiếp cho quá trình vòng hóa tạo nên nhiều khung triterpenoid khác nhau, bao gồm dammarenediol-II, khung xương cơ bản của gypenoside ở cây Giảo cổ lam.

Gene mã hóa *SE* đã được xác định trong nhiều loài thực vật, cho thấy tính bảo tồn cao trong quá trình tiến hóa. Ở cây Giảo cổ lam, các nghiên cứu transcriptome đã phát hiện ít nhất bốn isoform, ký hiệu là *GpSE1 – 4* [39]. So sánh với Nhân sâm, gene *PgSE* cũng biểu hiện mạnh ở rễ và callus, và được chứng minh là liên quan mật thiết đến sự tích lũy ginsenoside. Tuy nhiên ở cây Giảo cổ lam, đặc điểm phân bố *SE* ưu tiên ở lá và tua cuốn phản ánh sự tiến hóa khác biệt của cơ chế sinh tổng hợp gypenoside ở Cucurbitaceae so với Araliaceae [65].

Nhiều nghiên cứu cho thấy SE chịu sự điều hòa mạnh mẽ bởi tín hiệu jasmonate và elicitor ngoại sinh. [94].

Gene *SE* giữ vai trò trung tâm trong quá trình tạo 2,3-oxidosqualene bước khởi đầu không thể thiếu cho con đường triterpenoid. Sự biểu hiện đặc trưng ở lá non, tính cảm ứng mạnh bởi jasmonate và giá trị ứng dụng trong công nghệ vi sinh vật đã khẳng định *SE* là một mắt xích quan trọng, có tiềm năng lớn trong cả nghiên cứu cơ bản và ứng dụng công nghệ sinh học nhằm gia tăng sản xuất gypenoside.

Oxidative squalene cyclase gene (*OSC*)

Oxidative squalene cyclase (*OSC*), còn gọi là oxidosqualene cyclase, là enzyme chịu trách nhiệm vòng hóa 2,3-oxidosqualene thành nhiều khung triterpenoid khác nhau. Ở cây Giảo cổ lam, các nghiên cứu transcriptome đã xác định ít nhất hai gene *OSC* tiềm năng, trong đó *GpOSC1* có biểu hiện cao ở lá non và chồi đỉnh [39]. So sánh với Nhân sâm, gene *PgDDS* (dammarenediol - II synthase) là một loại *OSC* đặc hiệu đã được chứng minh đóng vai trò trung tâm trong quá trình sinh tổng hợp ginsenoside. Trong khi đó, Giảo cổ lam có *GpOSC1* được dự đoán là đồng chức năng với *PgDDS*, tạo ra dammarenediol-II làm khung cơ bản cho gypenoside [167]. Điều hòa biểu hiện *OSC* chịu ảnh hưởng mạnh bởi MeJA và SA cùng với các yếu tố môi trường. [94].

Gene *OSC* đóng vai trò nền tảng trong việc hình thành khung triterpenoid, đặc biệt là dammarenediol - II là tiền chất trực tiếp của gypenoside. Sự biểu hiện đặc trưng ở lá non, cảm ứng bởi MeJA và khả năng ứng dụng trong hệ thống di sinh đã khẳng định *OSC* là một mục tiêu then chốt trong chiến lược metabolic engineering nhằm nâng cao năng suất gypenoside ở cây Giảo cổ lam.

Cytochrome P450 gene (*CYP*)

Quá trình oxy hóa đặc hiệu vị trí do *CYP* xúc tác để tạo ra sapogenin với nhiều cấu trúc khác nhau, chẳng hạn như hydroxyl hóa, carboxyl hóa và ester hóa, nhằm hình thành phần không đường của saponin. Các *CYP* đóng vai trò quan

trọng trong việc hydroxyl hóa và các sửa đổi khác của khung triterpenoid, tạo ra sự đa dạng cấu trúc của gypenoside. Một số gene *CYP* liên quan đến quá trình hydroxyl hóa ở vị trí C - 2 và oxy hóa ở vị trí C - 19 đã được xác định là ứng cử viên [65].

Trong hệ gene của cây Giảo cổ lam, khoảng 216 gene *CYP* đã được xác định, trong đó có 9 gene thuộc họ *CYP716* được dự đoán có liên quan trực tiếp đến sinh tổng hợp gypenoside [65]. Ngoài ra, các gene *CYP71B19*, *CYP77A3*, *CYP86A7*, *CYP86A8*, *CYP89A2*, *CYP90A1* và *CYP94A1* cũng được chứng minh có liên quan đến quá trình hydroxyl hóa khung triterpenoid [39]. So sánh liên loài cho thấy *CYP716* là enzyme bảo tồn giữa Nhân sâm và Giảo cổ lam, đều tham gia biến đổi dammarenediol - II. Tuy nhiên, Giảo cổ lam có xu hướng biểu hiện *CYP* nhiều hơn ở lá non và chồi đỉnh, trong khi Nhân sâm lại ưu tiên ở rễ [167]. Đối với các gene nhóm *CYP*, khi xử lý với MeJA, kết quả phân tích qPCR cho thấy mức biểu hiện của một số gene *CYP716* trong Giảo cổ lam tăng gấp 3 - 4 lần chỉ sau 24 giờ, chứng minh rằng *CYP* không chỉ chịu sự điều hòa phát triển mà còn phản ứng nhạy cảm với elicitor. [94].

Theo Zhang và cộng sự (2021), mức độ biểu hiện của *CYP89A2* trong lá cây Giảo cổ lam là cao nhất, tiếp đến là rễ và biểu hiện ở thân thấp nhất [173]. Theo các tài liệu đã công bố, gene *CYP89A2* thường biểu hiện mạnh khi có tác động của các yếu tố môi trường, giúp cây kháng lại các yếu tố bất lợi bên ngoài, đặc biệt là chất diệt cỏ. Theo Chen và cộng sự (2023), gene *CYP89A2* biểu hiện vượt mức ở cây Cỏ tai tượng nhằm làm giảm độc tố của quizalofop-p-ethyl lên tế bào, là yếu tố điều hòa khả năng kháng chất diệt cỏ trong cây [40]. Gene *CYP89A2* cũng biểu hiện ở các mô trong cây Cỏ gió khi xử lý thuốc diệt cỏ [23]. Ở cây Cải xoong, biểu hiện của gene *CYP89A2* cũng tăng lên khi xử lý ánh sáng đỏ xa [29]. Điều hòa biểu hiện *CYP* liên quan đến nhiều yếu tố phiên mã như MYB, bHLH, WRKY và AP2/ERF [93]. Gene *CYP* giữ vai trò không thể thiếu trong quá trình đa dạng hóa gypenoside thông qua các phản ứng oxy hóa đặc hiệu.

UDP-glucuronosyltransferase gene (*UGT*)

UDP-glycosyltransferase (*UGT*) là nhóm enzyme quan trọng xúc tác bước glycosyl hóa trong con đường sinh tổng hợp triterpenoid saponin. Các protein họ cytochrom p450 (*CYP*) và UDP-glucuronosyltransferase (*UGT*) đóng vai trò điều chỉnh các gene liên quan đến sinh tổng hợp saponin. Đặc biệt, quá trình glycoside hóa xảy ra ở bước phản ứng cuối cùng khi các loại saponin khác nhau được tổng hợp bằng cách thêm một hoặc một số monosacharide vào triterpene aglycone bởi UDP-glycosyltransferase (*UGT*) [164].

Ở cây Giảo cổ lam, các nghiên cứu hệ gene và transcriptome đã xác định 151 unigene được chú thích là *UGT*, trong đó có 12 gene được coi là ứng cử viên quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp gypenoside [65], [94], [39].

Phân tích transcriptome đơn bào (scRNA-seq) đã cung cấp bằng chứng rõ ràng rằng một số *UGT*, như *GpUGT71V3* và *GpUGT71AW1*, biểu hiện cao trong tế bào mô mềm tại chồi non và lá non [94]. So sánh liên loài, Nhân sâm có các *UGT* đặc hiệu như *PgUGT74AE2* tham gia glycosyl hóa ginsenoside, trong khi Giảo cổ lam lại có các isoform khác biệt hơn, phản ánh sự tiến hóa độc lập trong việc mở rộng đa dạng cấu trúc saponin dammaran [163].

Các báo cáo trước đây của Stracke và cộng sự (2007) về *UGT91A1*, hay Kuwahara (2019) về DN42708_c1_g1_i9 tương tự như *UGT91A1*, được dự đoán là có liên quan đến quá trình glycosyl hóa flavonol hoặc flavonol glycoside trong loài Cải xoong [81, 147]. Theo Zhang và cộng sự (2021), mức độ biểu hiện của *UGT91A1* và *UGT76B1* trong thân cao hơn trong rễ [173].

Tóm lại, *UGT* là nhóm gene then chốt trong quá trình hoàn thiện cấu trúc gypenoside, quyết định sự đa dạng và giá trị dược học của gypenoside ở cây Giảo cổ lam.

1.4.2.2. Vị trí sinh tổng hợp và tích lũy trong cây

Các gypenoside chủ yếu được tổng hợp ở lá non của cây Giảo cổ lam. Phân tích biểu hiện gene trên bảy loại mô khác nhau (rễ, thân, tua cuốn, lá non, lá trưởng thành, hoa, và quả) cho thấy nhiều gene sinh tổng hợp sớm (như *GpFPS1*, *GpSSI*, *GpSE2*, và *GpSE3*) có biểu hiện đặc trưng ở lá non. Nghiên cứu công nghệ giải trình tự RNA tế bào đơn cho thấy quá trình sinh tổng hợp gypenoside chủ yếu diễn ra trong tế bào mô mềm ở cả chồi đỉnh và lá của cây Giảo cổ lam. Mức độ biểu hiện của các gene con đường MEP và MVA cao hơn ở tế bào mô mềm so với các loại tế bào khác. Các gene quan trọng như *SS*, *SE*, và *GpDS* cũng biểu hiện ưu tiên trong tế bào mô mềm của cả chồi đỉnh và lá. Hàm lượng gypenoside cao nhất được tìm thấy ở lá và cũng cao ở tua cuốn [65].

1.4.2.3. Phân tích biểu hiện gene *UGT* và *CYP* trong quá trình sinh tổng hợp saponin

Gene sinh tổng hợp muện: *UGT* và *CYP450* là các enzyme được mã hóa bởi các gene sinh tổng hợp muện, tham gia vào quá trình sản xuất gypenoside sau bước tạo 2,3-oxidosqualene [65]. *CYP450s* chịu trách nhiệm cho các phản ứng hydroxyl hóa và các sửa đổi khác của khung triterpenoid, tạo ra sự đa dạng cấu trúc của gypenoside. Enzyme *UGTs* xúc tác quá trình glycosyl hóa, là bước cuối cùng và quan trọng trong con đường sinh tổng hợp triterpenoid, quyết định cấu trúc và tác dụng dược lý của các hợp chất này [167].

Biểu hiện gene *UGT* trong sinh tổng hợp saponin

Trong cây cải xoong, các gene *UGT73B3* và *UGT73B5* đã được chứng minh là được cảm ứng mạnh mẽ khi cây bị nhiễm khuẩn *Pseudomonas syringae* hoặc xử lý bằng acid salicylic (SA), cũng như trong đáp ứng với stress oxy hóa như hydrogen peroxide. Phân tích qPCR cho thấy mức phiên mã của hai gene này tăng đáng kể trong giai đoạn sớm của phản ứng phòng vệ, khẳng định vai trò của *UGT* trong cơ chế kháng bệnh thông qua việc glycosyl hóa các hợp chất phenolic hoặc các chuyển hóa thứ cấp có liên quan nhằm trung hòa ROS [85], [145].

Đối với cây Bạch chỉ, loài thực vật chứa nhiều saponin có giá trị dược lý lớn, một nghiên cứu đã tiến hành phân tích transcriptome kết hợp với xác nhận biểu hiện bằng qRT - PCR cho thấy ít nhất 16 gene *UGT* biểu hiện khác biệt theo cơ quan (lá, thân, rễ). Trong đó, một số gene *UGT* thể hiện ưu thế biểu hiện ở rễ, trong khi những gene khác lại biểu hiện cao hơn ở lá, khớp với sự phân bố không gian của saponin được quan sát trong các mô của thực vật. Cụ thể, Cheng và cộng sự (2020) đã lựa chọn 16 *UGT* trong số hơn 122 *UGT* được tìm thấy qua transcriptome để xác nhận bằng qRT - PCR cho kết quả các gene như *UGTs* liên quan đến nhóm *UGT71--* và *UGT73--* có biểu hiện cao hơn ở mô rễ hoặc gân lá so với thân [42].

Trong nghiên cứu của Liang và cộng sự (2019) trên 13 gene *GpUGTs* ở Giảo cổ lam (thuộc các phân họ *UGT71*, *UGT74*, *UGT94*) ứng viên cho con đường sinh tổng hợp gypenoside để phân tích biểu hiện theo mô bằng qPCR. Kết quả cho thấy *GpUGT35* có biểu hiện rất cao ở lá: gấp xấp xỉ 28 lần so với thân và gấp xấp xỉ 453 lần so với rễ. Khi xử lý bằng MeJA, *GpUGT35* biểu hiện tăng dần từ 6 giờ đến 18 giờ, cao nhất vào 18 giờ, khoảng 2,17 lần so với thời điểm 0 giờ [99].

Zhang và cộng sự (2021) đã nghiên cứu ở Giảo cổ lam xác định 5 gene *UGT* đóng vai trò sau bước chỉnh sửa khung trong gypenoside. Khi định lượng bằng qPCR, các gene *UGT* như *UGT73B4*, *UGT76B1* có biểu hiện cao ở lá non [173].

Biểu hiện gen *CYP450* trong sinh tổng hợp saponin

Cytochrome P450 monooxygenase (*CYP450*) là một trong những họ enzyme lớn và đa dạng nhất ở thực vật, giữ vai trò trung tâm trong việc biến đổi các khung triterpenoid để tạo nên sự đa dạng cấu trúc của saponin dammaran. Những phản ứng oxy hóa do CYP xúc tác, bao gồm hydroxyl hóa, carboxyl hóa và đôi khi cả ester hóa, là bước quyết định để chuyển tiền chất 2,3-oxidosqualene thành sapogenin mang hoạt tính sinh học. Nhiều nghiên cứu đã ứng dụng kỹ thuật real - time PCR (qPCR) để định lượng biểu hiện của các gene *CYP450*, qua đó

cung cấp dữ liệu thực nghiệm có giá trị về mức phiên mã theo mô, theo giai đoạn phát triển và theo điều kiện sinh lý, sinh thái.

Ở Nhân sâm, *CYP716A47* đã được định danh là enzyme xúc tác bước chuyển dammarenediol-II thành protopanaxadiol (PPD), là tiền chất của hầu hết ginsenoside nhóm PPD. qPCR chứng minh rằng *CYP716A47* có mức biểu hiện cao nhất trong rễ, đặc biệt ở rễ trưởng thành, với cường độ vượt trội so với thân và lá. Dữ liệu này giải thích cơ chế tại sao ginsenoside tích lũy chủ yếu trong rễ Nhân sâm, nơi đóng vai trò là kho dự trữ phòng vệ lâu dài. Một isoform khác, *CYP716A53v2*, xúc tác hydroxyl hóa PPD thành protopanaxatriol (PPT), cũng được phát hiện có biểu hiện mạnh ở rễ, nhưng với tỷ lệ thấp hơn, phản ánh sự chuyên biệt mô và cân bằng tỷ lệ PPD/PPT của Nhân sâm [60].

Khác với Nhân sâm, ở Giảo cổ lam kết quả qPCR cho thấy nhiều gene *CYP* ứng cử viên biểu hiện mạnh tại lá non vốn là cơ quan chính tích lũy gypenoside. Ví dụ, các gene thuộc họ *CYP71*, *CYP86* và *CYP89* thể hiện mức phiên mã cao gấp 3 - 6 lần ở lá non so với rễ hoặc quả. Đặc biệt, một số isoform *CYP716* được tìm thấy trong hệ gene cây Giảo cổ lam có mức biểu hiện vượt trội ở lá non, gợi ý vai trò trực tiếp trong hydroxyl hóa khung dammaran, trước khi bước glycosyl hóa được xúc tác bởi *UGT*. Điều này tạo nên một đối trọng tiến hóa thú vị: trong khi Nhân sâm ưu tiên tích lũy ginsenoside tại rễ, Giảo cổ lam lại tối đa hóa gypenoside ở lá, phản ánh chiến lược sinh thái khác nhau trong đối phó với stress môi trường [39].

Tóm lại, từ các tài liệu đã công bố cho thấy Giảo cổ lam là cây thuốc quý, có nhiều tác dụng như hạ huyết áp, hạ mỡ trong máu, tăng cường sức khỏe, chống não suy, kháng ung thư... Do bị khai thác quá mức để lấy nguyên liệu làm thuốc nên Giảo cổ lam đã được xếp trong thang bậc phân hạng IUCN 1994 sách đỏ VN: EN A1a,c trong sách đỏ Việt Nam. Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nhân giống *in vitro*, nuôi cấy callus cây Giảo cổ lam như Jala và cộng sự (2012) hay Ao và cộng sự (1998), tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào

cây này chưa được thực hiện. Mặc dù đã có nghiên cứu về callus hay rễ tơ Giáo cổ lam, việc nuôi cấy huyền phù tế bào cây này có bổ sung elicitor vẫn chưa được thực hiện. Điều này tạo nền tảng vững chắc cho các mục tiêu nghiên cứu hiện tại của luận án.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật:

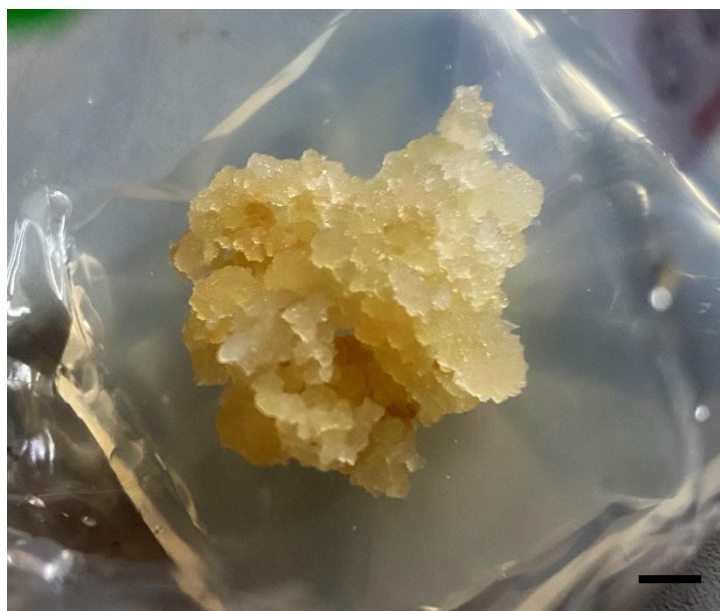
- Vật liệu để nuôi cấy huyền phù là callus thứ cấp có nguồn gốc từ callus sơ cấp (Bắt đầu từ cây *in vitro*, sử dụng lá non để tạo callus sơ cấp, sau đó tiếp tục nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA để tạo callus thứ cấp. Đây là dòng callus tốt nhất, có thể sử dụng để nuôi cấy tế bào huyền phù) [10].

- Chế phẩm chứa gypenoside có nguồn gốc từ tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam.

- Tế bào huyền phù.

Tế bào ung thư: Các dòng tế bào ung thư gan (HepG2, Huh7), ung thư phổi (A549) và tế bào ung thư bạch cầu (HL - 60).

Chuột đực trưởng thành dòng Swiss



Hình 2.1. Callus thứ cấp cây Giảo cổ lam

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hình 1.3 thể hiện khái quát sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án, bắt đầu từ nuôi cấy tạo callus để nuôi cấy tế bào huyền phù trong các điều kiện thí nghiệm khác nhau. Kết quả thu được sẽ được đánh giá các chỉ số như khả năng sinh trưởng, mức độ tích lũy gypenoside và xác định mức độ biểu hiện của một số gene *CYP* và *UGT*.

2.2.1. Nuôi cấy callus

Mẫu lá (lá non, kích thước $0,5 \times 0,5$ cm) và cuống lá (0,5 - 1 cm) *in vitro* 4 tuần tuổi được tạo vết thương nhẹ bằng dao cắt, sau đó cấy lên môi trường MS cơ bản có bổ sung NAA (từ 0,2 - 2,0 mg/L) hoặc 2,4 - D (từ 0,2 - 2,0 mg/L) để cảm ứng tạo callus sơ cấp. Tiếp theo callus sơ cấp được nuôi cấy duy trì để tạo thành callus thứ cấp trên môi trường MS [115] cơ bản có chứa 3% sucrose, 0,8% agar, bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA [10].

Hình 2.1 thể hiện callus thứ cấp 30 ngày tuổi được sử dụng trong bước tiếp theo là nuôi cấy huyền phù trong bình tam giác. Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành trong phòng nuôi cấy mô tế bào thực vật, môi trường nuôi cấy có pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121°C trong thời gian 15 phút, nhiệt độ phòng nuôi $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, thời gian nuôi cấy chiếu sáng 12h sáng/ngày, cường độ chiếu sáng 2.000 lux [10].

2.2.2. Nuôi cấy tế bào huyền phù

2.2.2.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Tế bào huyền phù được nuôi trong các bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường MS lỏng có thành phần giống như môi trường nuôi cấy callus tốt nhất (không có agar). Callus (30 ngày tuổi) được cấy chuyển vào bình tam giác với cỡ mẫu ban đầu là 2 g và tốc độ lắc là 120 vòng/phút trên máy lắc SM 30A trong suốt thời gian nuôi cấy để xây dựng đường cong sinh trưởng của tế bào.

Thời gian xây dựng đường cong sinh trưởng được theo dõi liên tục từ ngày 0 cho đến khi tế bào bước vào pha suy vong. Giai đoạn pha thích nghi (lag phase) rất ngắn vì môi trường mới trong bình tam giác ở nuôi cấy huyền phù có thành phần rất giống môi trường nuôi cấy tạo callus thứ cấp trước đó, khi tế bào không cần phải điều chỉnh sinh lý nhiều để thích ứng với điều kiện nuôi cấy mới trước khi chuyển sang pha sinh trưởng lũy thừa.

Chỉ tiêu theo dõi là khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng gypenoside của tế bào huyền phù. Các thông số được thu thập định kỳ nhằm xác định rõ ràng các pha sinh trưởng và thời điểm bắt đầu tích lũy gypenoside. Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy để xác định khối lượng tươi và khối lượng khô. Tế bào được lọc và rửa sạch môi trường với nước cất bằng hệ thống lọc chân không, cân để xác định trọng lượng tươi. Tế bào sau đó được sấy ở 50°C đến trọng lượng không đổi, cân để xác định trọng lượng khô [123].

2.2.2.2. Xác định hàm lượng gypenoside

Tách chiết gypenoside: Để xác định hàm lượng gypenoside trong mẫu, tế bào được sấy khô ở 50°C đến khối lượng không đổi và tách chiết trong dung môi methanol. Cân chính xác 0,5 g mẫu khô, chiết trong 10 mL methanol 80% có sử dụng siêu âm ở 40°C, thời gian 1,5 giờ sau đó để bay hơi đến khô. Sản phẩm được cân và tái hòa tan trong methanol 80% đến nồng độ khoảng 5 mg/mL, lọc qua màng lọc 0,22 μ m sau đó bảo quản ở 4°C cho các thí nghiệm tiếp theo [161].

Xác định hàm lượng gypenoside: Hàm lượng gypenoside được xác định bằng phản ứng màu với vanillin. 50 μ L dịch chiết gypenoside được chuyển vào ống nghiệm sau đó bổ sung 250 μ L dung dịch 8% vanillin (pha trong ethanol). Hỗn hợp phản ứng được đặt trong nước đá, tiếp tục bổ sung 2,5 mL sulphuric acid 72%, trộn đều và để trên đá ít nhất 3 phút. Ống nghiệm chứa hỗn hợp phản ứng được làm nóng đến 60°C trong 10 phút sau đó được làm lạnh trên nước đá. Phản ứng so màu được thực hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 544 nm [53, 62]. Chất chuẩn được sử dụng trong phân tích HPLC là ginsenoside Rb1 (Y0001347,

CRS, Pháp, độ tinh khiết 98%) [36], [152]. Hàm lượng gypenoside tổng số được xác định theo phương pháp quy đổi về chuẩn Rb1.

Mẫu phân tích được cân chính xác, tách chiết và định mức về thể tích V. Sau khi đo mật độ quang tại cùng điều kiện với chuẩn, nồng độ gypenoside quy đổi theo Rb1 được tính bằng $C_x = (A_x - b)/a$. Hàm lượng gypenoside tổng số được xác định theo công thức:

$$\text{Hàm lượng (mg Rb1 tương đương/g chất khô)} = C_x \times V / (1000 \times m)$$

m: là khối lượng mẫu khô (g).

A: Giá trị mật độ quang đo.

a: Hệ số góc của đường chuẩn.

b: Hệ số chệch (intercept) của đường chuẩn.

C_x: Nồng độ gypenoside

Phương trình đường chuẩn sau khi tiến hành thí nghiệm là:

$$y = 0.0017x + 0.026, \text{ hệ số tương quan } R^2 = 0.999$$

Xác định hàm lượng Rb1:

Chất chuẩn ginsenoside Rb1 tinh khiết $\geq 98\%$ được cân chính xác 1,0 mg và hòa tan trong methanol để thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Từ dung dịch gốc này, tiến hành pha loãng tuần tự bằng methanol để tạo dãy chuẩn gồm các mức nồng độ 20, 40, 60, 80 và 100 $\mu\text{g/mL}$.

Cân chính xác mẫu nghiên cứu 10 – 20 mg, thêm methanol, siêu âm trong 30 phút, sau đó ly tâm và lọc qua màng 0,22 μm trước khi đưa vào chạy HPLC. Toàn bộ mẫu và dung dịch chuẩn được xử lý dưới cùng điều kiện để đảm bảo tính so sánh khi quy đổi theo đường chuẩn Rb1.

HPLC được thực hiện trên hệ thống Alliance E2695 với cột Symmetry[®]C18 (4,6 mm $\times$ 250 mm $\times$ 5 mm). Hàm lượng Rb1 trong mẫu được tính theo quan hệ tỷ lệ:

$$\text{Hàm lượng Rb1 trong mẫu (mg/g)} = (A_m / A_p) \times C_p \times (V / m)$$

Trong đó:

A_m : Diện tích peak Rb1 của mẫu

A_p : Diện tích peak Rb1 của dung dịch chuẩn

C_p : Nồng độ chuẩn Rb1 (mg/mL)

V : Thể tích định mức dịch chiết mẫu (mL)

m : Khối lượng mẫu khô ban đầu (g)

2.2.2.3. Ảnh hưởng của môi trường và điều kiện nuôi cấy lên sinh trưởng của tế bào

Sau khi xác định được thời gian tích lũy sinh khối và gypenoside tối ưu, chúng tôi tiếp tục tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố của điều kiện nuôi cấy, bao gồm: các chất điều hòa sinh trưởng trong đó có sự phối hợp giữa cytokinin (BAP và KIN) và auxin (IBA) tương tự như trong thí nghiệm phát sinh callus thứ cấp; Nguồn carbon bao gồm sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose và glycerol được bổ sung riêng lẻ vào môi trường nuôi cấy huyền phù tế bào ở nồng độ 3%; Sử dụng các cỡ mẫu ban đầu khác nhau (từ 4 - 8%, tương đương 2 - 4 g tế bào/bình); Tiến hành với các tốc độ lắc khác nhau (100, 120 và 150 vòng/phút) [10].

Mẫu được thu vào thời gian đạt sinh trưởng và tích lũy gypenoside cực đại, các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng gypenoside.

2.2.2.4. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor 12 L

Hệ hống LiFlux GX (Hanil, Hàn Quốc) được sử dụng để nuôi cấy, thể tích nuôi cấy 12 L, tỷ lệ mẫu ban đầu là 10% (v/v) (tương đương với bổ sung 12 bình 50 mL), tốc độ khuấy 150 vòng/phút, các thông số khác được cài đặt mặc định [105]. Môi trường sử dụng trong thử nghiệm là môi trường lỏng tốt nhất thu được trong nuôi cấy tế bào. Mẫu được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy, các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng gypenoside.

Sinh trưởng của huyền phù tế bào trong bioreactor 12 L được theo dõi thông

qua lấy mẫu định kỳ sau mỗi 2 ngày nuôi cấy. Trước mỗi lần lấy mẫu, dịch nuôi được khuấy trộn đều, sau đó hút một thể tích xác định (50 mL) qua van lấy mẫu trong điều kiện vô trùng. Ly tâm thu sinh khối, thấm khô trên giấy lọc để xác định khối lượng tươi, sau đó sấy ở 60 °C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng khô.

2.2.3. Xử lý elicitor

2.2.3.1. Chuẩn bị elicitor

MeJA (392707 - 5ML, Sigma, Mỹ) và SA (30422 - 05, Nacalai, Nhật Bản) được khử trùng bằng màng lọc 0,22 µm và bổ sung vào môi trường đã khử trùng. Nấm Fox (*Fusarium oxysporum*) [69]. Fox và YE (64343, Biorad, Mỹ) được thêm vào môi trường trước khi khử trùng. Các elicitor được bổ sung vào môi trường nuôi cấy lắc các tế bào Giảo cổ lam trong bình tam giác.

2.2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ elicitor

Ảnh hưởng của nồng độ các elicitor được đánh giá bằng cách bổ sung riêng lẻ MeJA, SA, YE và Fox vào môi trường với các nồng độ khác nhau tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy (thời điểm ngày 0). Trong đó, MeJA và SA có nồng độ từ 25 - 200 µM, YE và Fox từ 1 - 5 g/L. Đối chứng là công thức không bổ sung elicitor.

2.2.3.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor

Các nồng độ của elicitor cho tế bào huyền phù Giảo cổ lam sinh trưởng và tích lũy gypenoside tốt nhất được lựa chọn để đánh giá thời điểm bổ sung tối ưu. Các nồng độ được lựa chọn là MeJA (50 µM), SA (100 µM), và YE (3 g/L). Elicitor được bổ sung vào môi trường ở thời điểm từ 0 - 15 ngày nuôi cấy (mỗi công thức thí nghiệm cách nhau 3 ngày). Đối chứng là công thức bổ sung elicitor tại thời điểm ban đầu [120], [130], [135]. Các tế bào được thu vào ngày thứ 18 để đánh giá.

Sau khi xác định nồng độ và thời điểm bổ sung thích hợp đối với các elicitor riêng lẻ, các elicitor sẽ được bổ sung đồng thời vào môi trường nuôi cấy theo các

tổ hợp phối hợp khác nhau để đánh giá khả năng phối hợp của các elicitor.

2.2.4. Xác định đặc điểm của một số gene *CYP* và *UGT*

2.2.4.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gene

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá cây *in vitro* bằng kit TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tiến hành điện di kiểm tra DNA tổng số thu được trên gel agarose 1% (w/v). Mẫu DNA tổng số sau đó được bảo quản -20°C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Phản ứng PCR được thực hiện với DNA tổng số là khuôn mẫu, sử dụng 12 cặp mồi đã được công bố bởi Zhang và cộng sự (2021) (Bảng 2.1) [173]. Trong đó các mồi khuếch đại ORF đầy đủ của 12 gen *CYP* và *UGT* được thiết kế dựa trên trình tự cDNA/ORF đã công bố trong bộ dữ liệu transcriptome và proteome của Giảo cổ lam. Trình tự FASTA của từng gen được lấy từ phần phụ lục của bài báo. Các mồi được thiết kế từ vùng ORF đầy đủ bằng Primer Premier 5 và kiểm tra đặc hiệu bằng BLASTn trên toàn bộ bộ transcriptome. Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1 µL DNA tổng số (100 ng/µL), 1 µL mồi của mỗi loại (10 pmol), 10 µL 2× GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 3 µL nước cất, tổng thể tích phản ứng là 12 µL. Phản ứng PCR được thực hiện trong máy gia nhiệt (SimpliAmp, ThermoFisher Scientific, USA) với quy trình chạy như sau: 95°C trong 3 phút, 30 chu kỳ ở 95°C trong 1 phút, 50°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% và nhuộm bằng SafeView™ Classic (abm, Canada).

Bảng 2.1. Trình tự mồi trong nhận diện các gene [173]

Gene	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>CYP 71B19</i>	TAAACCAAAGAAACCATGAAGGA TCATCCGACCATAAACTTTTCA	1666

<i>CYP 77A3</i>	CCCATTTCCTTTCTTCAACAAT ATGCTCCTTTAAACCCTAGA	1522
<i>CYP 86A7</i>	GTCAATGATGGATACGGTG TCGGCCTGAAACCTCAA	1637
<i>CYP 86A8</i>	AAGAAAGATATGGAGTTGGG CAACCAATCACGCCTTC	1668
<i>CYP 89A2</i>	GAAGTGAAACAGAAATGGAGA GCTAGAACCTGGAACGTAAA	1533
<i>CYP 90A1</i>	CCCATTTCATGGCGTG CTGCTCCTCTCTACATTATCAA	1506
<i>CYP 94A1</i>	TCTTTCTCTAATGGATATCTGTGTT GAACTCACATCTCCCTCTTCT	1523
<i>UGT 73B4</i>	AGAAGAAACGGAGCACA ACCATTCATAAATCAAACCG	1466
<i>UGT 76B1</i>	CATGGACAGGATCCAACAA CAAGCATTTTTTACAATCTTATCG	1375
<i>UGT 74F2</i>	GGCAGACAAAAATGAAAACGG TTGATTCTATTTCAAAGCCAAA	1398
<i>UGT 91C1</i>	GCCTTCAAATGGAAAACGAA CCTTCCATTTTTTCAAATCCTCA	1425
<i>UGT 91A1</i>	AAGCACATTTACCATGGCTGC AGCATCAATGGCTTTTCAGATACT	1400

2.2.4.2. Phân tích trình tự gene và xây dựng cây phát sinh

Trình tự nucleotide của sản phẩm PCR đại diện cho 2 nhóm *CYP* và *UGT* được phân tích trực tiếp bằng phương pháp Sanger (công ty Firstbase, Malaysia). Trình tự nucleotide của các mẫu được kiểm tra bằng phần mềm BioEdit, sau đó so sánh với các trình tự đã được công bố trên ngân hàng gene thông qua công cụ BLAST. Các trình tự DNA được sắp xếp giống cột bằng chức năng Clustal W

trên phần mềm MEGA11 với các tham số mặc định. Cây phát sinh được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000 [149].

2.2.4.3. Dự đoán đặc điểm và chức năng của enzyme

Đoạn gene *CYP89A2* có mức độ tương đồng cao với trình tự gene đã được công bố, do đó, chúng tôi sử dụng trình tự mRNA đã được công bố (MT416753) để dự đoán cấu trúc và chức năng của enzyme này. Kết quả dự đoán cho thấy protein *CYP89A2* có cấu trúc tương đồng 26% với sugiol synthase của cây Đan sâm *CYP76AH3* (mã số PDB: 7x2q, mã số Phyre: c7x2qA_) với độ bao phủ 91% (460/506 amino acid) và độ tin cậy 100%.

Đặc điểm và chức năng của enzyme đại diện cho 2 nhóm CYP và UGT từ cây Giảo cổ lam được dự đoán bằng các công cụ tin sinh học, bao gồm protein domain [91]. Mô hình cấu trúc không gian của enzyme được dự đoán bằng công cụ Phyre2.2 [72]. Cấu trúc xoắn xuyên màng được dự đoán nhờ TMHMM Server v. 2.0 [79]. Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu N (N-glycosylation) của enzyme bằng công cụ NetNGlyc 1.0 Server [51].

Đặc điểm hóa-lý của các enzyme được dự đoán như điểm đẳng điện bằng công cụ IPC 2.0 [78], khả năng chịu nhiệt được dự đoán bằng công cụ Tm Predictor. Môi trường xúc tác (acid/base) của enzyme được dự đoán bằng công cụ AcalPred [100].

2.2.5. Xác định mức độ phiên mã của các gene *CYP* và *UGT*

2.2.5.1. Tách chiết RNA tổng số và tổng hợp sợi cDNA thứ nhất

Tiến hành thu mẫu tế bào huyền phù sau xử lý kích kháng, cụ thể là: mẫu xử lý với YE thì lấy mẫu tế bào sau 2 giờ xử lý, mẫu xử lý với SA thì lấy mẫu sau 4 giờ, mẫu xử lý với MeJA thì lấy mẫu sau 18 giờ.

RNA tổng số của tế bào được tách chiết bằng kit GeneJET Plant RNA Purification Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Phản ứng tổng hợp sợi cDNA thứ nhất bằng kit First Strand cDNA Synthesis

(#K1612, Fermentas) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng thể tích phản ứng 20 μL chứa 5 μg RNA tổng số, 0.5 μg oligo(dT)18 primer, 4 μL đệm phản ứng, 20 đơn vị enzyme RiboLockTM ribonuclease inhibitor, 2 μL 10 mM dNTP và 40 đơn vị enzyme phiên mã ngược. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 60 phút, sau đó dừng phản ứng bằng cách ủ 70°C trong 5 phút và làm lạnh trên đá, bảo quản ở nhiệt độ -40°C.

2.2.5.2. Phân tích realtime - PCR

Để đánh giá mức độ phiên mã của các gene *CYP* và *UGT*, chúng tôi tiến hành phản ứng realtime PCR với cặp mồi đặc hiệu của gene này [173], sử dụng nội đối chứng là 18sRNA [157] (Bảng 2.2).

Phản ứng realtime PCR được thực hiện với kit GoTaq^(R) qPCR Master Mix (A6001, Promega, Mỹ) theo quy trình chạy như sau: 95°C trong 2 phút, 40 chu kỳ ở 95°C trong 15 giây và 60°C trong 1 phút [173]. Thành phần phản ứng: 10 μL Go Taq qPCR Master Mix 2X (Promega, Mỹ), 1 μL mồi mỗi loại (10 pmol), 1 μL cDNA, 7 μL nước cất. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên hệ thống QuantStudioTM 5 Real - Time PCR (ABI, Mỹ).

Mức độ phiên mã tương đối của các gene được tính theo phương pháp $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. Giá trị Ct được xác định cho gene đích và gen nội chuẩn. Với mỗi mẫu, tính $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{gene đích}} - \text{Ct}_{\text{gene nội chuẩn}}$. Tính $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{xử lý}} - \Delta\text{Ct}_{\text{đối chứng}}$. Hệ số thay đổi biểu hiện (fold-change) được tính theo công thức: Fold-change = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Bảng 2.2. Các mồi được sử dụng để phân tích mức độ phiên mã

Gene	Trình tự mồi	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>CYP 71B19</i>	AATGGCGGAAC TCGCAAAAC TCATCGGTTTCGGTTTCGGT	111
<i>CYP 77A3</i>	CAATCTCTTCCAAATCGCTC	136

	AATCAAACCAGCATCACTCA	
<i>CYP 86A7</i>	TCAACAACGAGACGATGGCA AGGAACGTGTCGGAGTAGGA	108
<i>CYP 86A8</i>	AGTATGGCCTGAAAGTGAAC TAACGGCGGTAATTATTGGA	105
<i>CYP 89A2</i>	CCCTTCCAAACTCACAAAAC AATGGAGATTGCGAAGAGTT	116
<i>CYP 90A1</i>	GGAAATCTCGGTTTACCCTT AACAAATGGGTCGTGAAAAC	128
<i>CYP 94A1</i>	TTTCTTGGGCCGTGGAATCT ATCGGAATCAGCCTCGTCTT	147
<i>UGT 76B1</i>	TGGAATAAACTGCCTCTG GGGATAAATCGGAACCAAGA	103
<i>UGT 74F2</i>	TTTCTTTTTCCGGCGAACCC AAAGCCCCCATTAACCCGAA	97
<i>UGT 73B4</i>	GGGTTTGGGATTGGTATTGA TCCCTTCTCTCCATTCATCA	108
<i>UGT 91A1</i>	AATCGGTCAACTCCCGACAA CTTGACTCGGTTTGGCTTCG	140
<i>UGT 91C1</i>	TGAGGCGAATCTGAGCGAAA TGAATCCCGCCGGTAACATC	128
<i>GP-18sRNA</i>	ACGATGCCGACCAGGGATT TTCAGCCTTGCGACCATACTC	106

2.2.6. Phân tách hợp chất thứ cấp

2.2.6.1. Chuẩn bị cao chiết Giảo cổ lam

Mẫu Giảo cổ lam được chiết trong methanol 80% với tỉ lệ 1:20 khối lượng/thể tích có sử dụng siêu âm ở 40°C, thời gian 1,5 giờ sau đó tiến hành cô quay thu hồi dung môi tạo cao chiết tổng số. Cao chiết được tái hòa tan đến các

nồng độ nhất định để sử dụng trong thí nghiệm đánh giá khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột (với dung môi là nước) và gây độc tế bào ung thư (dung môi DMSO).

Để thử nghiệm hoạt tính gypenoside, mẫu Giảo cổ lam tự nhiên (khoảng 50% thân và 50% lá) và tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam không xử lý elicitor sau 18 ngày nuôi cấy được chiết xuất bằng dung môi methanol và thu nhận mẫu cao khô.

2.2.6.2. Tinh chế chế phẩm có chứa gypenoside

Quy trình tách chiết được thực hiện theo Liang và cộng sự (2014) [98] có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Sau khi thu được cao chiết tổng từ quy trình chiết tối ưu, cao chiết được làm khô ở nhiệt độ 50°C. Bổ sung petroleum ether với thể tích gấp 3 lần khối lượng cao chiết, sau đó siêu âm (S10H, Elmasonic) ở 40°C trong 30 phút, lọc và thu tủa. Phần kết tủa được rửa hai lần với chloroform, mỗi lần sử dụng lượng chloroform gấp 3 lần khối lượng kết tủa. Dung dịch được lọc để loại bỏ chloroform. Tiếp tục chiết với ethyl acetate để loại flavonoid và polyphenol. Bước cuối cùng là chiết với n -butanol và thu nhận chế phẩm có chứa gypenoside tương đối tinh khiết. Chế phẩm sau đó được hòa tan trở lại trong DMSO để nghiên cứu khả năng gây độc tế bào hoặc trong methanol để tạo sử dụng trong phương pháp HPLC.

2.2.7. Thử nghiệm khả năng ức chế tế bào ung thư

2.2.7.1. Nuôi cấy tế bào ung thư

Các dòng tế bào ung thư gan (HepG2, Huh7) và ung thư phổi (A549) được nuôi cấy trên đĩa nuôi cấy bám dính T75 (Nunc, Đan Mạch), trong khi đó dòng tế bào ung thư bạch cầu (HL - 60) được nuôi huyền phù. Tế bào được nuôi trên môi trường DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) hoặc MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) bổ sung 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 unit/mL penicillin và 100 µg/mL streptomycin (Invitrogen Gibco) ở 37°C trong điều kiện 5% CO₂. Các tế bào được cấy chuyển khi đạt đến mật độ 80%, tỷ lệ sống của tế bào được xác định bằng phương pháp nhuộm trypan blue và quan sát

dưới buồng đếm hồng cầu [137], [170], [151].

Để đánh giá tác động của cao chiết Giảo cổ lam và gypenoside lên sự sinh trưởng và phát triển của tế bào, sáu ngàn tế bào được cấy vào mỗi giếng trên đĩa 96 giếng trong 200 μ L môi trường và được nuôi cấy trong 24 giờ. Sau đó, môi trường cũ được loại bỏ trước khi xử lý tế bào bằng môi trường nuôi cấy có chứa cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside ở các nồng độ 4, 20, 100 và 200 μ g/mL trong 72 giờ. Một đĩa khác không xử lý cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside được ủ trong 30 phút và dùng như ngày 0.

2.2.7.2. Phân tích độc tính tế bào

Phương pháp nhuộm sulforhodamine B được thực hiện theo Vajrabhaya và cộng sự (2018) [153]. Sau khi được xử lý với cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside, các tế bào nuôi cấy bám dính lớp đơn (HepG2, Huh7 và A549) được cố định với 10% trichloroacetic acid. Tế bào sau khi cố định được nhuộm với sulforhodamine B trong 30 phút, sau đó rửa và phân tách với 1% acetic acid (v/v) để loại bỏ thuốc nhuộm thừa. Khả năng sinh trưởng của tế bào được xác định bằng cách hòa tan protein-bound dye trong dung dịch 10 mM Tris base sau đó đo mật độ quang ở bước sóng 540 nm [140], [84].

2.2.7.3. Phân tích Tetrazolium

Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside lên sự sinh trưởng và phát triển của tế bào ung thư bạch cầu HL - 60 được xác định bằng phân tích MMT [139]. Đầu tiên, tế bào huyền phù HL - 60 được nuôi ở mật độ 4×10^4 tế bào/mL trên đĩa 96 giếng. Sau đó, tế bào được xử lý bằng các nồng độ cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside khác nhau và nuôi cấy trong 24 giờ. Dung dịch muối tetrazolium MTT (5 mg/mL) được bổ sung vào mỗi giếng và ủ tiếp 4 giờ ở 37°C trong điều kiện 5% CO₂. Đĩa nuôi cấy sau đó được ly tâm và loại bỏ dịch nổi. Tinh thể formaran được hòa tan bằng 50 μ L DMSO 100% sau đó mật độ quang được xác định ở bước sóng 540 nm bằng máy đọc đĩa. Tỷ lệ phần trăm ức chế sự phát triển của tế bào khi có mặt cao chiết Giảo cổ lam hoặc gypenoside sẽ được

xác định thông qua công thức sau:

$$\% \text{ ức chế} = 100\% - [\text{OD (mẫu)} - \text{OD (blank)}] / [\text{OD (DMSO)} - \text{OD (blank)}]$$

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo tính chính xác. Ellipticine ở các nồng độ 10 µg/mL, 2 µg/mL, 0,4 µg/mL và 0,08 µg/mL được sử dụng như làm đối chứng dương; 1% DMSO được sử dụng làm đối chứng âm [30], [110], [52].

2.2.8. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột của cao chiết

Stress nhiệt ảnh hưởng nghiêm trọng đến cấu trúc mô học tinh hoàn và quá trình sinh tinh [150]. Stress nhiệt ảnh hưởng đến tất cả các tế bào trong mô tinh hoàn, đặc biệt là các tế bào dòng tinh. Cơ chế tác động chính của stress nhiệt liên quan đến quá trình gia tăng sản xuất các gốc oxy hóa tự do, chết lập trình và đứt gãy DNA [138]. Nghiên cứu của Kopalli và cộng sự (2019) cho thấy Nhân sâm Hàn Quốc với thành phần chính là Rg3 có tác dụng bảo vệ hệ thống sinh sản của chuột đực dưới tác dụng của stress nhiệt [77].

Thí nghiệm được tiến hành trên 40 con chuột đực trắng dòng Swiss, có sức khỏe tốt không bị bệnh, 10 - 12 tuần tuổi, cân nặng 20 - 25 g. Chuột được phân bố ngẫu nhiên: nhóm chứng 10 con chuột đực xử lý với nhiệt độ 25°C, nhóm stress nhiệt 40°C (H40) gồm 10 con chuột đực xử lý với nhiệt độ 40°C, nhóm stress nhiệt 40°C uống dịch cao chiết Giảo cổ lam tự nhiên 200 mg/kg (H40+N) và nhóm stress nhiệt 40°C uống dịch cao chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam 200 mg/kg (H40+CS) [15], [133], [50], [122].

Quy trình thí nghiệm trên động vật trong nghiên cứu này được triển khai theo các yêu cầu về đạo đức nghiên cứu, đã được thẩm định và phê duyệt bởi Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế (chứng nhận số H2019/345). Động vật thí nghiệm (chuột đực Swiss trưởng thành) được nuôi trong điều kiện kiểm soát nhằm bảo đảm phúc lợi và giảm sai lệch thực nghiệm, gồm nhiệt độ ổn định 25±1°C, chu kỳ sáng/tối 12 giờ, đồng thời được cung cấp thức ăn và nước uống đầy đủ, theo dõi sức khỏe trong suốt thời gian nghiên cứu. Khi kết thúc thí nghiệm, chuột

được gây mê để phục vụ các phân tích tiếp theo, nhằm giảm đau và hạn chế tối đa khó chịu cho động vật.

2.2.8.1. Phương pháp xử lý stress nhiệt

Chuột được cung cấp bởi Viện Pasteur Nha Trang được nuôi thích nghi tại phòng thí nghiệm trong 2 tuần. Sau đó nhóm có uống dịch cao chiết được uống 1 tuần trước khi xử lý nhiệt. Chuột được xử lý stress nhiệt bằng cách ngâm 1/3 thân dưới bao gồm bìu của chuột vào nước trong bể ổn nhiệt theo thứ tự nhiệt độ: nhóm chứng 25°C (CON); nhóm stress nhiệt 40°C (H40), nhóm stress 40°C có uống uống dịch cao chiết Giảo cổ lam tự nhiên 200 mg/kg (H40 + N), và nhóm stress 40°C có uống uống cao dịch chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam 200 mg/kg (H40 + CS). Thời gian xử lý nhiệt: mỗi lần 10 phút, 2 lần mỗi ngày cách nhau 10 phút và 6 ngày mỗi tuần (nghỉ Chủ Nhật) trong 5 tuần liên tiếp. Sau khi hoàn thành thời gian thí nghiệm xử lý nhiệt, tất cả chuột được xử lý và tiến hành thu mẫu máu và tinh hoàn [15], [133], [50], [122].

2.2.8.2. Phương pháp xác định nồng độ testosterone

Testosterone được sản xuất chủ yếu ở tế bào Leydig trong mô tinh hoàn, có chức năng chính là duy trì chức năng sinh sản của nam giới và thúc đẩy quá trình sinh tinh [57]. Nồng độ testosterone ở nam giới có xu hướng giảm dần theo tuổi tác, bệnh lý, và các yếu tố stress. Testosterone thấp có liên quan đến tăng nguy cơ mắc bệnh và tử vong. Hiện tại, liệu pháp thay thế testosterone, có thể làm trầm trọng thêm các tình trạng bệnh lý đã có từ trước. Do đó, việc sử dụng các lựa chọn thay thế, chẳng hạn như sử dụng thảo mộc là một lựa chọn điều trị tiềm năng [146].

Sau 5 tuần xử lý nhiệt, chuột được xử lý, bộc lộ vùng ngực và thu máu qua tim. Mẫu máu được thu vào ống máu chứa chất chống đông, sau đó được ly tâm 3000 vòng trong 5 phút để thu huyết tương. Huyết tương được sử dụng để xác định nồng độ testosterone sử dụng máy xét nghiệm miễn dịch tự động Cobas e411 (ROCHE). Nồng độ testosterone trong huyết tương được xác định bằng kỹ thuật miễn dịch điện hóa phát quang sử dụng bộ kit Elecsys Testosterone II. Máu được

thu từ tim chuột dưới gây mê, ly tâm ở 2.000 vòng/phút, 4°C trong 20 phút để thu huyết tương. Mẫu sau đó được phân tích theo đúng hướng dẫn của nhà sản xuất [76], [122], [16]. Trong mỗi lần chạy, hệ thống tự động hiệu chuẩn bằng hai dung dịch chuẩn (Calibrator 1 và 2) đi kèm bộ kit.

2.2.8.3. Nhuộm Hematoxylin và Eosin

Mẫu mô tinh hoàn chuột sau khi cố định được chuyển đúc mẫu trong paraffin. Mẫu mô được cắt lát mỏng bằng máy cắt tiêu bản. Tiêu bản mô học tinh hoàn chuột được nhuộm Hematoxylin và Eosin. Kỹ thuật nhuộm Hematoxylin và Eosin được tiến hành gồm các bước theo hướng dẫn quy trình kỹ thuật giải phẫu bệnh - tế bào học của Bộ Y tế. Mẫu mô tinh hoàn sau khi lấy ra khỏi cơ thể chuột được ngâm vào dung dịch cố định formol đậm trung tính 4% trong 24 giờ. Mẫu mô được xử lý qua các công đoạn: khử nước bằng ethanol, khử ethanol bằng xylen, vùi parafin để đúc khối, sau đó tiến hành cắt các mảnh mô với độ dày 5 μ m và chuyển lên cố định trên lam kính tráng gelatin. Tiếp theo, mẫu mô được loại parafin bằng xylen, loại xylen bằng ethanol, loại ethanol bằng nước. Cuối cùng, mẫu mô được tiến hành nhuộm Hematoxylin và Eosin. Hình ảnh mô học được quan sát dưới kính hiển vi quang học để phân tích mô bệnh học [16], [46].

2.2.9. Xử lý thống kê

Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên và lặp lại 3 lần, sau đó các kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test với $p < 0,05$ sử dụng phần mềm SPSS ver 20.0.

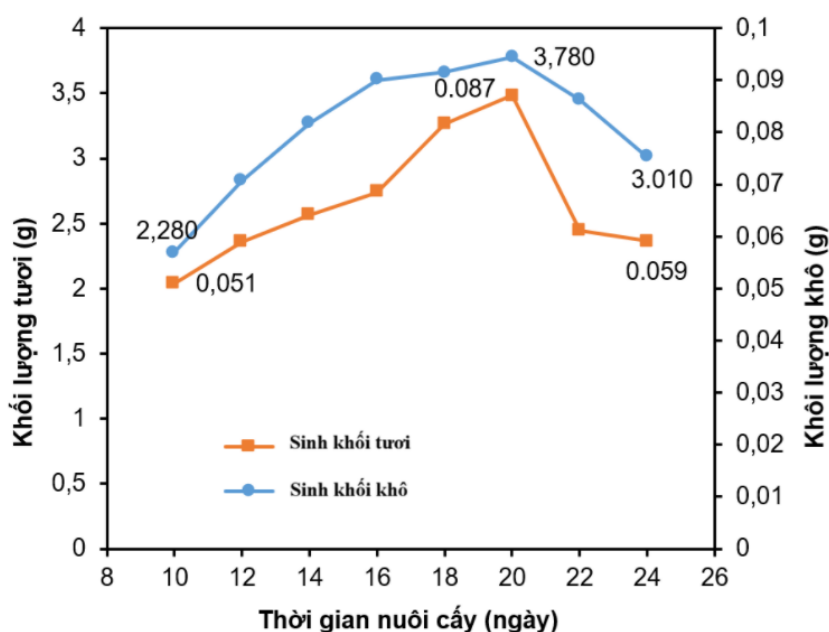
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY LÊN QUÁ TRÌNH TÍCH LŨY GYPENOSIDE TRONG TẾ BÀO HUYỀN PHÙ

3.1.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên sinh trưởng của tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam được trình bày ở hình 3.1 và hình 3.2. Từ khi bắt đầu nuôi cấy đến giai đoạn 10 ngày, tế bào sinh trưởng rất ít, chỉ tăng từ 2 g lên 2,28 g. Sau đó, sinh khối tế bào tăng liên tục từ 10 ngày đến 20 ngày nuôi cấy, sinh khối cao nhất đạt 3,78 g tươi/bình, tương ứng với 0,09 g khô/bình với chỉ số sinh trưởng là 1,89 sau 20 ngày nuôi cấy. Sau khi sinh trưởng tối ưu, sinh khối tế bào giảm liên tục, đến ngày thứ 24 chỉ thu được 3,01 g tươi (0,06 g khô) với chỉ số sinh trưởng là 1,51.

Trong nuôi cấy tế bào thực vật, các hợp chất thứ cấp tích lũy nhiều nhất vào cuối giai đoạn sinh trưởng cực đại. Khi tốc độ sinh trưởng cao, các quá trình sơ cấp của tế bào là phân chia tế bào và sản xuất sinh khối tế bào đã diễn ra mạnh mẽ. Ngược lại, trong pha tĩnh khi sự sinh trưởng giảm, lúc này hoạt động sản xuất và tích lũy các chất thứ cấp mới tăng lên [154].



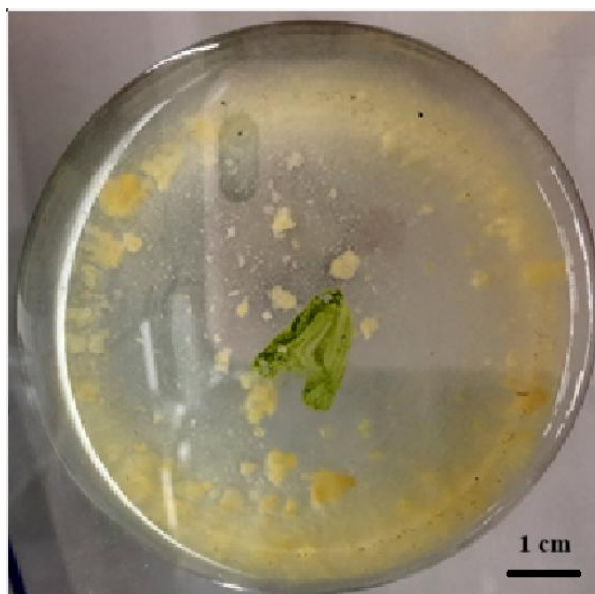
Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên tích lũy gypenoside và Rb1

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
10	28,291 ^{cd}	0,010 ^d
12	30,343 ^c	0,011 ^d
14	36,210 ^b	0,012 ^d
16	41,321 ^a	0,022 ^c
18	42,122 ^a	0,049 ^a
20	34,100 ^c	0,050 ^a
22	25,510 ^d	0,041 ^a
24	24,081 ^d	0,024 ^c

Các chữ cái khác nhau (a–d) trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các thời điểm nuôi cấy (ANOVA một nhân tố, phép thử hậu nghiệm DUNCAN; $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

So với sinh trưởng của tế bào, sự tích lũy gypenoside trong tế bào Giảo cổ lam đạt cực đại sớm hơn từ 2-4 ngày. Khả năng tích lũy gypenoside trong tế bào tăng dần từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 16, ổn định trong khoảng ngày 16-18 sau đó giảm dần từ ngày thứ 20. Hàm lượng gypenoside thu được cao nhất là 42,122 mg/g vào ngày thứ 18 (sai khác không có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ 16) (Bảng 3.1). Trong khi đó, hàm lượng Rb1 thu được cao nhất rơi vào khoảng ngày thứ 18-20 (khoảng 0,05 mg/g khô), chậm hơn so với tích lũy gypenoside khoảng 2 ngày. So với callus và mẫu tự nhiên, sự tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù cao hơn, hàm lượng gypenoside và Rb1 trong callus là 36,298 và 0,009 mg/g chất khô [10].



Hình 3.2. Tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam sau 20 ngày nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA

Trong các nghiên cứu đã công bố trước đây, hàm lượng gypenoside trong mẫu Giảo cổ lam dao động từ 15 đến 60 mg/g khô, tương đương với số liệu trong nghiên cứu của chúng tôi. Ví dụ, trong rễ tơ có xấp xỉ 38 mg gypenoside/g khô, trong rễ cây trưởng thành chứa xấp xỉ 15 mg/g, trong lá khoảng 42 mg/g và trong các sản phẩm thương mại tại Trung Quốc dao động từ 53 - 66 mg/g khô [35]. Tại Việt Nam, hàm lượng saponin toàn phần trong cây Giảo cổ lam 5 lá thu hái tại Thái Nguyên khoảng 46,9 mg/g khô (4,69%) [7].

Một số nghiên cứu trước đây cho thấy, đa số trường hợp nuôi cấy callus hoặc tế bào thực vật đều cho hàm lượng các chất thứ cấp cao hơn nhiều lần so với trong điều kiện tự nhiên. Chẳng hạn, Nguyễn Hoàng Lộc và cộng sự (2010) đã nghiên cứu sản xuất solasodine từ callus cây cà gai leo *in vitro* và kết quả cho thấy, hàm lượng solasodine tích lũy trong callus cao hơn khoảng 8,5 lần so với tách chiết từ rễ cây tự nhiên 1 năm tuổi [102]. Tiếp tục nghiên cứu nuôi cấy tế bào cà gai leo trong bình tam giác, các tác giả nhận thấy solasodine tích lũy trong tế bào huyền phù cao hơn trong callus [106]. Theo Ncube và cộng sự (2015), trong điều kiện bình thường, thực vật chỉ sản xuất ra một lượng hợp chất thứ cấp ở mức tối thiểu theo nhu cầu của cơ thể và chúng không đóng vai trò lớn đối với các hoạt động

sống sơ cấp của tế bào [119]. Khi gặp các điều kiện bất lợi của môi trường, hợp chất thứ cấp mới được sản xuất nhiều hơn trong tế bào để chống lại các tác nhân bên ngoài [28].

Như vậy, sự sinh tổng hợp gypenoside nói chung và Rb1 nói riêng đã diễn ra trong tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam, trong đó hàm lượng gypenoside lẫn Rb1 trong tế bào đều cao hơn so với callus, tương đương với mẫu thân nhưng vẫn thấp hơn mẫu lá tự nhiên. So với mẫu rễ tơ đã được công bố, hàm lượng gypenoside trong tế bào có giá trị tương đương [35].

Sản xuất các hợp chất nhóm saponin bằng nuôi cấy tế bào huyền phù đã được nhiều tác giả thực hiện và công bố. Ginsenoside là các hợp chất saponin thuộc nhóm triterpene, được xem là thành phần có hoạt tính sinh học quan trọng nhất trong Nhân sâm. Khả năng tổng hợp ginsenoside từ nuôi cấy rễ đã được gây đột biến của Nhân sâm có sử dụng elicitor sinh học đã được Lee và cộng sự (2018) nghiên cứu. Tất cả 5 chủng vi khuẩn cố định đạm và 4 chủng vi khuẩn lên men được sử dụng đều có ảnh hưởng đến khả năng tích lũy sinh khối và ginsenoside. Hàm lượng saponin cao nhất thu được trong nuôi cấy rễ với *Mesorhizobium amorphae* (GS3037) sau 5 ngày khoảng 105,58 mg/g khối lượng khô so với 74,48 mg/g ở thí nghiệm đối chứng không bổ sung elicitor. Sự tích lũy của ginsenosides Rb2 và Rb3 tăng đáng kể, tương ứng là 19,4 và 4,4 lần; 18,8 và 4,8 lần sau 5 ngày xử lý với *M. amorphae* (GS3037) và *M. amorphae* (GS336) [87].

Nhiều loại saponin khác cũng đã được sản xuất bằng phương pháp nuôi cấy mô thực vật có xử lý elicitor. Lee và cộng sự (2018) đã nghiên cứu phương thức tăng tổng hợp saponin trong nuôi cấy tế bào cây Gai thầu dầu bằng cách sử dụng elicitor. Khi nuôi cấy tế bào không bổ sung elicitor, hàm lượng saponin tổng số thu được là 1,56 mg/60 mL sau 15 ngày nuôi cấy. Khi bổ sung coronatine 1 μ M, lượng saponin tích lũy tăng lên 160%. Ngoài ra, các tác giả nhận thấy, coronatine làm tăng biểu hiện sinh tổng hợp beta - amyrin từ đó dẫn đến tích lũy oleanolic acid [88].

Nhan và cộng sự (2018) nghiên cứu ảnh hưởng của elicitor lên quá trình tổng hợp eurycomanone ở loài Mật nhân. Eurycomanone là một hợp chất thứ cấp có giá trị, thuộc nhóm hợp chất quassinoid, biểu hiện hoạt tính chống sốt rét và tăng cường sản xuất testosterone ở chuột, ức chế tế bào ung thư phổi. Các nồng độ khác nhau của dịch chiết nấm men (YE) (20 - 250 mg/L), MeJA (20 - 500 μ M) và SA (20 - 500 μ M) đã được sử dụng để phân tích ảnh hưởng lên sinh trưởng của tế bào và tích lũy eurycomanone sau 14 ngày nuôi cấy. Kết quả cho thấy hàm lượng eurycomanone trong tế bào được xử lý với 20 μ M MeJA sau 4 ngày nuôi cấy đạt giá trị cực đại khoảng 17,36 mg/g trọng lượng khô và tăng từ 8-10 lần so với nhóm không xử lý elicitor [123]. Kwan và cộng sự (2021) nghiên cứu ảnh hưởng của 3 elicitor sinh học (YE, pectin và valine) lên khả năng sản xuất các hợp chất sinh học có hoạt tính chống lại các dòng tế bào ung thư trong nuôi cấy tế bào huyền phù cây Bách bệnh. Kết quả cho thấy cả 3 elicitor này đều làm tăng hoạt tính gây độc đối với dòng tế bào ung thư ở người, HTC116, tương tự như dịch chiết từ rễ của cây trưởng thành, mà không ảnh hưởng đến sự sinh trưởng của tế bào cây Bách bệnh [82].

Trên cơ sở sự tích lũy sinh khối tươi, sinh khối khô, hàm lượng gypenoside tổng số cũng như Rb1, thời điểm thu nhận tế bào, vừa đảm bảo thu được sinh khối lớn vừa thu được hàm lượng các hợp chất cao là 18 ngày.

3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù

3.1.2.1. Ảnh hưởng của phối hợp các chất điều hòa sinh trưởng

Về sinh khối, có 2 môi trường cho sinh khối cao nhất sau 18 ngày nuôi cấy, đó là môi trường MS bổ sung 2,5 mg/L BAP kết hợp với 0,5 mg/L IBA (sinh khối tươi đạt 3,501 g/bình) và môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA (sinh khối tươi đạt 3,693 g/bình). Các môi trường còn lại đều cho hiệu quả thấp hơn (Bảng 3.2).

Đối với quá trình tích lũy gypenoside, các môi trường chứa KIN và IBA có hiệu quả tích lũy cao hơn các môi trường chứa BAP và IBA, trong đó nồng độ

KIN từ 1,5 - 2 mg/L cho hiệu quả cao nhất (40 - 41 mg gypenoside/g khô), hàm lượng Rb1 cao nhất thu được ở môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA (0,041 mg/g khô).

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP hoặc KIN kết hợp với 0,5 mg/L IBA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
1	-	3,203 ^b	0,149 ^{ab}	26,360 ^d	0,025 ^d
1,5	-	2,822 ^c	0,120 ^c	34,601 ^b	0,043 ^b
2	-	2,997 ^{bc}	0,138 ^b	34,932 ^b	0,049 ^a
2,5	-	3,501 ^a	0,161 ^a	35,850 ^b	0,048 ^a
3	-	2,732 ^c	0,113	25,053 ^d	0,019 ^e
-	1	2,573 ^{cd}	0,121 ^c	23,287 ^d	0,025 ^d
-	1,5	2,860 ^c	0,118 ^c	40,900 ^a	0,034 ^c
-	2	3,693 ^a	0,157 ^a	40,240 ^a	0,041 ^b
-	2,5	3,274 ^b	0,144 ^{ab}	31,733 ^c	0,032 ^c
-	3	2,369 ^d	0,095 ^d	24,190 ^d	0,013 ^f

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: loại chất điều hòa sinh trưởng; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

Như vậy, sau khi thăm dò các điều kiện nuôi cấy, chúng tôi nhận thấy môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA phù hợp nhất cho nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam, đây cũng chính là môi trường tốt nhất khi nuôi cấy callus.

3.1.2.2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy sucrose vẫn là nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng (khoảng 3,641 g tươi/bình) và tích lũy gypenoside của tế bào (xấp xỉ 39,845 mg gypenoside/g khô), tiếp theo là glucose. Nguồn carbon được bổ sung vào môi trường nuôi cấy *in vitro* với vai trò vừa là nguồn năng lượng, vừa là chất điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào [20]. Ngoài ra, chúng cũng có thể là phân tử tín hiệu và đóng vai trò tương tự chất điều hòa sinh trưởng (ĐHST) thực vật, giúp điều chỉnh quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và phát triển của tế bào bằng sự kích thích biểu hiện hoặc ức chế các gene mã hoá enzyme [70].

Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nguồn Carbon	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
Sucrose	3,641 ^a	0,157 ^a	39,845 ^a	0,037 ^a
Glucose	3,247 ^b	0,106 ^b	22,349 ^d	0,031 ^b
Fructose	2,383 ^c	0,095 ^b	27,862 ^c	0,030 ^b
Galactose	2,795 ^c	0,114 ^b	15,033 ^e	0,034 ^b
Lactose	2,311 ^c	0,091 ^b	31,397 ^b	0,034 ^b
Glycerol	2,471 ^c	0,094 ^b	29,905 ^{bc}	0,031 ^b

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: nguồn carbon; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

Mặc dù sucrose và glucose được sử dụng phổ biến trong nuôi cấy tế bào thực vật. Tuy nhiên, mỗi loài lại thích hợp với một nguồn carbon khác nhau cần

cho quá trình hình thành các sản phẩm trao đổi chất của chúng. Trong nuôi cấy tế bào thực vật, nhiều loại đường đơn cũng đã được sử dụng như glucose, fructose, sorbitol, galactose...[111]. Do đó, việc khảo sát nguồn cung cấp carbon và nồng độ thích hợp là cần thiết.

Sucrose được xem là nguồn carbon thích hợp nhất cho sinh trưởng của tế bào thực vật, nồng độ thường dùng là từ 20 - 70 g/L. Sucrose vừa cung cấp năng lượng vừa là một thành phần trong sinh tổng hợp các chất thứ cấp. Tốc độ tăng trưởng sinh khối thực vật luôn liên quan trực tiếp tới sự tiêu thụ sucrose. Vai trò của sucrose trong việc tăng tích lũy sinh khối khô tế bào có thể do ảnh hưởng của nó lên tubulin, một protein chịu trách nhiệm trong sinh trưởng và phát triển của tế bào. Trên môi trường mà tất cả các nguồn dinh dưỡng ở mức dư thừa, sự gia tăng nồng độ sucrose sẽ dẫn đến tăng sinh khối khô. Một số nghiên cứu như nuôi cấy tế bào cây Cà đại hoa tím, Cà đại hoa trắng hay Bồ cốt chỉ... tế bào tăng sinh khối khô cùng với việc tăng nồng độ sucrose. Tuy nhiên, khi nồng độ sucrose quá cao sẽ dẫn đến áp suất thẩm thấu vượt giới hạn cho phép của tế bào, vì thế ảnh hưởng xấu lên sinh trưởng của chúng [3].

Trên một số đối tượng khác, nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng và tích lũy hợp chất thứ cấp không phải là sucrose mà là các loại đường khác. Chẳng hạn, fructose 5% giúp tăng sinh trưởng của tế bào cây Nhàu. Trong nuôi cấy tế bào cây ngô, fructose được vận chuyển nhanh nhất, tiếp đến là glucose và sau cùng là sucrose. Một số nghiên cứu khác cũng thu được kết quả tương tự như khi nuôi cấy tế bào của cây Cà độc dược lá bạc, Sung tầm gửi và dây Thần thông [131].

3.1.3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù

Trong quá trình nuôi cấy, các điều kiện nuôi cấy thường được tối ưu cho sự sinh trưởng và sản xuất hợp chất thứ cấp của tế bào. Các điều kiện nuôi cấy như nhiệt độ, độ ẩm, cường độ chiếu sáng, mật độ nuôi cấy, tốc độ khuấy,... cũng đều ảnh hưởng [33].

3.1.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ mẫu ban đầu

Tế bào với các tỷ lệ mẫu ban đầu khác nhau (4 - 8%, tương đương 2 - 4 g tế bào/bình) được nuôi cấy trên môi trường lỏng có thành phần tối ưu. Sự sinh trưởng của tế bào huyền phù sau 18 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.4.

Với lượng mẫu nuôi cấy ban đầu là 3 g, quá trình nuôi cấy cho hiệu quả cao nhất, khả năng sinh trưởng của tế bào tốt (khối lượng tươi đạt xấp xỉ 5,392 g/bình) và tích lũy gypenoside cao (khoảng 46,498 mg/g khô). Với cỡ mẫu là 2 g, tuy có chỉ số sinh trưởng cao nhưng chất lượng dịch huyền phù tế bào có chất lượng không cao, tế bào bị kết khối và ít đồng nhất so với khi sử dụng 3 g tế bào (dịch huyền phù tế bào có màu vàng đậm, tươi và đồng nhất). Khi nuôi cấy ban đầu với 4 g callus, tế bào cũng đạt sinh khối tương đương với khi nuôi cấy 3 g, tuy nhiên sự tích lũy gypenoside thấp hơn nhiều (khoảng 34,520 mg/g khô). Đánh giá hàm lượng Rb1, chúng tôi nhận thấy nuôi cấy 2 g callus cho kết quả cao nhất, tiếp đến là 3 g và 4 g.

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Lượng mẫu nuôi cấy (g)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
2	3,661 ^b	0,082 ^b	42,876 ^b	0,049 ^a
3	5,392 ^a	0,128 ^a	46,498 ^a	0,038 ^b
4	5,430 ^a	0,130 ^a	34,520 ^c	0,021 ^c

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: lượng mẫu nuôi cấy; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

Nhìn chung, việc xác định cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu là rất cần thiết cho quá trình sinh trưởng của tế bào trong nuôi cấy huyền phù. Khi mật độ tế bào trong bình nuôi cấy quá cao hoặc quá thấp đều làm cho sinh trưởng của tế bào kém đi

[117]. Ảnh hưởng của cỡ mẫu nuôi cấy ban đầu lên sinh trưởng của tế bào nuôi cấy huyền phù đã được khảo sát trên nhiều loài thực vật khác nhau. Gou và Zhang (2005) khi nghiên cứu nuôi cấy huyền phù tế bào cây Gừng nhận thấy, nếu lượng mẫu ban đầu thấp hơn 0,5% (w/v) tế bào sinh trưởng chậm, trong khi với lượng mẫu cao hơn 2,0% (w/v) tế bào sẽ sinh trưởng nhanh [56].

Như vậy, tùy vào mục đích nghiên cứu mà có thể chọn 2 g hay 3 g để bắt đầu quá trình nuôi cấy. Trong nghiên cứu này, chúng tôi lựa chọn công thức cho hàm lượng gypenoside cao nhất. Vì vậy cỡ mẫu nuôi cấy là 3 g được sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo và thu hoạch sinh khối sau 18 ngày nuôi cấy để khảo sát ảnh hưởng các điều kiện nuôi cấy khác lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào *Giảo cổ lam*.

Thông thường, cỡ mẫu nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự sản xuất sinh khối cũng như tích lũy hợp chất thứ cấp [54]. Trong nghiên cứu này, cỡ mẫu tối ưu cho sinh trưởng của tế bào cũng như tích lũy gypenoside là 3 g callus trên 50 mL môi trường (tương đương 6% w/v), kết quả này tương đương với nuôi cấy tế bào rau má để sản xuất madecassoside [104] hay sản xuất eucorymanone từ nuôi cấy tế bào cây Bách bệnh [123]. Ở một số nghiên cứu khác, cỡ mẫu tối ưu thường thấp hơn, ví dụ sản xuất flavonoid ở tế bào cây Bàng cảm thạch là 2% [58], anthocyanin ở cây Nho là 3,2% [128].

3.1.3.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Tốc độ lắc là một trong những thông số quan trọng của quá trình nuôi cấy huyền phù tế bào, liên quan đến quá trình trao đổi chất của tế bào. Thông thường, tốc độ lắc 120 vòng/phút cho hiệu quả tốt nhất đối với đa số các trường hợp. Ví dụ, sinh tổng hợp eurycomanone trong tế bào cây Bách bệnh [123] hay flavonoid trong tế bào cây Bàng cảm thạch [58].

Ở thí nghiệm này, các tốc độ lắc khác nhau (100 - 150 vòng/phút) được sử dụng trong quá trình nuôi cấy, kết quả sinh trưởng của tế bào sau 18 ngày nuôi cấy được trình bày ở bảng 3.5. Trong thí nghiệm của chúng tôi, tốc độ lắc 120

vòng/phút vẫn cho kết quả tốt nhất, các tốc độ lắc cao hơn hay thấp hơn đều không cho kết quả tốt bằng.

Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Tốc độ lắc (vòng/phút)	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Rb1 (mg/g khô)	Gypenoside (mg/g khô)
100	3,462 ^c	0,066 ^b	-	13,542 ^c
120	5,430 ^a	0,131 ^a	0,039 ^a	46,870 ^a
150	4,521 ^b	0,049 ^b	0,022 ^b	38,041 ^b

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: tốc độ lắc; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$).

Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

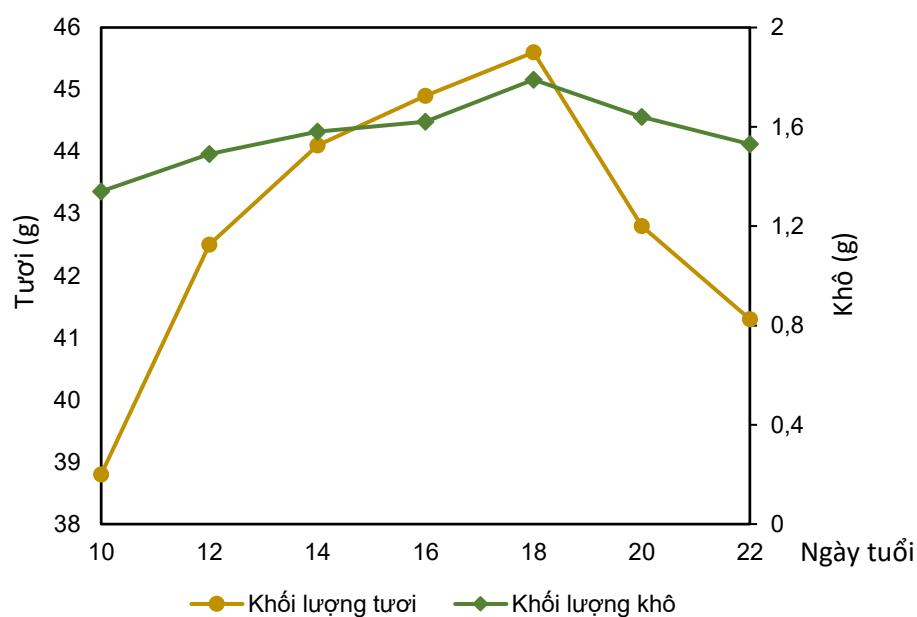
3.1.4. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor 12 L

Sau 7 ngày nuôi cấy, sinh khối tế bào Giảo cổ lam chưa tăng trưởng nhiều, khối lượng tươi thu được là khoảng 3,1 g.

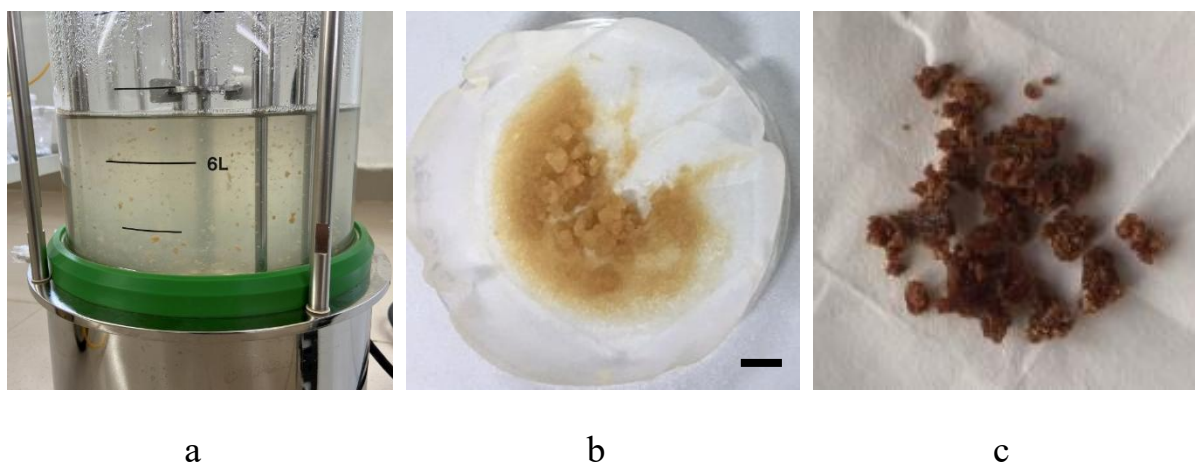
Dịch huyền phù tế bào nuôi cấy trong các bình tam giác được bổ sung vào bioreactor 12 L với tỉ lệ mẫu ban đầu là 10% (v/v), tốc độ khuấy là 150 vòng/phút. Sau 10 ngày nuôi cấy, thu nhận 10 mL dịch huyền phù thông qua van thu mẫu trên bioreactor 12 L. Sinh khối tươi, sinh khối khô trong quá trình nuôi cấy được thể hiện ở hình 3.4 và 3.5.

Trong 10 ngày đầu của quá trình nuôi cấy, sinh khối tươi của tế bào tăng chậm, chỉ đạt 38,860 g trong khi khối lượng đầu vào khoảng 37,221 g. Sau quá trình thích nghi ban đầu, sinh khối tế bào tăng nhanh trong những ngày tiếp theo, từ 38,860 - 45,611 g tương ứng với 1,341 - 1,792 g sinh khối khô; trong đó sinh khối đạt đỉnh ở ngày thứ 18. Trong giai đoạn này sinh khối có màu vàng đậm, kết thành nhiều khối nhỏ. Sau giai đoạn này tế bào bắt đầu chuyển sang giai đoạn chết

do dinh dưỡng trong bình nuôi cấy bắt đầu cạn; sinh khối tươi và khô của tế bào huyền phù giảm dần theo thời gian (từ 45,611 g tươi giảm xuống 41,370 g sau 4 ngày). Tế bào chuyển màu đậm hơn. Sau 22 ngày nuôi cấy, chúng tôi tiến hành dừng và thu sinh khối. Các mẫu sinh khối khô thu từng giai đoạn được sử dụng để phân tích hàm lượng gypenoside tích lũy.



Hình 3.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù nuôi cấy trong bioreactor 12 L.



Hình 3.4. Nuôi cấy tế bào huyền phù Giảo cổ lam trong bioreactor 12 L

a. Bình bioreactor 12 L. b. Sinh khối tươi sau khi thu từ bình bioreactor. c. Sấy khô sinh khối đến khối lượng không đổi.

Sinh khối khô thu được từ các ngày nuôi cấy khác nhau trong bioreactor 12 L được chiết với methanol để thu gypenoside tổng số. Kết quả phân tích bằng HPLC hàm lượng tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù được thể hiện ở bảng 3.6.

Hình ảnh và số liệu ở hình 3.3 và hình 3.4 đã thể hiện đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù *Giáo cổ lam* nuôi cấy trong bioreactor 12 L tăng trưởng nhanh bắt đầu từ ngày thứ 10 của quá trình nuôi cấy. Trong khi đó, sự tích lũy gypenoside tăng nhanh và đạt cực đại ở ngày nuôi cấy thứ 16 với hàm lượng đạt từ 26,412 - 40,090 mg/g khô. Sau đó, hàm lượng bắt đầu giảm trong các ngày nuôi cấy tiếp theo. Hàm lượng Rb1 tích lũy cũng đạt cực đại ở ngày thứ 16 (0,038 mg/g khô). Tế bào thực vật thường có sự tích lũy nhiều các hợp chất thứ cấp khi tế bào chuẩn bị bước vào pha ổn định của quá trình sinh trưởng. Trong pha sinh trưởng tế bào tập trung chất dinh dưỡng cho quá trình phân chia và nhân lên. Cuối pha sinh trưởng, tế bào tổng hợp nhiều hợp chất thứ cấp nhằm bảo vệ tế bào tránh khỏi những tác động xấu từ môi trường như sự cạn kiệt nguồn dinh dưỡng, sự tích lũy nhiều hơn các chất độc của quá trình trao đổi chất... [4].

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù trong bioreactor 12 L

Thời gian nuôi cấy (ngày)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
10	26,412	0,013
12	31,524	0,017
14	34,483	0,022
16	40,090	0,038
18	38,121	0,032
20	32,675	0,030
22	28,736	0,026

Ghi chú: Số liệu ở bảng 3.6 là kết quả của thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của

thời gian nuôi cấy đến hàm lượng gypenoside và Rb1 trong bioreactor 12 L, được thực hiện dưới dạng một mẻ vận hành thăm dò, chỉ được tiến hành một lần do hạn chế về nguồn lực nên không đủ điều kiện để ANOVA/phân hạng.

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR TRONG TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG SẢN XUẤT GYPENOSIDE TỪ NUÔI CẤY HUYỀN PHÙ

Xử lý YE 0,5 g/L và AgNO₃ 30 mg/L ở các thời điểm khác nhau đều làm tăng biểu hiện của các gene trong chu trình phenylpropanoid và sự tích lũy của rosmarinic acid trong nuôi cấy tế bào cây Hoắc hương núi [124], [48]. Mức độ biểu hiện của các gene tham gia vào con đường tổng hợp phytosterol và triterpene trong tế bào cây Rau má cũng tăng lên đáng kể sau khi được xử lý bằng SA [103].

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside trong tế bào

Kết quả trình bày ở bảng 3.7 cho thấy tất cả các nồng độ MeJA đều ức chế sự sinh trưởng của tế bào, sinh khối khô dao động từ 0,063 đến 0,118 g/bình (đối chứng 0,190 g/bình). So với đối chứng, hàm lượng gypenoside tăng lên khi bổ sung 25 - 100 μ M MeJA, cao nhất khi bổ sung 50 μ M (58,116 mg/g chất khô). Tương tự như khi xử lý MeJA, tế bào được xử lý SA có sự tích lũy sinh khối giảm, hàm lượng gypenoside thu được cao nhất khi xử lý 100 μ M SA (76,809 mg/g chất khô), cao gấp khoảng 1,52 lần so với đối chứng không xử lý elicitor.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của MeJA và SA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nồng độ (mM)	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	-	5,732 ^a	0,190 ^a	50,545 ^d	0,048 ^{cde}
25	MeJA	5,043 ^{bcd}	0,165 ^{bc}	54,546 ^{cd}	0,052 ^{bcd}

50	SA	5,763 ^a	0,204 ^a	58,475 ^{bc}	0,060 ^{bc}
	MeJA	5,003 ^{bcd}	0,163 ^{bc}	58,116 ^{bcd}	0,053 ^{bcd}
100	SA	5,456 ^{ab}	0,163 ^{bc}	63,980 ^b	0,062 ^b
	MeJA	4,876 ^{bcde}	0,094 ^{de}	53,617 ^{cd}	0,041 ^{de}
150	SA	5,187 ^{abc}	0,141 ^c	76,809 ^a	0,075 ^a
	MeJA	4,854 ^{bcde}	0,088 ^{de}	32,552 ^e	0,037 ^f
200	SA	4,659 ^{cde}	0,107 ^d	32,100 ^e	0,061 ^b
	MeJA	4,472 ^{de}	0,063 ^e	29,514 ^e	0,037 ^f
	SA	4,331 ^e	0,026 ^f	9,724 ^f	0,056 ^{bc}

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA hai nhân tố: nồng độ và loại elicitor; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy YE là elicitor tốt nhất khi bổ sung vào thời điểm nuôi cấy ban đầu. Trong quá trình xử lý YE, sự tích lũy sinh khối tế bào không có sự thay đổi giữa các công thức thí nghiệm. Hàm lượng gypenoside tích lũy cao nhất khi 3 g/L YE được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (khoảng 73,767 mg/g chất khô), cao gấp khoảng 1,46 lần so với đối chứng không xử lý elicitor.

Ngược với YE, khi xử lý bằng Fox, cả sinh khối tế bào và gypenoside đều giảm so với đối chứng, xử lý Fox nồng độ càng cao sinh khối tế bào càng giảm. Hàm lượng gypenoside thu được chỉ dao động trong khoảng 23,066 - 36,790 mg/g chất khô (Bảng 3.8).

Thông thường, bổ sung các elicitor vào môi trường nuôi cấy đều ức chế khả năng sinh trưởng của tế bào, kết quả này được công bố trên nhiều công trình

ngiên cứu trước đây. Chẳng hạn, các elicitor như MeJA, Ag⁺, chitosan và dịch chiết từ nấm (polysaccharide) ở các nồng độ khác nhau đều ức chế sinh trưởng của tế bào cây Thông đỏ [171]. Kết quả nghiên cứu của Frankfater và cộng sự (2009) về ảnh hưởng của MeJA và SA trong nuôi cấy rễ tơ cây Bông hải đảo cũng cho thấy MeJA có tác dụng ức chế quá trình sinh trưởng của tế bào [49]. Trong quá trình nuôi cấy tế bào thực vật, bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy sẽ dẫn đến việc ngừng sinh trưởng tạm thời hay vĩnh viễn của tế bào, điều này cũng có thể dẫn đến các phản ứng phòng vệ bằng cách chuyển từ trạng thái chuyển hóa sơ cấp sang sản xuất chất chuyển hóa thứ cấp [90]. Ngoài ra, khi xử lý elicitor ở nồng độ cao hơn nồng độ tối ưu thường dẫn đến hiện tượng đáp ứng quá mức, gây chết tế bào [19].

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của YE và Fox lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nồng độ (g/L)	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	-	5,433 ^a	0,171 ^{abc}	50,478 ^{de}	0,052 ^b
1	YE	5,499 ^a	0,170 ^{abc}	54,974 ^d	0,061 ^a
	Fox	4,597 ^{bc}	0,181 ^a	36,790 ^f	0,049 ^{bc}
2	YE	5,411 ^a	0,131 ^{de}	67,135 ^b	0,063 ^a
	Fox	4,885 ^{ab}	0,174 ^{ab}	34,924 ^f	0,050 ^{bc}
3	YE	5,410 ^a	0,137 ^{de}	73,767 ^a	0,066 ^a
	Fox	4,521 ^{bc}	0,170 ^{abc}	31,115 ^{fg}	0,043 ^{cd}
4	YE	5,424 ^a	0,123 ^{ef}	60,915 ^c	0,063 ^a
	Fox	4,076 ^{cd}	0,165 ^{abcd}	27,411 ^{gh}	0,040 ^d
5	YE	5,387 ^a	0,105 ^f	46,338 ^e	0,062 ^a
	Fox	3,931 ^d	0,142 ^{bcde}	23,066 ^h	0,039 ^d

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA hai nhân tố: nồng độ và loại elicitor; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào

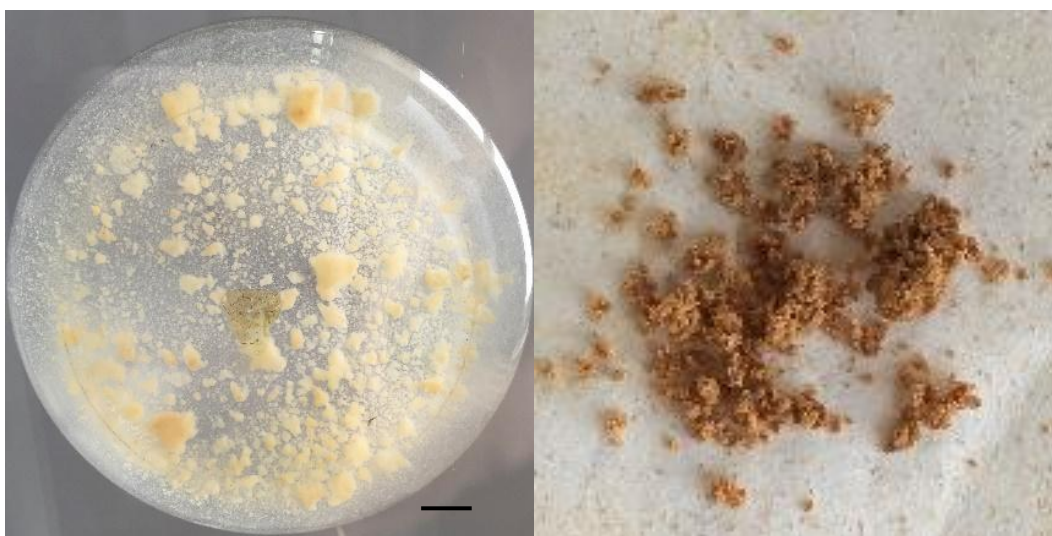
Trong thí nghiệm tối ưu hóa thời điểm cảm ứng, các giá trị được so sánh theo baseline nội tại (ngày 0) của từng elicitor. Kết quả cho thấy MeJA đạt hiệu quả cảm ứng cao nhất khi bổ sung ở ngày thứ 9 với hàm lượng gypenoside 73,901 mg/g khô. SA tạo đáp ứng mạnh nhất khi xử lý ở ngày thứ 6, đạt 79,721 mg/g khô. Đáng chú ý, YE lại thể hiện mô hình phản ứng khác với các elicitor phi sinh học: hàm lượng gypenoside cao nhất xuất hiện khi bổ sung ngay từ ngày đầu nuôi cấy, phản ánh đặc tính cảm ứng sớm và mạnh của YE (Hình 3.5).

Bảng 3.9. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào

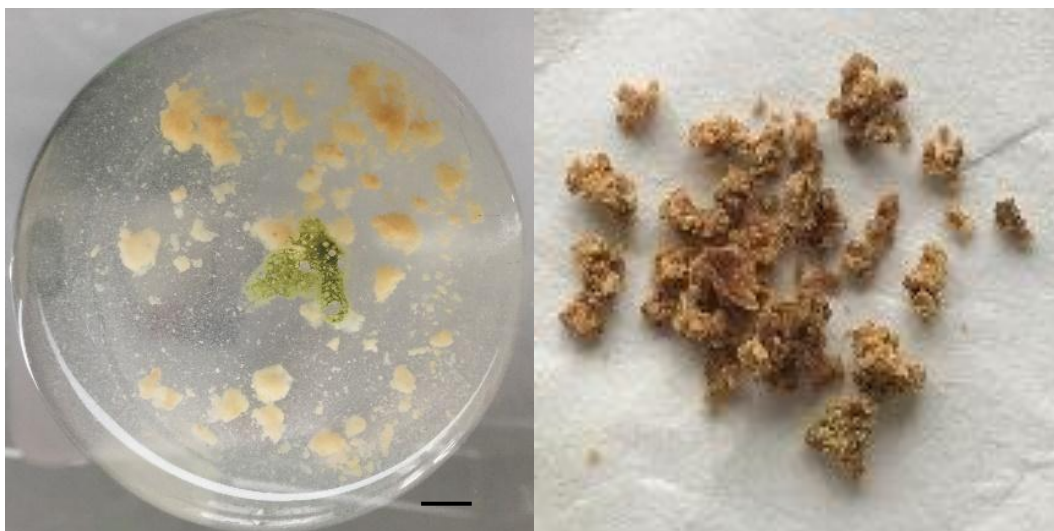
Ngày xử lý	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	MeJA	4,968 ^{cde}	0,207 ^{fg}	57,852 ^{hi}	0,052 ^g
	SA	4,908 ^{cde}	0,148 ^l	76,480 ^{ab}	0,075 ^c
	YE	4,855 ^e	0,186 ⁱ	74,579 ^{bc}	0,061 ^f
3	MeJA	5,110 ^{bcde}	0,212 ^{ef}	65,633 ^{ef}	0,055 ^{ghi}
	SA	4,906 ^{de}	0,149 ^l	76,661 ^{ab}	0,088 ^b
	YE	4,980 ^{cde}	0,192 ^h	61,202 ^{gh}	0,056 ^{gh}
6	MeJA	5,168 ^{bcde}	0,216 ^{de}	73,461 ^{bc}	0,055 ^{ghi}

	SA	4,907 ^{bde}	0,157 ^k	79,721 ^a	0,093 ^a
	YE	5,041 ^{bde}	0,204 ^g	57,543 ^{hi}	0,035 ^k
	MeJA	5,302 ^{bc}	0,244 ^b	73,901 ^{bc}	0,066 ^{de}
9	SA	5,025 ^{cde}	0,178 ^j	73,558 ^{bc}	0,063 ^{ef}
	YE	5,137 ^{bde}	0,209 ^f	54,163 ^{ij}	0,031 ^{ij}
	MeJA	5,254 ^{bcd}	0,229 ^c	68,622 ^{de}	0,067 ^d
12	SA	5,259 ^{bcd}	0,211 ^f	70,547 ^{cd}	0,059 ^{fg}
	YE	5,424 ^b	0,221 ^d	51,321 ^j	0,027 ^{jk}
	MeJA	5,018 ^{cde}	0,191 ^{hi}	60,814 ^{gh}	0,045 ^j
15	SA	5,327 ^{bc}	0,221 ^d	62,628 ^{fg}	0,054 ^{ghi}
	YE	6,048 ^a	0,252 ^a	49,989 ^j	0,024 ^k

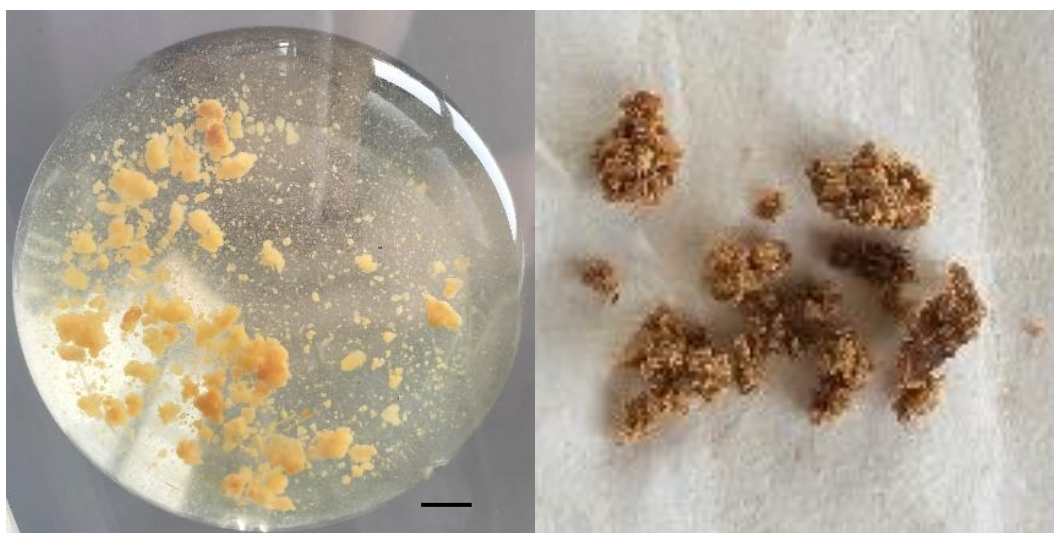
Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA hai nhân tố: ngày xử lý và loại elicitor; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).



a



b



c

Hình 3.5. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung elicitor

- a. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 50 μM MeJA vào ngày thứ 9
- b. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 100 μM SA vào ngày thứ 6
- c. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 3 g/L YE vào ngày đầu tiên

Kết quả ở Bảng 3.9 cho thấy thời điểm bổ sung elicitor có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù *Glanocystis*, và hiệu quả này phụ thuộc chặt chẽ vào bản chất của từng elicitor. Trong số các elicitor khảo sát, SA cho hiệu quả cảm ứng mạnh nhất khi được bổ sung vào ngày thứ 6, với hàm lượng gypenoside đạt 79,721 mg/g khô, trong khi MeJA đạt giá trị cao nhất khi bổ sung muộn hơn (ngày thứ 9). Ngược lại, YE thể hiện xu hướng cảm

ứng sớm, với hàm lượng gypenoside cao nhất khi bổ sung ngay từ đầu quá trình nuôi cấy, sau đó giảm dần khi bổ sung ở các thời điểm muộn hơn.

Sự khác biệt này có thể liên quan đến cơ chế cảm ứng đặc trưng của từng loại elicitor. SA và MeJA là các elicitor hóa học tham gia trực tiếp vào mạng lưới tín hiệu phòng vệ của tế bào thực vật, trong đó SA thường liên quan đến đáp ứng kháng sinh học, còn MeJA gắn với con đường stress và điều hòa sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Việc bổ sung các elicitor này ở thời điểm tế bào đã bước vào pha sinh trưởng mạnh giúp tối ưu hóa khả năng chuyển dòng carbon từ sinh trưởng sang sinh tổng hợp gypenoside. Ngược lại, YE là elicitor sinh học phức hợp, có thể kích hoạt nhanh đáp ứng phòng vệ ngay từ giai đoạn sớm, dẫn đến hiệu quả cảm ứng cao khi bổ sung sớm nhưng không duy trì được ở các thời điểm muộn.

Xu hướng này phù hợp với các báo cáo trước đây trên nhiều hệ thống nuôi cấy tế bào thực vật, trong đó hiệu quả cảm ứng của elicitor phụ thuộc chặt chẽ vào đối tượng nghiên cứu, loại hợp chất thứ cấp và thời điểm xử lý. Trên nhân sâm, xử lý NaCl ở nồng độ thấp làm tăng tích lũy saponin và năng suất rễ, trong khi xử lý ở nồng độ cao gây ức chế sinh trưởng. Trên Đan sâm, SA ở nồng độ và thời gian xử lý thích hợp làm tăng tích lũy salvianolic acid B và caffeic acid, nhưng hiệu quả giảm rõ rệt khi xử lý kéo dài hoặc ở nồng độ cao. Tương tự, trong nuôi cấy huyền phù Dây thìa canh và Sâm Ấn Độ, MeJA và SA chỉ phát huy hiệu quả tối ưu trong một khoảng nồng độ và thời điểm xử lý nhất định [116], [43].

Như vậy, kết quả của luận án một lần nữa khẳng định rằng không tồn tại một thời điểm bổ sung elicitor tối ưu chung cho mọi hệ thống nuôi cấy, mà cần được xác định riêng cho từng đối tượng và từng loại elicitor. Các kết quả thu được trong nghiên cứu này đã làm rõ đặc điểm đáp ứng của tế bào huyền phù Giảo cổ lam đối với MeJA, SA và YE, đồng thời cung cấp cơ sở khoa học quan trọng cho việc tối ưu hóa chiến lược cảm ứng nhằm nâng cao tích lũy gypenoside trong hệ thống nuôi cấy tế bào.

3.2.3. Ảnh hưởng của sự phối hợp nhiều elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào

Bên cạnh việc sử dụng riêng lẻ các loại elicitor sinh học và phi sinh học, rất nhiều công trình nghiên cứu đã sử dụng kết hợp các elicitor để mang lại hiệu quả cao hơn. Để nghiên cứu khả năng phối hợp các elicitor lên khả năng sinh trưởng và tổng hợp saponin của tế bào, chúng tôi chọn các nồng độ tốt nhất của từng chất để kết hợp với nhau, bao gồm MeJA (50 μ M), SA (100 μ M) và YE (3 g/L), kết quả được trình bày ở bảng 3.10.

Nhìn chung, xử lý kết hợp các elicitor ở nghiên cứu này đều có tác dụng tăng tích lũy gypenoside trong tế bào so với đối chứng. Công thức kết hợp tốt nhất (kết hợp cả 3 chất) cho lượng gypenoside đạt 103,810 mg/g khô, cao hơn khoảng 2,22 lần so với tế bào không được xử lý elicitor và khoảng 2,78 lần so với mẫu tự nhiên. Các công thức kết hợp 2 elicitor giữa SA và MeJA hoặc phối hợp giữa YE và MeJA đều cho kết quả tương đương hoặc tốt hơn sử dụng từng chất riêng lẻ nhưng không cao bằng phối hợp cả 3 chất. Lượng gypenoside đạt cao nhất ở công thức phối hợp giữa SA và YE hoặc phối hợp đồng thời 3 elicitor là MeJA, YE và SA.

Bảng 3.10. Ảnh hưởng của phối hợp các elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside

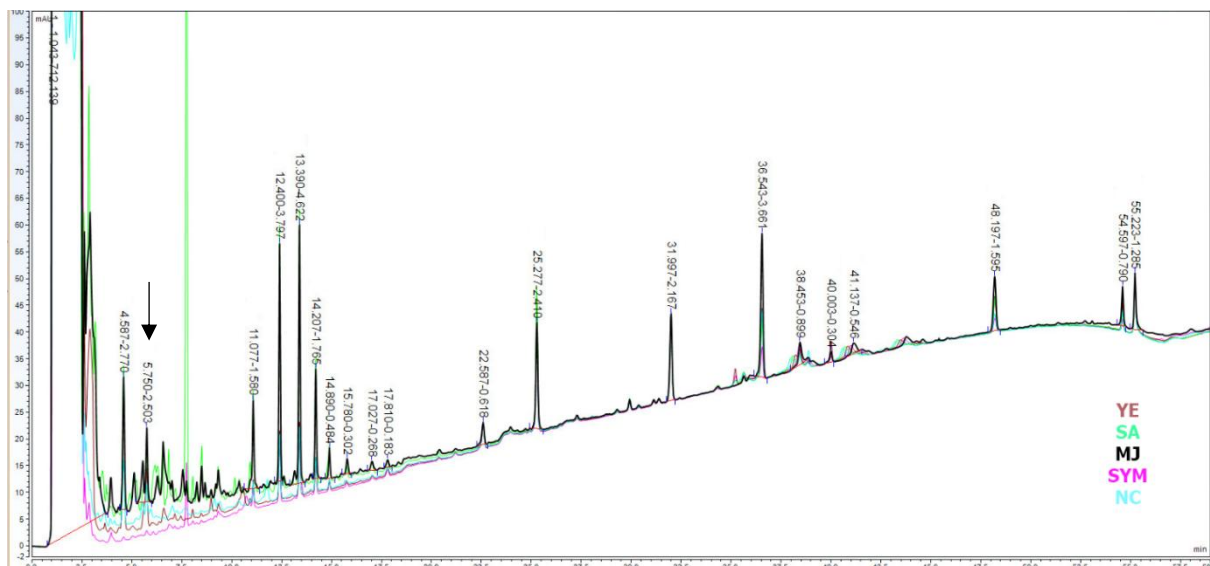
Elicitor	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
MeJA	4,958 ^a	0,172 ^a	73,114 ^b	0,055 ^c
SA	3,887 ^b	0,122 ^{bc}	79,830 ^b	0,087 ^b
YE	4,031 ^b	0,152 ^b	73,767 ^b	0,067 ^{bc}
MeJA + SA	3,475 ^c	0,106 ^c	79,487 ^b	0,075 ^b

MeJA + YE	4,623 ^a	0,197 ^a	77,554 ^b	0,079 ^b
SA + YE	4,275 ^{ab}	0,105 ^c	98,044 ^a	0,108 ^a
MeJA + SA + YE	4,633 ^a	0,187 ^a	103,810 ^a	0,127 ^a

Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: loại elicitor; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

Kết quả phân tích HPLC chồng phổ các mẫu thu được cho thấy khi xử lý SA (màu xanh lá), một số peak có đỉnh tăng cao, trong khi các peak còn lại tương đương so với các công thức xử lý khác (Hình 3.6). Kết quả phân tích cũng cho thấy có 24 peak ghi nhận rõ ở các mẫu, trong đó xử lý MeJA thu được số peak nhiều nhất (21/24). Một số peak không ghi nhận ở đối chứng như các peak có thời gian lưu 7,73; 8,49; 15,78; 17,03; 17,81; 38,45 hay 40 phút, đây là các chất không xuất hiện hoặc xuất hiện dưới ngưỡng phát hiện, và được tăng cường tổng hợp trong các công thức có xử lý elicitor (Bảng 3.11).

Thông thường, khi bổ sung elicitor vào môi trường, đầu tiên sẽ tăng cường khả năng sinh trưởng của tế bào, sau đó kích hoạt các hàng rào bảo vệ bằng cách chuyển từ tổng hợp các hợp chất sơ cấp sang sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp [129]. Các hợp chất thứ cấp có thành phần hóa học phức tạp và được sản xuất để đáp ứng với các dạng stress khác nhau để thực hiện các nhiệm vụ sinh lý khác nhau ở thực vật [34]. Các stress được tạo ra bởi các loại elicitor khác nhau có thể dẫn đến sự tích lũy gypenoside trong tế bào cây Giảo cổ lam.



Thời gian (phút)

Hình 3.6. Phổ HPLC tế bào huyền phù Giảo cổ lam. Mũi tên thể hiện peak Rb1.

Bảng 3.11. Thành phần hợp chất có trong cao chiết methanol từ tế bào huyền phù Giảo cổ lam dựa trên phân tích HPLC.

Số peak	Thời gian lưu (phút)	Diện tích peak (%)				
		YE	SA	MeJa	SYM	Đối chứng
1	1,04	96,42	94,18	95,63	95,49	94,80
2	4,59	0,55	0,41	0,37	-	0,50
3	5,75	0,32	-	0,34	-	0,50
4	7,73	-	2,01	-	0,34	-
5	8,49	-	0,11	-	-	-
6	11,08	-	0,32	0,21	-	0,10
7	11,80	-	-	-	-	0,20
8	12,40	0,23	0,63	0,51	0,40	0,40
9	13,39	0,23	0,61	0,62	0,49	0,40

10	14,21	0,11	0,28	0,24	0,20	0,20
11	14,89	-	0,09	0,06	0,07	0,10
12	15,78	-	-	0,04	-	-
13	17,03	-	-	0,04	-	-
14	17,81	-	-	0,02	-	-
15	22,59	0,13	0,08	0,08	0,21	0,20
16	25,28	0,60	0,44	0,32	0,77	0,80
17	32,00	0,43	0,29	0,29	0,78	0,80
18	36,54	0,34	0,19	0,49	0,28	0,60
19	38,45	-	-	0,12	0,31	-
20	40,00	0,09	-	0,04	-	-
21	41,14	-	-	0,07	-	-
22	48,20	0,18	0,13	0,21	0,14	0,20
23	54,60	0,11	0,05	0,11	0,08	0,10
24	55,22	0,25	0,18	0,17	0,44	0,40

Hiện nay, sản xuất hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật có sử dụng elicitor vẫn đang được nhiều nhóm tác giả nghiên cứu và công bố, trong đó tập trung vào sản xuất các hợp chất dược liệu. Saks và cộng sự (2021) khi nuôi cấy tế bào huyền phù cây Nho có bổ sung elicitor sinh học là cellulose từ nấm *Trichoderma viride* cho tích lũy lượng stilbene cao hơn nhiều so với khi xử lý với elicitor phi sinh học là jasmonate và cao hơn gấp 3 lần so với trong mẫu tự nhiên [134]. Barrales - Cureño và cộng sự (2022) đã sử dụng elicitor để nghiên cứu tăng khả năng sản xuất taxoid trong nuôi cấy huyền phù tế bào cây Thông. Nguyên liệu sử dụng trong nuôi cấy huyền phù là callus dạng mềm, bột. Quá trình nuôi cấy được bổ sung các elicitor là MeJA, ethanol, buthionine sulfoximine và hydrogen peroxide. Sinh khối tế bào cao nhất thu được ở nghiệm thức EtOH - 2 (0,12 mg/g khối lượng khô) sau 8 ngày, trong khi sinh khối ở nghiệm thức đối chứng cùng

thời điểm là 0,095 mg/g khối lượng khô. Kết hợp xử lý buthionin và hydrogen peroxide trong dịch nuôi cấy huyền phù tế bào đã làm tăng đáng kể nồng độ của 10 - deacetylbaecatin (1,662 $\mu\text{g/g}$ khối lượng khô), cephalomannine (334,32 $\mu\text{g/g}$ khối lượng khô) và sản xuất taxol (157,0 $\mu\text{g/g}$ khối lượng khô). Xử lý với các hợp chất khác như 60 μM MeJA không tích lũy taxol hay 300 μL EtOH - 2 không tích lũy 10 - deacetylbaecatin [24].

Elbouzidi và cộng sự (2025) sử dụng chitosan và SA làm elicitor để sản xuất các hợp chất phenolic và flavonoid trong cây Phong lữ thảo. Nuôi cấy mô sẹo trên môi trường rắn, nhằm mục đích tăng cường các đặc tính chống oxy hóa, kháng tyrosinase và kháng elastase. Các mô sẹo được xử lý với các nồng độ chitosan khác nhau (25, 50, 75 và 100 mg/mL) và SA (25, 50, 75 và 100 μM), và các hợp chất được phân tích bằng LC - MS/MS. Kết quả cho thấy SA và chitosan làm tăng đáng kể hàm lượng phenolic tổng số và hàm lượng flavonoid tổng số. Sự gia tăng hàm lượng phenolic lớn nhất được thấy ở các nuôi cấy được xử lý bằng 25 μM SA (SA2), ghi nhận 336,80 mg/100 g DW và ở các nuôi cấy được xử lý bằng 100 mg/mL chitosan, cho thấy 325,74 mg/100 g DW. Trong số các hợp chất phenolic riêng lẻ, kaempferol cho thấy sự gia tăng đáng kể ở nghiệm thức SA2 (192,82 mg/100 g DW) so với nghiệm thức đối chứng (103,68 mg/100 g DW) và nghiệm thức chitosan 5 (119,68 mg/100 g DW). Ngoài ra, sự tích lũy rutin đạt đỉnh ở mức 30,64 mg/100 g DW trong nghiệm thức SA2. Hoạt tính chống oxy hóa cũng được tăng cường, với nghiệm thức SA2 và chitosan 5 cho thấy sự cải thiện đáng kể so với nghiệm thức đối chứng [47].

3.2.4. Xác định mức độ biểu hiện của các gene *CYP* và *UGT* trong tế bào huyền phù

Gypenoside là thành phần hoạt tính chính của cây Giảo cổ lam, thể hiện cấu trúc đặc trưng kiểu dammaran của nhóm tetracyclic triterpen. Ở thực vật bậc cao, các triterpen saponin là những hợp chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm isoprenoid. Sapogenin và đường, acid uronic cùng các acid hữu cơ khác cấu thành

nên các thành phần chính của triterpen saponin. Sự đa dạng của triterpen saponin được tạo ra bởi quá trình oxy hóa và glycosyl hóa của cytochrome P450 và UDP-dependent glycosyltransferase, lần lượt dẫn đến sự biến đổi của các nhóm chức trên khung triterpenoid [61], [99], [136]. Tiến hành giải trình tự phiên mã của cây Giảo cổ lam cho thấy mối liên hệ tích cực giữa hàm lượng triterpen saponin và sự biểu hiện của các gene như farnesyl pyrophosphate synthase - *FPS*, squalene synthase - *SS*, squalene - 2,3 – epoxidase - *SE*, *OSC*, *CYP*, *UGT* [39].

3.2.4.1. Phân lập và dự đoán đặc điểm của gen *CYP* và *UGT*

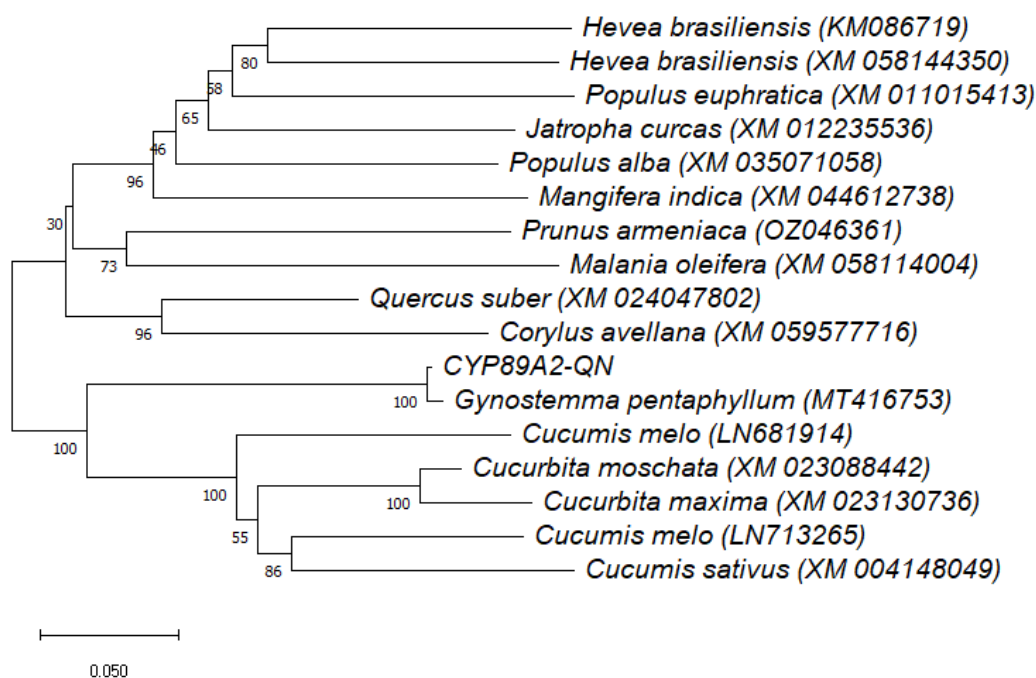
DNA tổng số của mẫu cây Giảo cổ lam được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR sau đó được điện di trên agarose gel 1%. Kết quả thăm dò với cặp mồi đặc hiệu cho 12 gene theo mô tả của Zhang và cộng sự (2021) cho thấy có 7 gene *CYP* và 5 gene *UGT* có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu.

Trong số 12 gene được khuếch đại đặc hiệu (7 gene *CYP* và 5 gene *UGT*), hai gene *CYP89A2* và *UGT91A1* được lựa chọn để nghiên cứu chuyên sâu dựa trên một số tiêu chí sinh học phân tử và bằng chứng thực nghiệm. Thứ nhất, theo phân tích chú giải chức năng và đối chiếu với các công bố gần đây, *CYP89A2* thuộc nhóm cytochrome P450 có vai trò liên quan đến quá trình oxy hóa–khử trong khung triterpenoid là bước then chốt quyết định sự hình thành cấu trúc aglycone của gypenoside. Bên cạnh đó, *UGT91A1* thuộc nhóm UDP-glycosyltransferase có khả năng xúc tác gắn đường ở vị trí đặc trưng của dammarane-type triterpenoid, là bước cuối cùng tạo thành các gypenoside hoàn chỉnh. Do đó, hai gene *CYP89A2* và *UGT91A1* được chọn làm đối tượng phân tích sâu hơn.

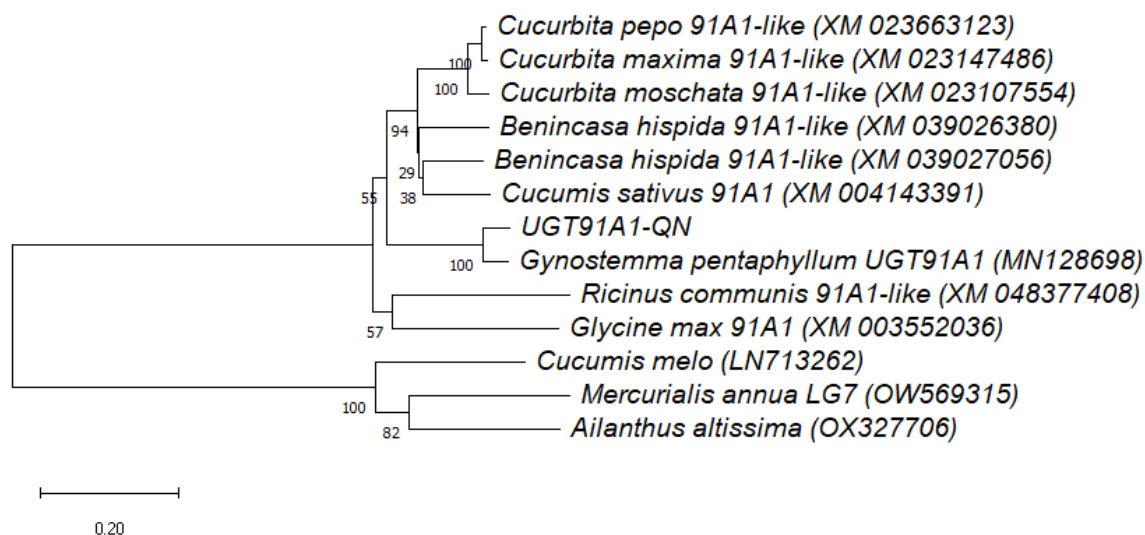
Sản phẩm PCR gene *CYP89A2* (CpQN) được sử dụng để phân tích trình tự trực tiếp, kết quả cho thấy đoạn trình tự nucleotide thu được có chiều dài 850 bp đảm bảo chất lượng để so sánh trình tự. Kết quả so sánh trên ngân hàng gene cho thấy trình tự thu được trong nghiên cứu này tương đồng 99,17% với trình tự

mRNA *CYP89A2* của cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) (mã số MT416753). Kết quả phân tích trình tự gene *UGT91A1* cho thấy có sự thay đổi rất lớn giữa gene phân lập được so với gene được sử dụng để thiết kế mồi (MN128698). Gene phân lập được dài 1.457 bp (bao gồm cả stop codon), kết quả dự đoán bằng công cụ AUGUSTUS version 3.3.3 và tham chiếu với trình tự có mã số MN128698 cho thấy gene có 1 intron và 2 exon, chiều dài đoạn mã hóa sau khi loại bỏ intron là 1.383 bp (gene sau đó được gọi là *UGT91A - QN*). Mặc dù có chiều dài tương đồng với gene được sử dụng để thiết kế mồi (MN128698), trình tự thu được của gene *UGT91A1 - QN* từ cây Giảo cổ lam Quảng Nam chỉ tương đồng 92,55% so với trình tự tham chiếu. Kết quả này có thể xuất phát từ việc 2 gene có nguồn gốc từ 2 giống khác xa nhau về mặt địa lý (Việt Nam và Trung Quốc).

Hiện nay, dữ liệu công bố về trình tự gene *CYP89A2* trên ngân hàng gene chưa nhiều, trong đó chủ yếu là ở dạng dự đoán. Kết quả xây dựng cây phả hệ dựa trên các gene đã công bố cho thấy gene *CYP89A2* từ cây Giảo cổ lam có sự tương đồng cao nhất với các cây thuộc họ Bầu bí, tuy nhiên mức độ tương đồng không quá cao (khoảng 75 - 76%). Chẳng hạn, tương đồng với Bí ngô 76,60% (XM_023130736), Dưa gang 76,21% (LN681914) hay Dưa lưới 76,21% (XM_023087977). Đối với các họ thực vật khác, sự khác biệt cao hơn, ví dụ tương đồng 71,92% so với cây Mơ tây (OZ046361) (Hình 3.7). Đối với gene *UGT91A1*, kết quả xây dựng cây phả hệ dựa trên các gene đã công bố cho thấy gene *UGT91A1 - QN* cũng có sự tương đồng cao nhất với các cây thuộc họ Bầu bí và mức độ tương đồng cũng không quá cao (khoảng 66 - 74%). Chẳng hạn, tương đồng với Bí rợ khoảng 74,53% (XM_023107554) hay Dưa lưới khoảng 73,44% (LN713262). Đối với các họ khác, sự khác biệt cao hơn, ví dụ tương đồng xấp xỉ 65,94% so với cây Lộc nài (OW569315) (Hình 3.8).



Hình 3.7. Cây di truyền dựa trên trình tự gene *CYP89A2*. Chỉ số ở mỗi nhánh thể hiện mức độ tin cậy với bootstrap 1000.



Hình 3.8. Giản đồ di truyền dựa trên các trình tự gene *UGT91A1*.

3.2.4.2. Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm hóa lý của enzyme

Đoạn gene *CYP89A2* có mức độ tương đồng cao với trình tự gene đã được công bố, do đó, chúng tôi sử dụng trình tự mRNA đã được công bố (MT416753) để dự đoán

cấu trúc và chức năng của enzyme này. Kết quả dự đoán cho thấy protein *CYP89A2* có cấu trúc tương đồng 26% với sugiol synthase của cây Đan sâm *CYP76AH3* (mã số PDB: 7 x 2q, mã số Phyre: c7 x 2qA_) với độ bao phủ 91% (460/506 amino acid) và độ tin cậy 100%.

Cấu trúc bậc hai của *CYP89A2* có 15 vị trí gập cuộn xoắn α (chiếm 45%) và 8 vị trí gập cuộn β (8%) (Hình 3.9). Ngoài ra, trong cấu trúc enzyme còn có các đoạn rối (Disordered) chiếm 7% và xoắn xuyên màng (TM helix) chiếm 8% (Bảng 3.12).

Đối với gene *UGT91A1*, kết quả dự đoán cho thấy enzyme *UGT91A1*-QN có cấu trúc tương đồng 40% với glycosyltransferase OsUGT91C1 (apo form) của cây Lúa (*Oryza sativa* subsp. *Japonica*) (mã số PDB: 7ery, mã số Phyre: c7eryA_) với độ bao phủ 98,48% (453/460 amino acid) và độ tin cậy 100%. Cấu trúc bậc hai của *UGT91A1*-QN có 16 vị trí gập cuộn xoắn α (chiếm 42%) và 15 vị trí gập cuộn phiến β (14%). Cấu trúc phiến β được trình bày bằng hình mũi tên dạng lát mỏng; cấu trúc cuộn xoắn α được trình bày bằng hình lát mỏng dạng cuộn (Hình 3.9). Ngoài ra, trong cấu trúc enzyme còn có các đoạn rối (Disordered) chiếm 15% và xoắn xuyên màng (TM helix) chiếm 11%.

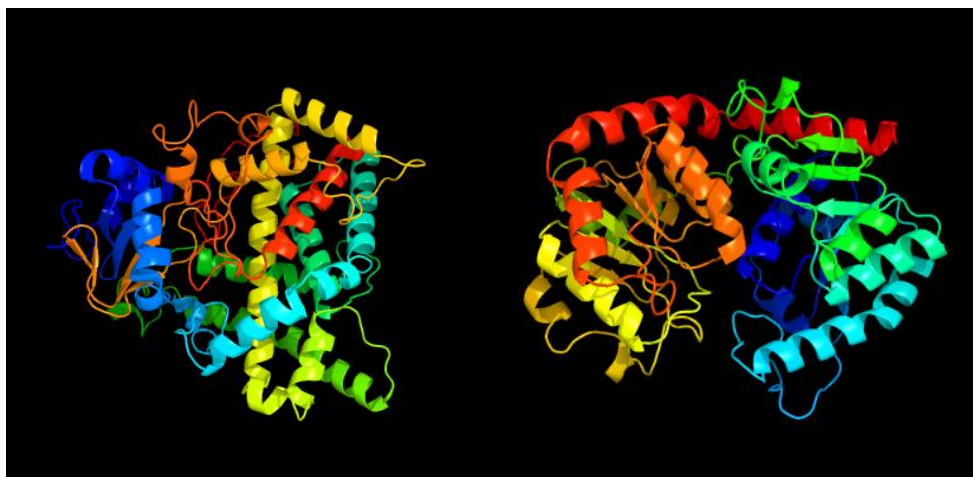
Đối với *CYP89A2*, trình tự mRNA có chiều dài 1.521 bp và mã hóa đoạn polypeptide dài 506 amino acid, enzyme có khối lượng phân tử là 58,44 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 7,06. Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của *CYP89A2* bằng công cụ Tm Predictor cho thấy enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55 - 65°C (Tm index = 0,9846). Enzyme có khả năng chịu nhiệt cao, đây là cơ sở để lựa chọn mức nhiệt độ thích hợp nhằm kiểm tra hoạt tính enzyme. Dựa vào công cụ dự đoán khả năng chịu được môi trường xúc tác kiềm/acid của AcalPred, chúng tôi nhận thấy enzyme *CYP89A2* có khả năng chịu kiềm, chỉ số xúc tác mang tính base là 0,9385 trong khi chỉ số acid là 0,0614.

Đối với *UGT91A1* - QN, gene có chiều dài 1.457 bp, khung đọc mở dài 1.383 bp và mã hóa trình tự polypeptide dài 460 amino acid, khối lượng phân tử là 52,786 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 5,66. Enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55 - 65°C (Tm index = 0,2732) và có khả năng chịu kiềm. Tuy nhiên, các chỉ số dự

đoán cho thấy enzyme có xu hướng hoạt động ở pH hơi trung tính, chỉ số xúc tác mang tính base là 0,5997 trong khi chỉ số acid là 0,4002, không quá chênh lệch nhau. Hiện nay, đặc điểm hóa lý của enzyme *UGT91A1* chưa được công bố, kết quả phân tích đặc điểm enzyme *UGT91A1* từ trình tự amino acid ở ngân hàng Gene (QLL91378) cho thấy sự khác biệt giữa enzyme đã công bố và enzyme của chúng tôi không quá lớn, cho dù sự khác biệt trong chuỗi polypeptide lên tới 12%. Sự giống nhau về các đặc tính hóa lý và chức năng do 2 trình tự có kích thước tương đương, vùng chức năng (domain UDPGT) không có sự khác biệt giữa 2 trình tự.

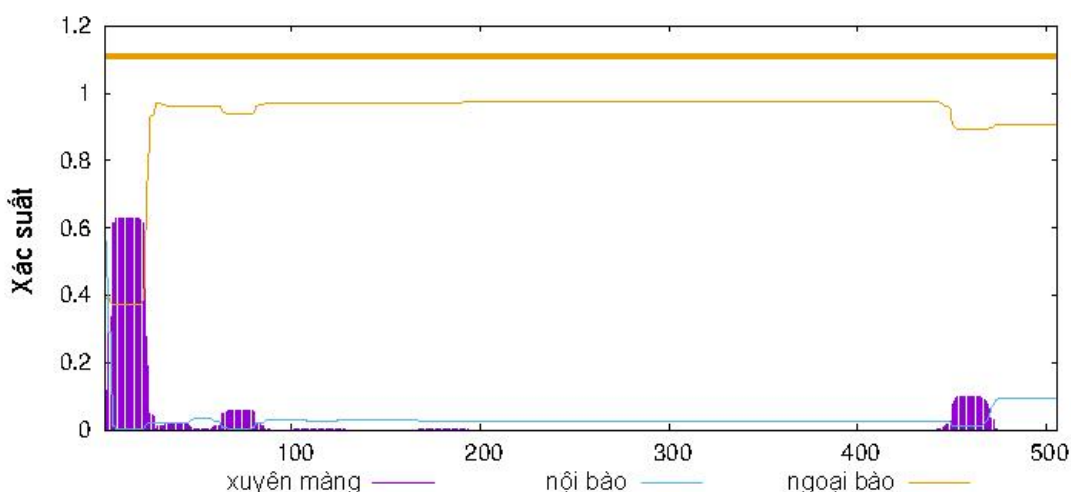
Bảng 3.12. Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm lý hóa của enzyme

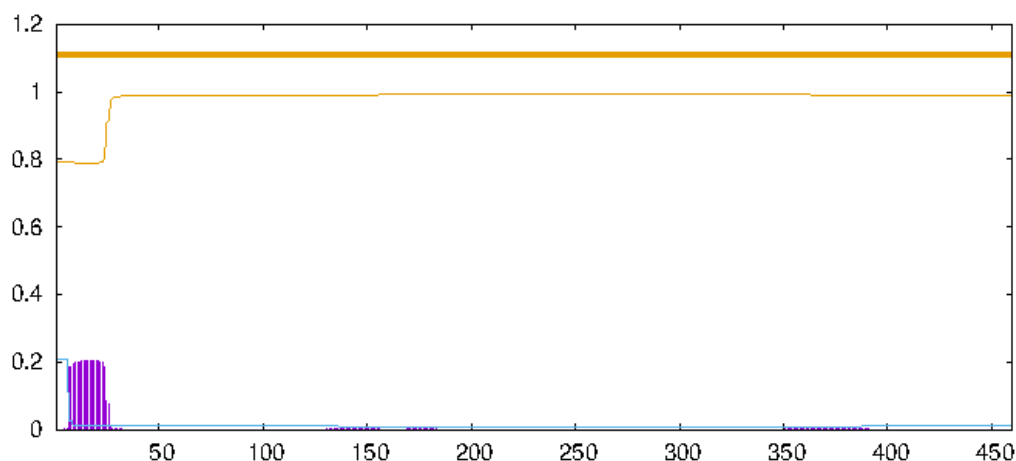
Đặc điểm	<i>CYP89A2</i>	<i>UGT91A1-QN</i>
Gene hoàn chỉnh (bp)	2.438	1.460
cDNA	1.521	1.383
Chuỗi polypeptide (amino acid)	506	460
Khối lượng phân tử (kDa)	58,44	52,786
Điểm đẳng điện (pI)	7,06	5,66
T _m	55°C~65°C	55°C~65°C
Acid/base	kiềm	kiềm
Domain	PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding, ClpB_D2_small và MoCF_biosynth	UDPGT (224-443)
α helix	15	16
β strain	8	15



Hình 3.9. Dự đoán cấu trúc không gian của enzyme *CYP89A2* (trái) và *UGT91A1* (phải). Cấu trúc cuộn xoắn α được trình bày bằng hình lát mỏng dạng cuộn, cấu trúc β được trình bày bằng hình mũi tên dạng sợi.

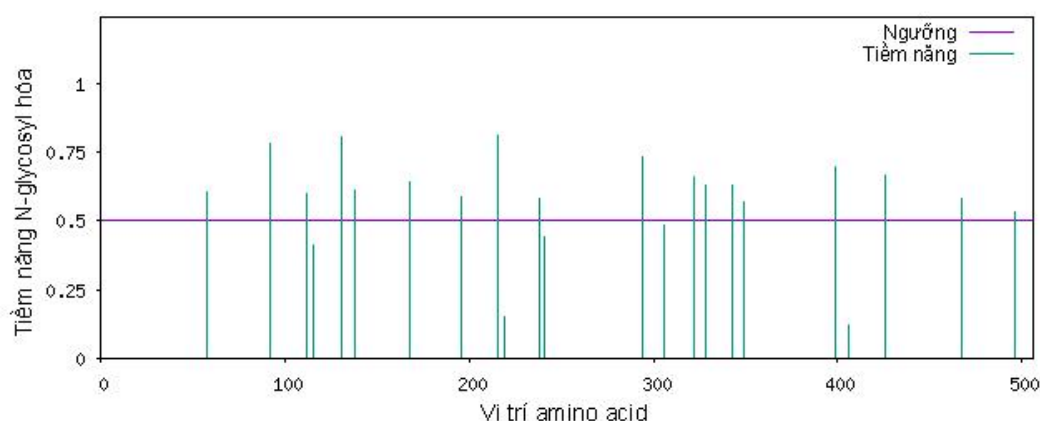
Vùng bảo tồn được dự đoán bằng chương trình SMART cho thấy *CYP89A2* có 13 domain hiện diện là PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding, ClpB_D2_small và MoCF_biosynth. Kết quả dự đoán cấu trúc xuyên màng cho thấy phân tử enzyme phần lớn nằm xuyên màng và một phần nhỏ được tiết ra môi trường ngoại bào, không có phần enzyme nằm bên trong tế bào. Vùng bảo tồn của *UGT91A1* có 1 domain (UDPGT) từ vị trí amino acid 224 đến 443. Kết quả dự đoán cấu trúc xuyên màng cho thấy phân tử enzyme phần lớn được tiết ra môi trường ngoại bào và một phần nhỏ nằm xuyên màng, không có phần enzyme nằm bên trong tế bào (Hình 3.10).





Hình 3.10. Mô hình cấu trúc không gian của *CYP89A2* (trên) và *UGT91A1-QN* (dưới) được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0

Phân tích trình tự *CYP89A2* bằng công cụ NetNGlyc 1.0 Server nhận thấy có tới 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N – glycosylation, trong khi đó, không có vị trí amino acid có khả năng xảy ra N – glycosylation ở *UGT91A1* (Hình 3.11).



Hình 3.11. Vị trí các amino acid có thể glycosyl hóa của *CYP89A2*.

3.2.4.3. Xác định mức độ phiên mã của các gene *CYP* và *UGT*

Sau khi đánh giá mức độ phiên mã của gene *CYP89A2 - QN* và *UGT91A1 - QN* trong tế bào huyền phù có xử lý elicitor, chúng tôi nhận thấy mức độ phiên mã của gene này không cao, chỉ có một số gene biểu hiện mạnh (Bảng 3.13 và 3.14).

Đối với các gene *CYP*, trong tế bào huyền phù các gene *CYP71B19*, *CYP86A8*, *CYP89A2* và *CYP 94A1* phiên mã mạnh, trong khi các gene còn lại không được phiên

mã hoặc phiên mã rất yếu. Gene *CYP71B19* phiên mã mạnh nhất khi xử lý SYM, tăng 6,14 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, các gene khác tăng mức độ phiên mã lên nhiều lần khi được xử lý với MeJA. Gene *CYP86A8* tăng 8,25 lần so với đối chứng, gene *CYP94A1* tăng 10,01 lần và gene *CYP89A2* tăng 11,14 lần (Bảng 3.13). Như vậy, MeJA đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường khả năng phiên mã của các gene *CYP* trong tế bào cây Giảo cổ lam.

Đối với các gene *UGT*, trong tế bào huyền phù chỉ có gene *UGT73B4* phiên mã mạnh, trong khi các gene còn lại không được phiên mã (không phát hiện). Gene *UGT73B4* phiên mã mạnh nhất khi xử lý SYM, tăng tới 15,35 lần so với đối chứng không xử lý elicitor (Bảng 3.14).

Bảng 3.13. Mức độ biểu hiện của các gene *CYP* trong tế bào huyền phù

Gene	Mẫu xử lý	Giá trị Ct		Giá trị 2- $\Delta\Delta$ Ct
		GP-18S	Gene	
<i>CYP71B19</i>	YE	26,30	33,67	0,30
	SA	28,79	34,19	1,18
	MJ	32,43	36,09	3,95
	SYM	33,35	36,37	6,14
	NC	28,94	34,58	1,00
<i>CYP77A3</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
<i>CYP86A7</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-

	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
	YE	26,30	30,53	0,22
	SA	28,79	30,90	0,96
<i>CYP86A8</i>	MJ	32,43	31,44	8,25
	SYM	22,23	31,37	0,01
	NC	28,94	30,99	1,00
	YE	26,30	35,01	0,10
	SA	28,79	37,28	0,11
<i>CYP89A2</i>	MJ	32,43	34,27	11,14
	SYM	22,23	35,72	0,00
	NC	28,94	34,26	1,00
	YE	26,30	35,96	-
	SA	28,79	-	-
<i>CYP90A1</i>	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	1,00
	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	37,64	0,38
<i>CYP94A1</i>	MJ	32,43	36,58	10,01
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	36,41	1,00

“-”: không phát hiện. MeJA: xử lý methyl jasmonate, SA: xử lý salycilic acid, YE: xử lý dịch chiết nấm men, SYM: xử lý đồng thời cả 3 elicitor, NC: đối chứng không xử lý elicitor.

Bảng 3.14. Mức độ biểu hiện của các gene *UGT* trong tế bào huyền phù

Gene	Mẫu xử lý	Giá trị Ct		Giá trị 2- $\Delta\Delta$ Ct
		GP-18S	Gene	
<i>UGT76B1</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
<i>UGT74F2</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
<i>UGT73B4</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	39,53	0,04
	MJ	32,43	36,17	5,38
	SYM	33,35	35,57	15,35
	NC	28,94	35,11	1,00
<i>UGT91A1</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-

	SYM	33,35	-	-
	NC	28,94	35,61	1,00
	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
<i>UGT91C1</i>	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	34,72	1,00

“-”: không phát hiện. MeJA: xử lý methyl jasmonate, SA: xử lý salycilic acid, YE: xử lý dịch chiết nấm men, SYM: xử lý đồng thời cả 3 elicitor, NC: đối chứng không xử lý elicitor.

Trong 2 gene đại diện được nghiên cứu, kết quả phân tích realtime PCR cho thấy gene *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý MeJA, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, xử lý tế bào bằng SA và ME không làm thay đổi hoạt động của gene này so với đối chứng.

Kết quả phân tích cho thấy *UGT91A1* và *UGT91C1* không được phiên mã hoặc phiên mã dưới ngưỡng phát hiện trong tất cả các công thức xử lý elicitor, do đó có khả năng các gen *UGT* khác (không được khảo sát) hoặc *UGT73B4* (tăng 15,35 lần) đảm nhận vai trò glycosyl hóa chính.

Theo kết quả trình bày ở bảng 3.10, các elicitor khi xử lý riêng lẻ đều làm tăng hàm lượng gypenoside trong tế bào, trong đó SA cho hiệu quả cao nhất, đạt 79,721 mg/g khô khi xử lý với SA 100 μ M sau 6 ngày nuôi cấy, gấp khoảng 2 lần mẫu tự nhiên. Tuy nhiên, phân tích mức độ phiên mã cho thấy các gene như *CYP89A2*, *CYP86A8*, *CYP94A1* hoạt động mạnh nhất khi xử lý với MeJA, hoặc khi xử lý phối hợp cả 3 elicitor (*CYP71B19*, *UGT73B4*). Điều này có thể thấy các gene có thể đóng các vai trò khác trong chu trình sinh tổng hợp gypenoside và được kích hoạt bởi các elicitor khác nhau.

Tóm lại, các gene *CYP* và *UGT* có mức phiên mã khác nhau trong tế bào huyền phù được xử lý bởi các elicitor. Gene *CYP71B19* phiên mã mạnh nhất khi xử lý SYM, tăng 6,14 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Gene *CYP86A8* tăng 8,25 lần so với đối chứng, gene *CYP94A1* tăng 10,01 lần và gene *CYP89A2* tăng 11,14 lần so với đối chứng khi được xử lý MeJA. Đối với các gene *UGT*, gene *UGT73B4* phiên mã mạnh nhất khi xử lý SYM, tăng tới 15,35 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Do đó, xử lý đồng thời 3 loại elicitor được sử dụng để nuôi cấy tế bào sản xuất gypenoside cho các thí nghiệm thử hoạt tính về sau.

3.3. THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH CỦA CHẾ PHẨM CÓ CHỨA GYPENOSIDE TỪ TẾ BÀO HUYỀN PHÙ

3.3.1. Sản xuất cao chiết và chế phẩm có chứa gypenoside

3.3.1.1. Sản xuất cao chiết

Các mẫu cao được phân tích hàm lượng gypenoside bằng phương pháp quang phổ và hàm lượng Rb1 bằng kỹ thuật HPLC. Hàm lượng gypenoside được thể hiện ở bảng 3.15 cho thấy mẫu cao chiết tế bào có hàm lượng gypenoside là 472,159 mg/g khô, cao hơn so với mẫu cao chiết tự nhiên là 369,489 mg/g khô. Các mẫu cao này được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo để đánh giá hoạt tính.

Bảng 3.15. Sự tích lũy gypenoside trong mẫu cao chiết Giảo cổ lam

Mẫu	Tự nhiên	Tế bào huyền phù
Gypenoside trong sinh khối khô (mg/g)	37,270 ± 4,710	48,844 ± 3,933
Rb1 trong sinh khối khô (mg/g)	0,072 ± 0,021	0,041 ± 0,004
Gypenoside trong cao chiết (mg/g khô)	369,489 ± 25,317	472,159 ± 59,098
Rb1 trong cao chiết (mg/g khô)	0,697 ± 0,081	0,394 ± 0,021

3.3.1.2. Sản xuất chế phẩm có chứa gypenoside

Tế bào huyền phù sau 18 ngày nuôi cấy được dùng để thu sinh khối. Tổng khối lượng sinh khối tươi thu được khoảng 1.350 g và khối lượng khô khoảng 54,77 g. Sinh khối khô sau khi chiết với methanol 80% thu được xấp xỉ 11,13 g cao chiết. Cao chiết tiếp tục được tinh chế để thu được khoảng 5,2 g chế phẩm có chứa gypenoside được sử dụng để đánh giá khả năng gây độc tế bào.

3.3.2. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư

3.3.2.1. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của cao chiết toàn phần

Ảnh hưởng của cao chiết đến dòng tế bào A549

Hiệu quả ức chế ở nồng độ cao nhất (200 $\mu\text{g/mL}$) khoảng 25,15% đối với cao chiết huyền phù tế bào và khoảng 37,68% đối với cao chiết tự nhiên. Có sự khác biệt đáng kể về sự ức chế tăng sinh tế bào trong cao chiết huyền phù tế bào và cao chiết tự nhiên đối với tế bào A549 (Bảng 3.16). Tuy nhiên, khả năng ức chế đối với dòng tế bào A549 không mạnh.

Bảng 3.16. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư phổi người của cao chiết Giảo cổ lam

Nồng độ cao ($\mu\text{g/mL}$)	Khả năng ức chế (% , $M \pm SD$)	
	Cao chiết tự nhiên	Cao chiết tế bào
Tế bào ung thư phổi A549		
4	$0,72 \pm 0,79$	$0,90 \pm 0,39$
20	$6,98 \pm 1,18$	$6,03 \pm 0,62$
100	$23,56 \pm 1,52$	$13,88 \pm 0,28^*$
200	$25,15 \pm 2,03$	$37,68 \pm 1,26^*$
IC ₅₀	>100	>100

Tế bào ung thư gan HepG2		
4	0,63 ± 0,38	0,69 ± 0,13
20	8,93 ± 0,6	8,81 ± 0,93
100	22,51 ± 0,58	32,89 ± 1,43*
200	34,36 ± 1,12	41,16 ± 2,18*
IC ₅₀	>100	>100
Tế bào ung thư gan Huh7		
4	2,44 ± 0,13	1,72 ± 0,47
20	7,24 ± 1,06	7,42 ± 0,57
100	34,84 ± 1,72	15,19 ± 0,63*
200	36,07 ± 1,89	44,43 ± 1,65*
IC ₅₀	>100	>100
Tế bào ung thư bạch cầu HL-60		
4	3,57 ± 0,62	5,88 ± 0,93
20	6,42 ± 0,93	11,23 ± 1,41
100	33,51 ± 2,02	39,04 ± 1,07
200	42,17 ± 2,48	48,76 ± 1,94*
IC ₅₀	>100	>100

Ellipticine là chất đối chứng dương; DMSO 1% là đối chứng âm.

**Sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.*

Ảnh hưởng của cao chiết đến dòng tế bào HepG2 và Huh7

Trong các dòng tế bào ung thư gan người, cao chiết tế bào và cao chiết tự nhiên ức chế sự tăng sinh của cả tế bào HepG2 và Huh7. Sự ức chế tăng trưởng của tế bào HepG2 và Huh7 tăng nhiều ở nồng độ cao (100 - 200 µg/mL). Cao chiết ở nồng độ 200 µg/mL cho thấy hoạt tính ức chế cao nhất trong mẫu chiết tự

nhiên (khoảng 34,36% ở HepG2 và 36,07% ở Huh7) cũng như trong cao chiết huyền phù tế bào (xấp xỉ 41,16% ở HepG2 và 44,43% ở Huh7) (Bảng 3.16).

Ảnh hưởng của cao chiết đến dòng tế bào HL-60

Cao chiết tế bào và cao chiết tự nhiên ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người ở hai nồng độ cao nhất, 100 và 200 $\mu\text{g/mL}$ (có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa cao chiết tự nhiên và cao chiết tế bào). Sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người bị ức chế đáng kể bởi cao chiết Giảo cổ lam ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ trong cả mẫu tự nhiên (khoảng 42,17%) và mẫu tế bào (khoảng 48,76%) (Bảng 3.16).

3.3.2.2. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của chế phẩm chứa gypenoside

Từ kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết Giảo cổ lam (mẫu tự nhiên và tế bào), chúng tôi đã tinh chế chế phẩm có chứa gypenoside từ cao chiết và tiếp tục thử nghiệm ảnh hưởng lên khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư.

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào A549

Kết quả thử nghiệm cho thấy gypenoside ức chế phụ thuộc vào nồng độ đối với sự tăng sinh tế bào A549. Hiệu quả ức chế ở nồng độ cao nhất (200 $\mu\text{g/mL}$) là khoảng 83,37% đối với mẫu tế bào và khoảng 33,76% đối với mẫu tự nhiên. Sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về ức chế tăng sinh tế bào giữa mẫu huyền phù tế bào và mẫu tự nhiên đối với tế bào A549, giá trị IC_{50} thu được ở mẫu tế bào là 94,07 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 3.17).

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào HepG2 và Huh7

Trong các dòng tế bào ung thư gan người, mẫu tế bào và mẫu tự nhiên ức chế sự tăng sinh của cả tế bào HepG2 và Huh7. Sự ức chế tăng trưởng của tế bào HepG2 và Huh7 tăng nhiều ở nồng độ cao (100 - 200 $\mu\text{g/mL}$). Thử nghiệm ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ cho thấy hoạt tính ức chế cao nhất trong mẫu chiết tự nhiên (khoảng 42,30% ở HepG2 và 42,17% ở Huh7) cũng như trong mẫu huyền phù tế bào

(khoảng 88,21% ở HepG2 và 63,11% ở Huh7), giá trị IC_{50} thu được ở mẫu tế bào là 86,66 $\mu\text{g/mL}$ ở HepG2 và 136,99 $\mu\text{g/mL}$ ở Huh7.

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào HL-60

Mẫu tế bào và mẫu tự nhiên ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người ở hai nồng độ cao nhất là 200 $\mu\text{g/mL}$ (có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa mẫu tự nhiên và mẫu tế bào). Sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người bị ức chế đáng kể bởi mẫu Giảo cổ lam ở nồng độ 200 $\mu\text{g/mL}$ trong cả mẫu tự nhiên (khoảng 37,80%) và mẫu tế bào (khoảng 96,35%), giá trị IC_{50} thu được ở mẫu tế bào là 119,30 $\mu\text{g/mL}$ (Hình 3.12).

Chiết xuất tự nhiên của Giảo cổ lam đã được nghiên cứu như một chất chống ung thư mạnh chống lại một số loại tế bào ung thư tăng sinh trong ống nghiệm, bao gồm các tế bào ung thư vú, ung thư phổi, ung thư đại trực tràng, ung thư tuyến tiền liệt và tế bào ung thư gan. Dammarane-type saponin, gypenosides VN1-VN7 (1-7) đã được tách chiết từ cây Giảo cổ lam và được phân tích cấu trúc hóa học. Các chất này đều có tác dụng gây độc lên các dòng tế bào ung thư ở người như A549 (phổi), HT - 29 (đại tràng), MCF - 7 (vú) và SK - OV - 3 (buồng trứng), với các giá trị IC_{50} từ 19,6 đến 43,1 μM . Đối với dòng tế bào HL - 60 (ung thư bạch cầu cấp tính), các hợp chất 1, 5 và 6 hoạt động yếu với các giá trị IC_{50} là 62,8, 72,6 và 82,4 nM, trong khi các hợp chất 2, 3, 4 và 7 mất hoạt tính ở giá trị $IC_{50} > 100 \mu\text{M}$ [2].

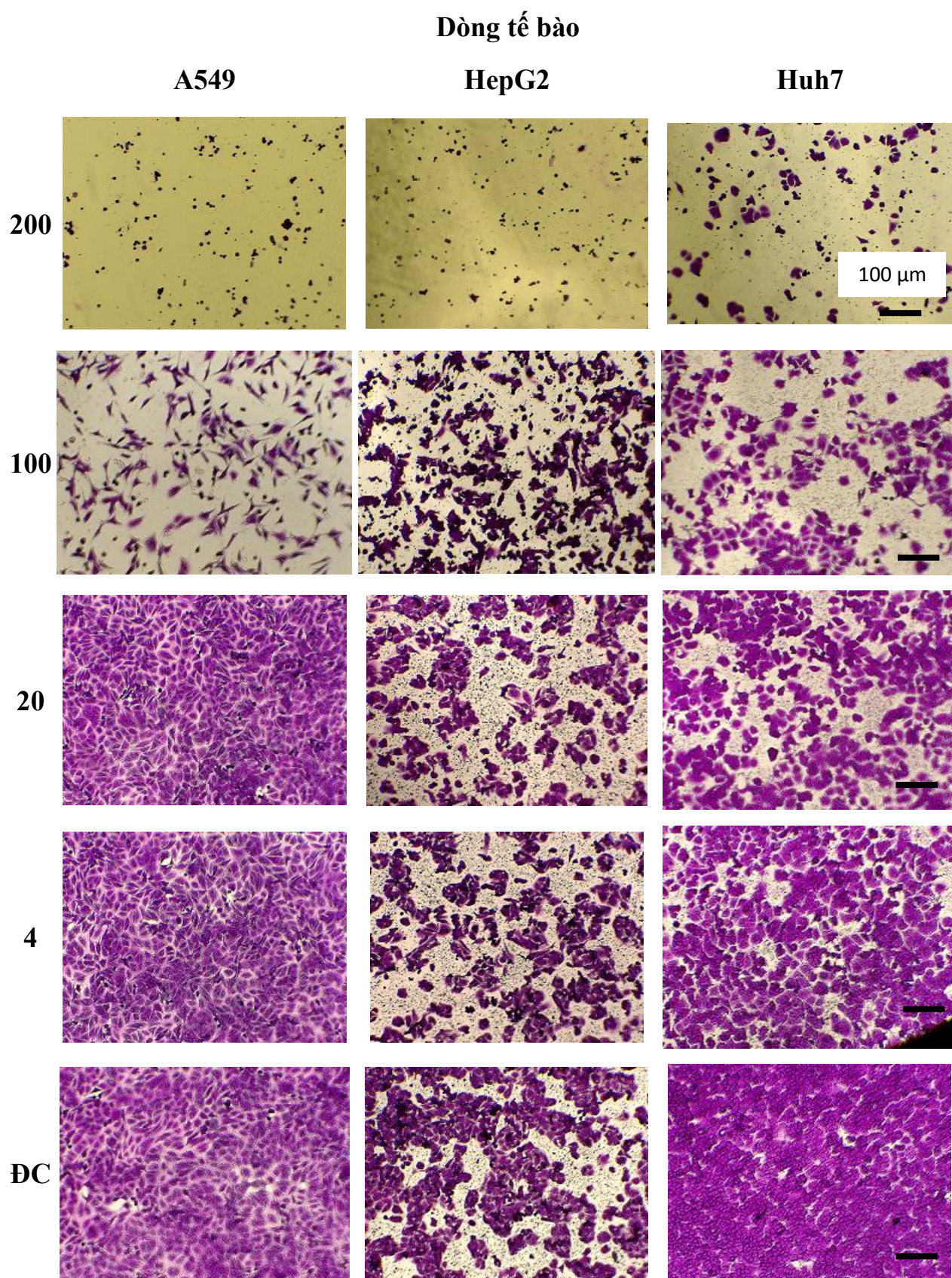
Bảng 3.17. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư của chế phẩm chứa gypenoside

Nồng độ gypenoside ($\mu\text{g/mL}$)	Khả năng ức chế (% , $M \pm SD$)	
	Mẫu tự nhiên	Mẫu tế bào
Tế bào ung thư phổi A549		
4	$3,57 \pm 1,48$	$5,48 \pm 1,70$
20	$8,47 \pm 1,70$	$8,57 \pm 0,71$

100	$22,86 \pm 1,28$	$53,78 \pm 1,31^*$
200	$33,76 \pm 2,70$	$83,37 \pm 5,04^*$
IC ₅₀	> 200	$94,07 \pm 6,22$
Tế bào ung thư gan HepG2		
4	$8,45 \pm 0,46$	$15,04 \pm 0,50$
20	$15,54 \pm 0,13$	$23,58 \pm 2,83$
100	$36,75 \pm 1,28$	$51,74 \pm 1,24^*$
200	$42,30 \pm 3,37$	$88,21 \pm 4,87^*$
IC ₅₀	> 200	$86,66 \pm 2,22$
Tế bào ung thư gan Huh7		
4	$2,66 \pm 0,12$	$1,53 \pm 0,25$
20	$8,47 \pm 0,49$	$11,03 \pm 0,43$
100	$15,41 \pm 0,49$	$42,66 \pm 2,27^*$
200	$42,17 \pm 2,03$	$63,11 \pm 3,12^*$
IC ₅₀	> 200	$136,99 \pm 11,60$
Tế bào ung thư bạch cầu HL-60		
4	$5,44 \pm 0,37$	$4,79 \pm 0,18$
20	$10,82 \pm 1,19$	$10,88 \pm 1,75$
100	$17,42 \pm 1,37$	$38,46 \pm 2,47^*$
200	$37,80 \pm 3,81$	$96,35 \pm 3,48^*$
IC ₅₀	> 200	$119,30 \pm 5,45$

Ellipticine là chất đối chứng dương; DMSO 1% là đối chứng âm.

**Sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.*



Hình 3.12. Ảnh chụp khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy bám dính của dịch chiết chứa gypenoside.

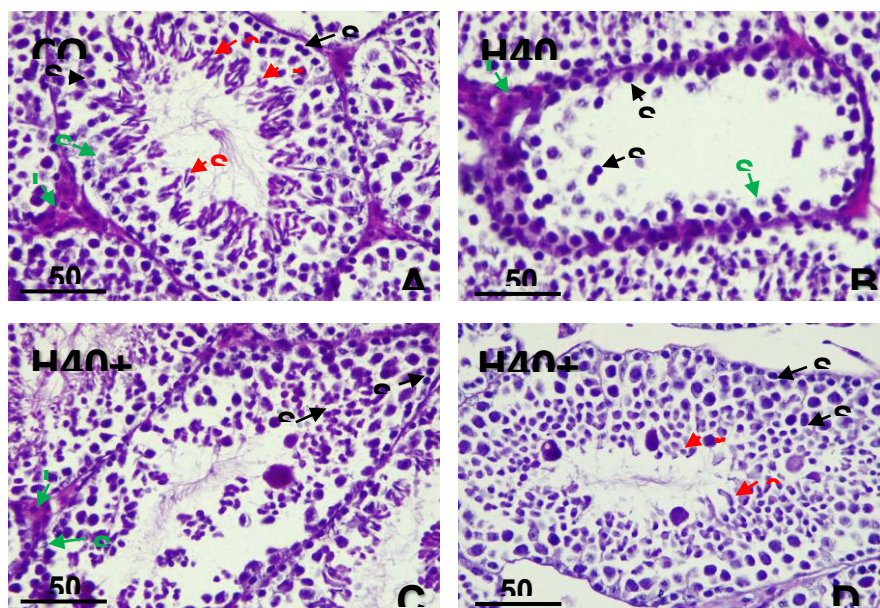
3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết

3.3.3.1. Ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng cải thiện quá trình sinh tinh

Quá trình sinh tinh diễn ra bình thường trong lòng ống sinh tinh ở mô tinh hoàn chuột nhóm đối chứng. Tinh nguyên bào xếp thành 1 hàng sát với màng cơ bản của ống sinh tinh. Các tinh bào hướng vào trong lòng ống. Các tinh bào 1 giảm phân tạo ra các tinh tử tròn, sau đó biệt hóa thành tinh tử dài tập trung trong lòng ống sinh tinh. Kết quả cuối cùng của quá trình biệt hóa tạo ra tinh trùng. Tinh trùng sẽ di chuyển trong lòng ống sinh tinh đến tập trung ở mào tinh (Hình 3.13a). Xử lý nhiệt ở nhiệt độ 40°C làm ảnh hưởng nghiêm trọng đến quá trình sinh tinh. Trong lòng ống sinh tinh chỉ còn sự hiện diện của các tinh nguyên bào là các tế bào đầu dòng tinh, một số ít tinh bào và tế bào leydig là tế bào nuôi (Hình 3.13b).

Chuột xử lý nhiệt có uống cao chiết Giảo cổ lam cải thiện quá trình sinh tinh, lòng ống sinh tinh có sự hiện diện của nhiều tế bào dòng tinh. Tuy nhiên, quá trình sinh tinh bị dừng lại ở giai đoạn tinh bào (Hình 3.13c).

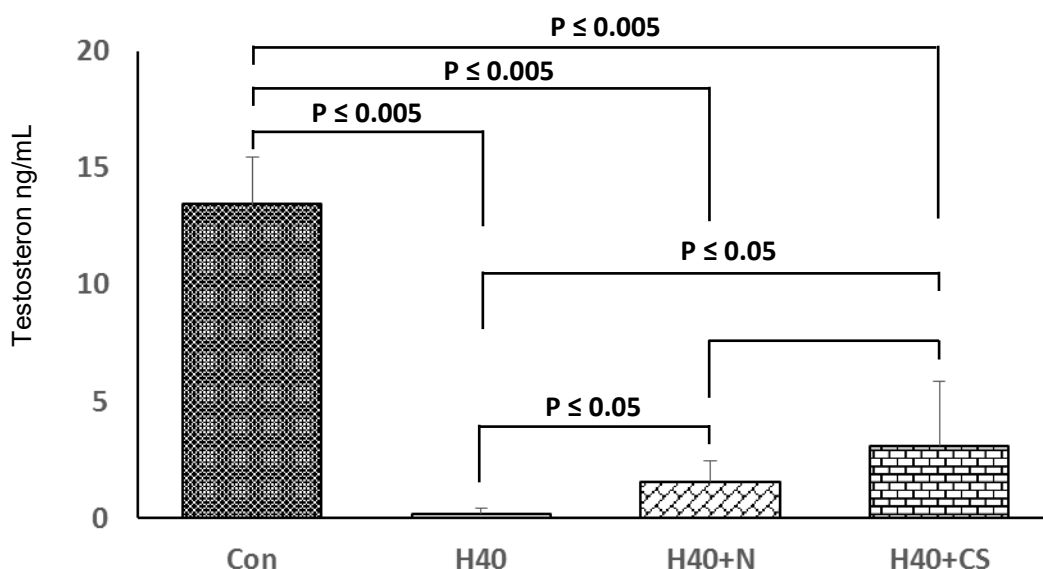
Cao chiết từ tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù cải thiện đáng kể quá trình sinh tinh diễn ra trong lòng ống sinh tinh. Số lượng tế bào dòng tinh trong lòng ống đã tăng lên đáng kể, đã quan sát thấy một số tế bào tinh tử tròn và tinh tử dài. Tuy nhiên rất khó để quan sát thấy tinh trùng trong lòng ống sinh tinh (Hình 3.13d).



Hình 3.13. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên cấu trúc vi thể ống sinh tinh ở mô tinh hoàn chuột. **A.** Quá trình phát sinh tinh bình thường diễn ra trong lòng ống sinh tinh chuột nhóm đối chứng (CON). **B.** Ống sinh tinh chuột xử lý nhiệt 40°C. **C.** Ống sinh tinh chuột xử lý nhiệt 40 °C và có uống cao chiết Giảo cổ lam từ cây tự nhiên. **D.** Ống sinh tinh chuột xử lý nhiệt 40 °C và có uống cao chiết Giảo cổ lam từ tế bào nuôi cấy huyền phù. **Le** (Leydig cells): tế bào leydig, **Se** (Sertoli cells): tế bào sertoli, **Sg** (Spermatogonia): tinh nguyên bào, **Sc** (Spermatocytes): tinh bào, **rs** (round spermatids): tinh tử tròn, **es** (elongating spermatids): tinh tử dài, **S** (Spermatozoa): tinh trùng.

3.3.3.2. Ảnh hưởng của cao chiết đến khả năng cải thiện nồng độ testosterone trong máu

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy cao chiết của Giảo cổ lam giúp phục hồi khả năng sản xuất testosterone của chuột stress nhiệt. Cao chiết từ huyền phù tế bào có kết quả giúp cải thiện testosterone ở chuột stress nhiệt tương đương với dịch chiết cây tự nhiên.



Hình 3.14. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên nồng độ testosterone trong máu chuột xử lý nhiệt

Nồng độ testosterone trong máu chuột nhóm đối chứng ở mức 13,44 ng/mL, xử lý nhiệt 40°C trong 5 tuần làm cho nồng độ testosterone trong máu giảm mạnh (0,20 ng/mL). Chuột uống cao chiết Giảo cổ lam từ cây tự nhiên hay huyền phù tế bào cải thiện nồng độ testosterone trong máu, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chỉ xử lý nhiệt. Nhóm chuột xử lý nhiệt có uống cao chiết từ huyền phù tế bào Giảo cổ lam có nồng độ testosterone trong máu là 3,19 ng/mL, cao hơn so với nhóm chuột xử lý nhiệt có uống cao chiết từ cây Giảo cổ lam tự nhiên là 1,57 ng/mL. Tuy nhiên, sự khác biệt này không đạt mức có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (Hình 3.14).

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi rút ra một số kết luận như sau:

1. Luận án đã xây dựng thành công hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào *Gynostemma pentaphyllum* ở quy mô bình tam giác và bước đầu mở rộng lên hệ thống bioreactor. Trong điều kiện nuôi cấy tối ưu, tế bào huyền phù có khả năng tích lũy gypenoside ở mức cao (khoảng 46,9 mg/g khô trong bình tam giác và khoảng 40,1 mg/g khô trong bioreactor), cho thấy hệ thống nuôi cấy tế bào là hướng tiếp cận khả thi nhằm tạo nguồn nguyên liệu chủ động cho khai thác gypenoside.

2. Các elicitor riêng lẻ và phối hợp đều có khả năng cảm ứng làm gia tăng tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù. Đặc biệt, xử lý SA đơn lẻ có thể làm tăng hàm lượng gypenoside lên xấp xỉ 80 mg/g khô, trong khi phối hợp MeJA, SA và YE cho hàm lượng gypenoside cao nhất, đạt trên 100 mg/g khô. Kết quả cho thấy tồn tại tác động hiệp đồng giữa các elicitor trong điều hòa sinh tổng hợp gypenoside.

3. Các elicitor có khả năng điều hòa biểu hiện của nhiều gene thuộc hai họ *CYP* và *UGT* trong tế bào huyền phù. Một số gene *CYP* và *UGT* thể hiện mức tăng phiên mã đáng kể (đến trên 10 lần so với đối chứng), chứng tỏ con đường sinh tổng hợp triterpen saponin đã được hoạt hóa ở mức phân tử. Sự gia tăng đồng thời biểu hiện của các gene tham gia các bước oxy hóa và glycosyl hóa góp phần giải thích cơ chế của sự gia tăng tích lũy gypenoside quan sát được.

4. Luận án đã thiết lập được quy trình làm giàu gypenoside từ cao chiết tổng số thông qua các bước khử tạp kém phân cực và kỵ nước, thu được phân đoạn giàu gypenoside hòa tan tốt trong methanol và DMSO, phù hợp cho phân

tích HPLC và các thử nghiệm sinh học. Quy trình này tạo cơ sở cho các nghiên cứu chuẩn hóa và phát triển chế phẩm trong tương lai.

5. Gypenoside và cao chiết từ tế bào huyền phù *Gynostemma pentaphyllum* thể hiện tiềm năng hoạt tính sinh học, trong đó gypenoside ức chế mạnh đối với tế bào ung thư gan HepG2 (IC_{50} khoảng 86,7 $\mu\text{g/mL}$), đồng thời cao chiết có khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn, góp phần cải thiện quá trình sinh tinh và nồng độ testosterone trong mô hình chuột xử lý nhiệt. Những kết quả này khẳng định giá trị ứng dụng tiềm năng của hệ thống nuôi cấy tế bào trong lĩnh vực dược liệu.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục nghiên cứu tối ưu các điều kiện nuôi cấy và sản xuất gypenoside ở quy mô pilot trong hệ thống huyền phù tế bào Giảo cổ lam nhằm đánh giá tính ổn định của sinh trưởng, hiệu suất tạo sinh khối và khả năng tích lũy gypenoside. Việc hoàn thiện quy trình ở quy mô pilot sẽ tạo cơ sở khoa học và công nghệ để chủ động cung cấp nguồn nguyên liệu gypenoside với số lượng lớn và chất lượng ổn định cho ngành dược.

Bên cạnh gypenoside, nên mở rộng nghiên cứu sinh tổng hợp và thu nhận các nhóm hợp chất thứ cấp khác như flavonoid từ nuôi cấy huyền phù Giảo cổ lam nhằm đa dạng hóa nguồn hoạt chất sinh học và nâng cao giá trị ứng dụng của công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật trong sản xuất dược liệu.

NHỮNG CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoang Tan Quang, Pham Thi Diem Thi, **Dang Ngoc Sang**, Tran Thi Ngoc Tram, Nguyen Duc Huy, Tran Quoc Dung, Quach Thi Thu The (2022) Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*). *Molecules* 27(9): 2972.
2. Nguyen Thanh Tung, Pham Thi Diem Thi, **Dang Ngoc Sang**, Do Thi Thao, Hoang Tan Quang (2022) Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. *Research Journal of Biotechnology* 17(3): 61-68.
3. Tung Nguyen-Thanh, **Sang Dang-Ngoc**, Dung Tran-Quoc, Quang Hoang-Tan (2023) Gypenosides production and spermatogenesis recovery potentials of extracts from cell suspension cultures of *Gynostemma pentaphyllum*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 15(4): 216-222. <https://doi.org/10.18502/ajmb.v15i4.13491>
4. **Đặng Ngọc Sáng**, Nguyễn Quang Hoàng Vũ, Nguyễn Thị Nguyên Mẫn, Nguyễn Hữu Thuận Anh, Trần Quốc Dung, Hoàng Tấn Quảng (2025) Phân lập gene, dự đoán đặc điểm và phân tích mức độ phiên mã gene Cytochrome P450 (CYP89A2) từ cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino). *Kỷ yếu Hội nghị Sinh lý thực vật Toàn quốc lần thứ 3 - 2025*: 79-86.
5. **Đặng Ngọc Sáng**, Phạm Thị Diễm Thi, Trần Thị Thoa, Trần Quốc Dung, Hoàng Tấn Quảng (2025) Nghiên cứu sản xuất sinh khối và gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 134(3A): 119-129, DOI: 10.26459/hueunijard.v134i3A.7717

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Nguyễn Tiến Dẫn, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Khắc Viện (2000). *Kết quả bước đầu về nghiên cứu tác dụng hạ cholesterol máu của cây thất diệp đởm (Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino)*. *Tạp chí Dược liệu* 5(1): 15-16.
2. Phạm Thanh Kỳ, Phan Thị Thu Anh, Phan Thị Phi Phi (2007). *Nghiên cứu tác dụng tăng đáp ứng miễn dịch của dược liệu Giảo cổ lam - Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino*. *Tạp chí Thông tin Y dược* 5: 35-38.
3. Bùi Văn Lê, Nguyễn Ngọc Hồng (2006). *Ảnh hưởng của chất điều hòa tăng trưởng thực vật và đường saccharose lên dịch nuôi cấy huyền phù tế bào dừa cạn (Catharanthus roseus)*. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 9(6): 59-66.
4. Nguyễn Hoàng Lộc (2011). *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật: Các khái niệm và ứng dụng*. NXB Đại học Huế.
5. Nguyễn Hoàng Lộc (2013). *Sản xuất một số hợp chất dược phẩm bằng nuôi cấy tế bào thực vật và cây trồng chuyển gen*. NXB Đại học Huế.
6. Ngô Quốc Luật, Vũ Thị Tuyết Mai, Nguyễn Thị Bình (2010). *Biện pháp nhân giống vô tính và chất lượng hạt giống cây đèn toong*. *Tạp chí Dược liệu* 15(1): 9-14.
7. Bùi Thị Luyến, Phạm Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thu Quỳnh, Nguyễn Duy Thư, Nguyễn Thị Cải (2019). *Định lượng saponin toàn phần trong dược liệu giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum) 5 lá và 7 lá thu hái tại Thái Nguyên bằng phương pháp đo quang*. *TNU Journal of Science and Technology* 207(14): 187 - 194.
8. Nguyễn Hữu Nhân, Hoàng Tấn Quảng, Nguyễn Hoàng Lộc (2019). *Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên khả năng sinh trưởng của callus cây Bách bệnh (Eurycoma longifolia Jack)*. *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế: Khoa học tự nhiên* 128: 69-76.
9. Quách Ngô Diễm Phương, Hoàng Thị Thanh Minh, Hoàng Thị Thu, Bùi Văn Lê (2010). *Nuôi cấy mô sẹo và dịch huyền phù tế bào cây bèo đất Drosera burmanni Vahl cho mục tiêu thu nhận quinone*. *Tạp chí Phát triển Khoa học và Công nghệ* 13(T2): 53-60.
10. Hoàng Tấn Quảng, Phạm Thị Diễm Thi, Trần Thúy Lan, Phạm Mai Thu Thủy, Vũ Đức Hoàng, Phan Thị Á Kim (2021). *Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên sinh trưởng của callus cây giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino)-một loại thảo dược quý*. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên* 130(1C): 127-137.
11. Vũ Quang Sáng, Nguyễn Thị Nhẫn, Mai Thị Tân, Nguyễn Thị Kim Thanh (2007). *Giáo trình sinh lý thực vật ứng dụng*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội
12. Phạm Thị Mỹ Trâm, Ngô Kế Sương, Lê Thị Thuỷ Tiên (2020). *Ảnh hưởng của một số yếu tố môi trường đến quá trình nuôi cấy tế bào xạ đen (Ehretia*

asperula Zoll. et Mor.). *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học tự nhiên* 129(1A): 31-41.

13. Hoàng Thị Trang, Hoàng Thị Phương, Phạm Thị Thu Hường, Mai Châu Phương, Đâu Bảo Ngọc, Trần Tiến Thịnh, Phạm Thị Dâu (2017). *Bước đầu nghiên cứu đáp ứng của thụ thể Constitutive Androstane với dịch chiết Giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum)*. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ* 33(2S): 242-247.

14. Viện Dược Liệu (1996). *Cây thuốc Việt Nam*. NXB Khoa Học kỹ thuật, Hà Nội.

Tiếng Anh

15. Abd El-Emam MM, Ray MN, Ozono M, Kogure KJJoTB (2023). *Heat stress disrupts spermatogenesis via modulation of sperm-specific calcium channels in rats*. 112: 103465.

16. Abdollahi F, Amanpour S, Muhammadnajad A, Barzegar F, Dehghan SFJH (2023). *Testicular histopathology in rats co-exposed to heat and psychological stressors*. 9(3).

17. Abdulhafiz F, Mohammed A, Reduan MFH, Kari ZA, Wei LS, Goh KWJAJoc (2022). *Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites*. 15(11): 104161.

18. Ahmed A, Saleem MA, Saeed F, Afzaal M, Imran A, Nadeem M, Ambreen S, Imran M, Hussain M, Al Jbawi EJIJoFP (2023). *Gynostemma pentaphyllum an immortal herb with promising therapeutic potential: A comprehensive review on its phytochemistry and pharmacological perspective*. 26(1): 808-832.

19. Al-Khayri JM, Naik PM (2020). *Elicitor-induced production of biomass and pharmaceutical phenolic compounds in cell suspension culture of date palm (Phoenix dactylifera L.)*. *Molecules* 25(20): 4669.

20. André SB, Mongomake K, Kouassi M, Edmond KK, Kone T, Kouakou T, Kouadio J (2015). *Effects of plant growth regulators and carbohydrates on callus induction and proliferation from leaf explant of Lippia multiflora Moldenke (Verbenacea)*. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 8: 118-127.

21. Ao Z, Qin Z (1998). *Effect of some stress factors on gypenoside accumulation in callus of Gynostemma pentaphyllum*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology* 4(1): 10-14.

22. Ashraf K, uz Zaman Q, Tang W, Jiang P, Wan X, Yuri K, Mohsin A, Guo MJFiPS (2025). *Nano-elicitation strategy to improve specialized metabolite pathways in plant cell suspension culture*. 16: 1679901.

23. Babineau M, Mahmood K, Mathiassen SK, Kudsk P, Kristensen M (2017). *De novo transcriptome assembly analysis of weed Apera spica-venti from seven tissues and growth stages*. *BMC Genomics* 18(1): 128.

24. Barrales-Cureño HJ, Ramos Valdivia AC, Soto Hernández M (2022). *Increased production of taxoids in suspension cultures of Taxus globosa after elicitation*. *Future Pharmacology* 2(1): 45-54.

25. Benavides K, Sánchez-Kopper A, Jiménez-Quesada K, Perez R, Garro-Monge GJM (2023). *Evaluation of salicylic acid and Methyl Jasmonate as Elicitors in Phyllanthus acuminatus Hairy roots by non-targeted analysis using high-resolution Mass Spectrometry*. 29(1): 80.
26. Bhaskar R, Xavier LSE, Udayakumaran G, Kumar DS, Venkatesh R, Nagella PJPC, Tissue, Culture O (2022). *Biotic elicitors: a boon for the in-vitro production of plant secondary metabolites*. 149(1): 7-24.
27. Bilodeau ARJBI (2024). *The pros and cons of adherent versus suspension cell culture*. 37(1): 18-22.
28. Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I (2012). *Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures*. *Plant Cell Reports* 31(3): 461-477.
29. Cole A (2018). *Regulation of Seed Germination by MFT, MEE26, and CYP89A2 in Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, University of York.
30. Constante CK, Rodríguez J, Sonnenholzner S, Domínguez-Borbor CJA (2022). *Adaptation of the methyl thiazole tetrazolium (MTT) reduction assay to measure cell viability in Vibrio spp.* 560: 738568.
31. Cuéllar-Torres EA, Aguilera-Aguirre S, Hernández-Oñate MÁ, López-García UM, Vega-Arreguín J, Montalvo-González E, Ortiz-Basurto RI, Chacón-López AJH (2023). *Molecular aspects revealed by omics technologies related to the defense system activation in fruits in response to elicitors: a review*. 9(5): 558.
32. Cui WY, Jin Y, Liu H, Zu ML, Zhai XF, Yang C, Gu YL, Cheng Y, Piao XL (2021). *Dammarane-type saponins from Gynostemma pentaphyllum and their cytotoxicities*. *Natural Product Research* 35(22): 4433-4441.
33. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K (2020). *Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds*. *Biotechnology Reports* 26: e00450.
34. Chandran H, Meena M, Barupal T, Sharma K (2020). *Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds*. *Biotechnol. Rep.* 26: e00450-e00450.
35. Chang CK, Chang KS, Lin YC, Liu SY, Chen CY (2005). *Hairy root cultures of Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins*. *Biotechnology Letters* 27(16): 1165-1169.
36. Chen CH, Huang TY, Lee MR, Hsu SL, Chang CMJ (2007). *Continuous pressurized fluid extraction of Gynostemma pentaphyllum and purification of gypenosides*. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46(24): 8138-8143.
37. Chen JC, Tsai CC, Chen LD, Chen HH, Wang WC (2000). *Therapeutic effect of gypenoside on chronic liver injury and fibrosis induced by CCl₄ in rats*. *The American Journal of Chinese Medicine* 28(2): 175-185.
38. Chen PY, Chang CC, Huang HC, Zhang LJ, Liaw CC, Lin YC, Nguyen NL, Vo TH, Cheng YY, Morris-Natschke SL, Lee KH, Kuo YH (2019). *New Dammarane-type Saponins from Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules* 24(7).

39. Chen Q, Ma C, Qian J, Lan X, Chao N, Sun J, Wu Y (2016). *Transcriptome sequencing of Gynostemma pentaphyllum to Identify genes and enzymes involved in triterpenoid biosynthesis. International Journal of Genomics* 2016: 1-10.
40. Chen W, Li S, Bai D, Li Z, Liu H, Bai L, Pan L (2023). *Detoxification mechanism of herbicide in Polypogon fugax and its influence on rhizosphere enzyme activities. Ecotoxicology and Environmental Safety* 263: 115263.
41. Cheng TC, Lu JF, Wang JS, Lin LJ, Kuo HI, Chen BH (2011). *Antiproliferation effect and apoptosis mechanism of prostate cancer cell PC-3 by flavonoids and saponins prepared from Gynostemma pentaphyllum. J Agric Food Chem* 59(20): 11319-11329.
42. Cheng Y, Liu H, Tong X, Liu Z, Zhang X, Li D, Jiang X, Yu X (2020). *Identification and analysis of CYP450 and UGT supergene family members from the transcriptome of Aralia elata (Miq.) seem reveal candidate genes for triterpenoid saponin biosynthesis. BMC Plant Biology* 20: 214.
43. Chung IM, Rekha K, Rajakumar G, Thiruvengadam M (2017). *Jasmonic and salicylic acids enhanced phytochemical production and biological activities in cell suspension cultures of spine gourd (Momordica dioica Roxb). Acta Biologica Hungarica* 68(1): 88-100.
44. Dai N, Zhao F-f, Fang M, Pu F-l, Kong L-y, Liu J-p (2022). *Gynostemma pentaphyllum for dyslipidemia: A systematic review of randomized controlled trials. Front Pharmacol* 13.
45. Datta S (2019). *Callus and Cell Suspension Culture. Presentation - Plant Biotechnology*.
46. Dunn C, Brette D, Cockroft M, Keating E, Revie C, Treanor DJDP (2024). *Quantitative assessment of H&E staining for pathology: development and clinical evaluation of a novel system. 19(1): 42.*
47. Elbouzidi A, Taibi M, Baraich A, Haddou M, Mothana RA, Alsufyani SA, Darwish HW, Molinié R, Fontaine J-X, Fliniaux O, Mesnard F, Addi M (2025). *Elicitor-driven enhancement of phenolic compounds in geranium callus cultures: phytochemical profiling via LC-MS/MS and biological activities. 13.*
48. Ellard-Ivey M, Douglas CJ (1996). *Role of jasmonates in the elicitor- and wound-Inducible expression of defense genes in parsley and transgenic tobacco. Plant Physiology* 112(1): 183-192.
49. Frankfater CR, Dowd MK, Triplett BA (2009). *Effect of elicitors on the production of gossypol and methylated gossypol in cotton hairy roots. Plant Cell Tissue Organism Culture* 98: 341-349.
50. Gao Y, Wang C, Wang K, He C, Hu K, Liang MJSbirm (2022). *The effects and molecular mechanism of heat stress on spermatogenesis and the mitigation measures. 68(5-6): 331-347.*
51. Gavel Y, von Heijne G (1990). *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. Protein Eng* 3(5): 433-442.

52. Ghasemi M, Liang S, Luu QM, Kempson I (2023). The MTT assay: a method for error minimization and interpretation in measuring cytotoxicity and estimating cell viability. Pages 15-33. *Cell viability assays: Methods and protocols*, Springer.
53. Goel NG, Sirohi SK, Dwivedi J (2012). *Estimation of total saponins and evaluate their effect on in vitro methanogenesis and rumen fermentation pattern in wheat straw based diet. Journal of Advanced Veterinary Research* 2: 120-126.
54. Gorret N, bin Rosli SK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha C, Sinskey AJ (2004). *Bioreactor culture of oil palm (Elaeis guineensis) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. Journal of Biotechnology* 108(3): 253-263.
55. Guo H, Li R, Liu S, Zhao N, Han S, Lu M, Liu X, Xia X (2016). *Molecular characterization, expression, and regulation of Gynostemma pentaphyllum squalene epoxidase gene 1. Plant Physiology and Biochemistry* 109: 230-239.
56. Guo Y, Zhang Z (2005). *Establishment and plant regeneration of somatic embryogenic cell suspension cultures of the Zingiber officinale Rosc. Scientia Horticulturae* 107(1): 90-96.
57. Gurung P, Yetiskul E, Jialal I (2021). *Physiology, Male Reproductive System. StatPearls. Treasure Island (FL).*
58. Haida Z, Syahida A, Ariff SM, Maziah M, Hakiman M (2019). *Factors affecting cell biomass and flavonoid production of Ficus deltoidea var. kunstleri in cell suspension culture system. Scientific Reports* 9(1): 9533.
59. Halder M, Sarkar S, Jha S (2019). *Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. Engineering in Life Sciences* 19(12): 880-895.
60. Han JY, Hwang HS, Choi SW, Kim HJ, Choi YE (2012). *Cytochrome P450 CYP716A53v2 catalyzes the formation of protopanaxatriol from protopanaxadiol during ginsenoside biosynthesis in Panax ginseng. Plant Cell Physiol* 53(9): 1535-1545.
61. Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE (2002). *Biosynthesis of Triterpenoid Saponins in Plants. Pages 31-49 in Dutta NN, et al., eds. History and Trends in Bioprocessing and Biotransformation. Berlin, Heidelberg: Springer.*
62. Hiai S, Oura H, Nakajima T (1976). *Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. Planta Medica* 29(2): 116-122.
63. Hidalgo D, Steinmetz V, Brossat M, Tournier-Couturier L, Cusido Rosa M, Corchete P, Palazon J (2017). *An optimized biotechnological system for the production of centellosides based on elicitation and bioconversion of Centella asiatica cell cultures. Engineering in Life Sciences* 17(4): 413-419.
64. Hu Y, Ip FCF, Fu G, Pang H, Ye W, Ip NY (2010). *Dammarane saponins from Gynostemma pentaphyllum. Phytochemistry* 71(10): 1149-1157.
65. Huang D, Ming R, Xu S, Wang J, Yao S, Li L, Huang R, Tan Y (2021). *Chromosome-level genome assembly of Gynostemma pentaphyllum provides insights into gypenoside biosynthesis. DNA Research* 28(5): dsab018.

66. Huang P, Xia L, Zhou L, Liu W, Wang P, Qing Z, Zeng J (2021). *Influence of different elicitors on BIA production in Macleaya cordata*. *Scientific Reports* 11(1): 1-7.
67. Huang WY, Cai YZ, Zhang Y (2010). *Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention*. *Nutrition and Cancer* 62(1): 1-20.
68. Hussain SS, Zhang F, Zhang Y, Thakur K, Naudhani M, Cespedes-Acuña CL, Wei Z (2020). *Stevenleaf from Gynostemma pentaphyllum inhibits human hepatoma cell (HepG2) through cell cycle arrest and apoptotic induction*. *Food Science and Human Wellness* 9(3): 295-303.
69. Huy ND, Ha DTT, Khoo KS, Lan PTN, Quang HT, Loc NH, Park S-M, Veeramuthu A, Show PL (2020). *Synthetic dyes removal by Fusarium oxysporum HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation*. *Environmental Technology & Innovation* 19: 101027.
70. Ilczuk A, Jagiełło-Kubiec K, Jacygrad E (2013). *The effect of carbon source in culture medium on micropropagation of common ninebark (Physocarpus opulifolius (L.) Maxim.) 'Diable D' or'*. *Acta Scientiarum Polonorum - Hortorum Cultus* 12(3): 23-33.
71. Isah T (2019). *Stress and defense responses in plant secondary metabolites production*. *Biological Research* 52: 1-25.
72. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015). *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. *Nature Protocols* 10(6): 845-858.
73. Kim MH, Won JA, Yu JS, Kim SM, Lee DK, Piao X-L, Yoo HHJP (2025). *Therapeutic Potential of Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino Against COVID-19 Identified Through Network Pharmacology*. 18(12): 1851.
74. Kim OT, Bang KH, Kim YC, Hyun DY, Kim MY, Cha SW (2009). *Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 98(1): 25-33.
75. Kim YS, Cho JH, Park S, Han J-Y, Back K, Choi Y-E (2011). *Gene regulation patterns in triterpene biosynthetic pathway driven by overexpression of squalene synthase and methyl jasmonate elicitation in Bupleurum falcatum*. *Planta* 233(2): 343-355.
76. Ko S-HJN (2024). *Effects of heat stress-induced sex hormone dysregulation on reproduction and growth in male adolescents and beneficial foods*. 16(17): 3032.
77. Kopalli SR, Cha KM, Hwang SY, Jeong MS, Kim SK (2019). *Korean Red Ginseng (Panax ginseng Meyer) with enriched Rg3 ameliorates chronic intermittent heat stress-induced testicular damage in rats via multifunctional approach*. *J Ginseng Res* 43(1): 135-142.
78. Kozłowski Lukasz P (2021). *IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants*. *Nucleic Acids Research* 49(W1): W285-W292.

79. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL (2001). *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. J Mol Biol* 305(3): 567-580.
80. Kukreja S, Selwal N, Goutam U (2025). From Defense to Production: The Role of Elicitors in Enhancing Plant-Derived Secondary Metabolites for Commercial Use. Pages 37-56. *Elicitation Methods for Improvement in Plant Secondary Metabolites*, Springer.
81. Kuwahara Y, Nakajima D, Shinpo S, Nakamura M, Kawano N, Kawahara N, Yamazaki M, Saito K, Suzuki H, Hirakawa H (2019). *Identification of potential genes involved in triterpenoid saponins biosynthesis in Gleditsia sinensis by transcriptome and metabolome analyses. Journal of Natural Medicines* 73(2): 369-380.
82. Kwan LS, Tan SY, Hirata Y, Chan LK, Nagaoka Y, Uesato S, Boey PL (2021). *Biotic elicitation at different feeding time in cell suspension cultures of Eurycoma longifolia Jack, a valuable medicinal plant, for enhancement of cytotoxic activity of bioactive compounds against human colon cancer cell line. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.*
83. Khalafalla MMJPJoES (2025). *Plant cell suspension culture for plant secondary metabolite production: Current status, constraints, and future solutions.*
84. Khalef L, Lydia R, Filicia K, Moussa BJCb, function (2024). *Cell viability and cytotoxicity assays: Biochemical elements and cellular compartments.* 42(3): e4007.
85. Langlois-Meurinne M, Gachon CMM, Saindrenan P (2005). *Pathogen-responsive expression of glycosyltransferase genes UGT73B3 and UGT73B5 Is necessary for resistance to Pseudomonas syringae pv tomato in Arabidopsis. Plant Physiology* 139(4): 1890-1901.
86. Lavanya SN, Niranjana-Raj S, Jadimurthy R, Sudarsan S, Srivastava R, Tarasatyavati C, Rajashekara H, Gupta VK, Nayaka SCJSR (2022). *Immunity elicitors for induced resistance against the downy mildew pathogen in pearl millet.* 12(1): 4078.
87. Le KC, Im WT, Paek KY, Park SY (2018). *Biotic elicitation of ginsenoside metabolism of mutant adventitious root culture in Panax ginseng. Applied Microbiology and Biotechnology* 102(4): 1687-1697.
88. Lee JK, Eom SH, Hyun TK (2018). *Enhanced biosynthesis of saponins by coronatine in cell suspension culture of Kalopanax septemlobus. 3 Biotech* 8(1): 59.
89. Lee YZ, Kow ASF, Lee QL, Lim LWC, Yusof R, Tham CL, Ho Y-C, Lee MTJN-SsAoP (2025). *Antidiabetic potentials of gypenosides: A review on the preclinical effects in glucose and insulin modulation as well as diabetes-related complications.* 1-17.
90. León J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001). *Wound signalling in plants. Journal of Experimental Botany* 52(354): 1-9.

91. Letunic I, Khedkar S, Bork P (2021). *SMART: recent updates, new developments and status in 2020. Nucleic Acids Research* 49(D1): D458-D460.
92. Li G, Yang G, Chen X-j, Lu P-x, Liang H-z, Wang M-y, Zhang J, Guo B-l, Ma B-pJNPR (2024). *Eight new dammarane-type triterpenoid saponins from Gynostemma pentaphyllum*. 1-9.
93. Li H, Chen N, Zhang H, Xu D (2025). *Multidimensional regulation of transcription factors: decoding the comprehensive signals of plant secondary metabolism. Frontiers in plant science* 16.
94. Li R, Du K, Zhang C, Shen X, Yun L, Wang S, Li Z, Sun Z, Wei J, Li Y (2024). *Single-cell transcriptome profiling reveals the spatiotemporal distribution of triterpenoid saponin biosynthesis and transposable element activity in Gynostemma pentaphyllum shoot apices and leaves. Frontiers in plant science* 15: 1394587.
95. Li X-C, Li F-F, Pei W-J, Yang J, Gu Y-L, Piao X-LJM (2023). *The content and principle of the rare ginsenosides produced from Gynostemma pentaphyllum after heat treatment*. 28(17): 6415.
96. Li Y, Li J, Diao M, Peng L, Huang S, Xie NJAsb (2022). *Characterization of a group of UDP-glycosyltransferases involved in the biosynthesis of triterpenoid saponins of Panax notoginseng*. 11(2): 770-779.
97. Li Y, Lin W, Huang J, Xie Y, Ma W (2016). *Anti-cancer effects of Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (Jiaogulan). Chinese medicine* 11: 43-43.
98. Liang C, Liu Z, Liu X, Geng Y, Song H, Ding S, Lei X, Feng Z, Liu J, Deng Y (2014). *The extract optimization and identification study of bioactive total triterpenoids from the rare traditional Chinese medicine Qinling Polyporusum bellatus. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 6(6): 1283-1289.
99. Liang T, Zou L, Sun S, Kuang X, Wei J, Wang L, Li Y, Sun C (2019). *Hybrid sequencing of the Gynostemma pentaphyllum transcriptome provides new insights into gypenoside biosynthesis. BMC Genomics* 20(1): 632.
100. Lin H, Chen W, Ding H (2013). *AcalPred: a sequence-based tool for discriminating between acidic and alkaline enzymes. PLoS One* 8(10): e75726.
101. Liu Z, Zhu X, Mohsin A, Yin Z, Zhuang Y, Zhou B, Du L, Yin X, Liu N, Wang ZJIC, Products (2022). *Embryogenic callus induction, cell suspension culture, and spectrum-effect relationship between antioxidant activity and polyphenols composition of Siraitia grosvenorii cultured cells*. 176: 114380.
102. Loc NH, Anh NHT, Binh DHN, Yang MS, Kim TG (2010). *Production of glycoalkaloids from callus cultures of Solanum hainanense Hance. Plant Biotechnology Journal* 37: 96-101.
103. Loc NH, Giang NT, Huy ND (2016). *Effect of salicylic acid on expression level of genes related with isoprenoid pathway in centella (Centella asiatica (L.) Urban) cells. 3 Biotech* 6(1): 86-93.
104. Loc NH, Giang NT, Huy ND, Lan TTP (2017). *Accumulation of madecassoside - A major component of centelloside - in centella (Centella*

- asiatica* (L.) Urban) cells elicited by salicylic acid. *Periodicum Biologorum* 119: 81–85.
105. Loc NH, Nhat NTD (2013). *Production of asiaticoside from centella (Centella asiatica L. Urban) cells in bioreactor. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(10): 806-810.
 106. Loc NH, Thanh LTH (2011). *Solasodine production from cell culture of Solanum hainanense Hance. Biotechnology and Bioprocess Engineering* 16(3): 581-586.
 107. Lv N, Wang L, Zeng M, Wang Y, Yu B, Zeng W, Jiang X, Suo YJPR (2024). *Saponins as therapeutic candidates for atherosclerosis*. 38(3): 1651-1680.
 108. Malabadi RB, Chalannavar RK, Kolkar KPJWJoAET, Sciences (2025). *Plant cell totipotency: Plant tissue culture applications-An updated review*. 16(02): 112-135.
 109. Maqsood M, Abdul M (2017). *Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in Catharanthus roseus. Revista Brasileira de Farmacognosia* 27(5): 549-556.
 110. Mazlumoğlu BŞJIJoP (2023). *In vitro cytotoxicity test methods: MTT and NRU*. 3(2): 50-53.
 111. Mello MO, Dias CTS, Amaral AFC, Melo M (2001). *Growth of Bauhinia forficata Link, Curcuma zedoaria Roscoe and Phaseolus vulgaris L. cell suspension cultures with carbon sources. Scientia Agricola* 58: 481-485.
 112. Misawa M (1994). *Plant tissue culture: An alternative for production of useful metabolite. FAO Agricultural Services Bulletin*.
 113. Mo GY, Huang F, Fang Y, Han LT, Pennerman KK, Bu LJ, Du XW, Bennett JW, Yin GH (2019). *Transcriptomic analysis in Anemone flaccida rhizomes reveals ancillary pathway for triterpene saponins biosynthesis and differential responsiveness to phytohormones. Chinese Journal of Natural Medicines* 17(2): 131-144.
 114. Mulabagal V. THS (2004). *Plant cell cultures- an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. International Journal of Applied Science and Engineering* 2: 29-48.
 115. Murashige T, Skoog F (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
 116. Naik PM, Al-Khayri JM (2016). *Abiotic and Biotic Elicitors–Role in Secondary Metabolites Production through In vitro Culture of Medicinal Plants in Shanker AK, Shanker C, eds. Abiotic and Biotic Stress in Plants - Recent Advances and Future Perspectives, IntechOpen*.
 117. Nakagawa K, Konagai A, Fukui H, Tabata M (1984). *Release and crystallization of berberine in the liquid medium of Thalictrum minus cell suspension cultures. Plant Cell Reports* 3(6): 254-257.
 118. Namdeo AG (2007). *Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. Pharmacognosy Reviews* 1(1): 69-79.

119. Ncube B, Van Staden J (2015). *Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit*. *Molecules* 20(7): 12698-12731.
120. Nopo-Olazabal C, Condori J, Nopo-Olazabal L, Medina-Bolivar F (2014). *Differential induction of antioxidant stilbenoids in hairy roots of Vitis rotundifolia treated with methyl jasmonate and hydrogen peroxide*. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 50-69.
121. Nyanasaigran L, Ramasamy S, Gautam A, Guleria P, Kumar V, Yaacob JSJIC, Products (2024). *Methyl jasmonate elicitation improves the growth performance and biosynthesis of antioxidant metabolites in Portulaca oleracea through ROS modulation*. 216: 118709.
122. Nguyen-Thanh T, Dang-Ngoc S, Tran-Quoc D, Hoang-Tan Q (2023). *Gypenosides production and spermatogenesis recovery potentials of extracts from cell Suspension cultures of Gynostemma pentaphyllum*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 15(4): 216-222.
123. Nhan NH, Loc NH (2018). *Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (Eurycoma longifolia) by elicitor treatment*. *J Plant Biotechnol* 45(4): 340-346.
124. Park TW, Arasu VM, Al-Dhabi AN, Yeo KS, Jeon J, Park SJ, Lee YS, Park US (2016). *Yeast extract and silver nitrate induce the expression of phenylpropanoid biosynthetic genes and induce the accumulation of rosmarinic acid in Agastache rugosa cell culture*. *Molecules* 21(4): 426.
125. Parween G, Akram S, Singh T, Saema S, Khatoon K, Rahman LU (2025). *Advances in Elicitor-Mediated Secondary Metabolite Production in Plant Cell Suspensions: Factors and Mechanisms*. Pages 57-83. *Elicitation Methods for Improvement in Plant Secondary Metabolites*, Springer.
126. Pasternak TP, Steinmacher DJP (2024). *Plant growth regulation in cell and tissue culture in vitro*. 13(2): 327.
127. Qi X, Li K, Chen L, Zhang Y, Zhang N, Gao W, Li Y, Liu X, Fan ZJJoMS (2022). *Plant defense responses to a novel plant elicitor candidate LY5-24-2*. 23(10): 5348.
128. Qu JG, Zhang W, Hu QL, Jin MF (2006). *Impact of subculture cycles and inoculum sizes on suspension cultures of Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology* 22(6): 984-989.
129. Raghavendra S, Ramesh CK, Kumar V, Moinuddin Khan MH (2011). *Elicitors and precursor induced effect on L-Dopa production in suspension cultures of Mucuna pruriens L*. *Front. Life Sci.* 5(3-4): 127-133.
130. Rahimi S, Devi BSR, Khorolragchaa A, Kim YJ, Kim JH, Jung SK, Yang DC (2014). *Effect of salicylic acid and yeast extract on the accumulation of jasmonic acid and sesquiterpenoids in Panax ginseng adventitious roots*. *Russian Journal of Plant Physiology* 61(6): 811-817.
131. Rao B, Kumar V, Amrutha N, Jalaja N, Vaidyanath K, Rao A, Polavarap S, Kishor P (2008). *Effect of growth regulators, carbon source and cell aggregate*

- size on berberine production from cell cultures of *Tinospora cordifolia* Miers. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2(2): 269-276.
132. Rao SR, Ravishankar GA (2002). *Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites*. *Biotechnol Adv* 20: 101-153.
 133. Robinson BR, Netherton JK, Ogle RA, Baker MAJBR (2023). *Testicular heat stress, a historical perspective and two postulates for why male germ cells are heat sensitive*. 98(2): 603-622.
 134. Sák M, Dokupilová I, Kaňuková Š, Mrkvová M, Mihálik D, Hauptvogel P, Kraic J (2021). *Biotic and abiotic elicitors of stilbenes production in Vitis vinifera L. cell culture*. *Plants* 10(3): 490.
 135. Salehi M, Moieni A, Safaie N, Farhadi S (2019). *Elicitors derived from endophytic fungi Chaetomium globosum and Paraconiothyrium brasiliense enhance paclitaxel production in Corylus avellana cell suspension culture*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 136(1): 161-171.
 136. Sawai S, Saito K (2011). *Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants*. *Frontiers in plant science* 2: 25.
 137. Schicht G, Seidemann L, Haensel R, Seehofer D, Damm GJC (2022). *Critical investigation of the usability of hepatoma cell lines HepG2 and Huh7 as models for the metabolic representation of resectable hepatocellular carcinoma*. 14(17): 4227.
 138. Shahat AM, Rizzoto G, Kastelic JP (2020). *Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality*. *Theriogenology* 158: 84-96.
 139. Shahneh FZ, Valiyari S, Azadmehr A, Hajiaghache R, Yaripour S, Bandehagh A, Baradaran B (2013). *Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by Echinophora platyloba DC: In vitro Analysis*. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences* 2013: 512931.
 140. Shakil MS, Rana Z, Hanif M, Rosengren RJJA-cd (2022). *Key considerations when using the sulforhodamine B assay for screening novel anticancer agents*. 33(1): 6-10.
 141. Sharma M, Sharma A, Ashwani K, Kumar BS (2011). *Enhancement of secondary metabolites in cultured plant cells through stress stimulus*. *American Journal of Plant Physiology* 6(2): 50-71.
 142. Sheper T (2001). *Advances in biochemical engineering biotechnology-plant cell*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
 143. Shi G, Wang X, Zhang H, Zhang X, Zhao Y (2018). *New dammarane-type triterpene saponins from Gynostemma pentaphyllum and their anti-hepatic fibrosis activities in vitro*. *Journal of Functional Foods* 45: 10-14.
 144. Shilpa P, Indu B, Subbalakshmi G, Balasubramanya S, Anuradha M (2025). *Elicitation*. Pages 257-272. In *Vitro Production of Plant Secondary Metabolites: Theory and Practice*, Springer.
 145. Simon C, Langlois-Meurinne M, Didierlaurent L, Chaouch S, Bellvert F, Massoud K, Garmier M, Thareau V, Comte G, Noctor G, Saindrenan P (2014). *The secondary metabolism glycosyltransferases UGT73B3 and UGT73B5 are*

- components of redox status in resistance of Arabidopsis to Pseudomonas syringae pv. tomato. Plant Cell Environ* 37(5): 1114-1129.
146. Smith SJ, Lopresti AL, Teo SYM, Fairchild TJ (2021). *Examining the Effects of Herbs on Testosterone Concentrations in Men: A Systematic Review. Adv Nutr* 12(3): 744-765.
 147. Stracke R, Ishihara H, Huep G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K, Weisshaar B (2007). *Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. The Plant Journal* 50(4): 660-677.
 148. Tai WC, Wong WY, Lee MM, Chan BD, Lu C, Hsiao WL (2016). *Mechanistic study of the anti-cancer effect of Gynostemma pentaphyllum saponins in the Apc(Min/+) mouse model. Proteomics* 16(10): 1557-1569.
 149. Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021). *MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. Molecular Biology and Evolution* 38: 3022-3027.
 150. Tung NT, Phuoc DV, Thuan DC, Tam LM, Quoc Huy NV (2020). *Assessment of testis histopathological changes and spermatogenesis in male mice exposed to chronic scrotal heat stress. Journal of Animal Behaviour and Biometeorology* 8: 174-180.
 151. Thakkar AB, Sargara P, Subramanian RB, Thakkar VR, Thakor PJPB (2022). *Induction of apoptosis in lung carcinoma cells (A549) by hydromethanolic extract of Acorus calamus L. 123: 1-10.*
 152. Utama-Ang N, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Lerdvuthisopon N, Suwonsichon T, Wood K, Watkins B (2006). *Identification of major saponins from jiaogulan extract (Gynostemma pentaphyllum). Kasetsart Journal - Natural Science* 40: 59-66.
 153. Vajrabhaya L-o, Korsuwannawong S (2018). *Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays. Journal of Analytical Science and Technology* 9(1): 15.
 154. Veerashree V, Anuradha CM, Vadlapudi K (2012). *Elicitor-enhanced production of gymnemic acid in cell suspension cultures of Gymnema sylvestre R. Br. Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108: 27-35.
 155. Vijaya SN, Aswani KY, Ravi BB, Phani KY, Vijay VM (2010). *Advancements in the production of secondary metabolites. Journal of Natural Products* 3: 112-123.
 156. Wang J, Gao W, Zuo B, Zhang L, Huang L (2013). *Effect of methyl jasmonate on the ginsenoside content of Panax ginseng adventitious root cultures and on the genes involved in triterpene biosynthesis. Research on Chemical Intermediates* 39(5): 1973-1980.
 157. Wang T, Tian XR, Wu XY, Luo Z, Li G, Peng XL, Liu SB (2018). *Effect of light quality on total gypenosides accumulation and related key enzyme gene expression in Gynostemma pentaphyllum. Chinese Herbal Medicines* 10(1): 34-39.

158. Wang TX, Shi MM, Jiang JG (2018). *Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and antioxidant compounds from Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino*. *RSC Advances* 8(41): 23181-23190.
159. Wang X, Deng Y, Wang J, Qin L, Du Y, Zhang Q, Wu D, Wu X, Xie J, He YJJoEI, Chemistry M (2024). *New natural protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from Gynostemma pentaphyllum*. 39(1): 2360063.
160. Wasternack C (2007). *Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development*. *Ann Bot* 100(4): 681-697.
161. Wu Q, Jang M, Piao XL (2014). *Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed Gynostemma pentaphyllum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78(2): 311-316.
162. Xing SF, Liu LH, Zu ML, Lin M, Zhai XF, Piao XL (2019). *Inhibitory Effect of Damulin B from Gynostemma pentaphyllum on Human Lung Cancer Cells*. *Planta Medica* 85(5): 394-405.
163. Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT (2004). *On the origins of triterpenoid skeletal diversity*. *Phytochemistry* 65(3): 261-291.
164. Xu R, Zhang J, You J, Gao L, Li Y, Zhang S, Zhu W, Shu S, Xiong C, Xiong H, Chen P, Guo J, Liu Z (2020). *Full-length transcriptome sequencing and modular organization analysis of oleanolic acid- and dammarane-type saponins related gene expression patterns in Panax japonicus*. *Genomics* 112(6): 4137-4147.
165. Yan H, Wang X, Niu J, Wang Y, Wang P, Liu Q (2014). *Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells*. *PLoS One* 9(4): e95609.
166. Yanzi L, Peng L, Yan Z, Kangkang J, Meng D, Zhiyuan H, Yunlin Z, Guiyan Y, Zhenggang XJC-joF (2022). *Utilization of Gynostemma pentaphyllum and Houttuynia cordata medicinal plants to make Jiaosu: a healthy food*. 20(1): 143-148.
167. Ye S, Feng L, Zhang S, Lu Y, Xiang G, Nian B, Wang Q, Zhang S, Song W, Yang L (2022). *Integrated metabolomic and transcriptomic analysis and identification of dammarenediol-II synthase involved in saponin biosynthesis in Gynostemma longipes*. *Frontiers in plant science* 13: 852377.
168. Yue L, Yating Y, Hanghang W, Han L, Qi L, Xiachang W, Dalei W, Lihong HJCJoNM (2023). *Dammarane-type triterpenoid saponins isolated from Gynostemma pentaphyllum ameliorate liver fibrosis via agonizing PP2Ca and inhibiting deposition of extracellular matrix*. 21(8): 599-609.
169. Yue W, Ming QL, Lin B, Rahman K, Cheng Z, Han T, Qin LP (2014). *Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites*. *Critical reviews in biotechnology* 36: 1-18.

170. Zahra FAAJIJoSC, Medicine (2023). *An Ultrastructural analysis of the HuH7 Hepatocellular carcinoma cell line's response to conditioned and co-culture media*. 2(2).
171. Zhang CH, Mei XG, Liu L, Yu LJ (2000). *Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters* 22: 1561-1564.
172. Zhang L, Zhu Q, Tan Y, Deng M, Zhang L, Cao Y, Guo XJTPC (2024). *Mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 phosphorylate receptor-like cytoplasmic kinase CDL1 to regulate soybean basal immunity*. 36(4): 963-986.
173. Zhang Y, Chen Q, Huang Y, Zhao R, Sun J, Yuan X, Xu H, Liu H, Wu Y (2021). *Gene excavation and expression analysis of CYP and UGT related to the post modifying stage of gypenoside biosynthesis in Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino by comprehensive analysis of RNA and proteome sequencing*. *PLoS One* 16(12): e0260027.
174. Zhang Z, Zhang W, Ji YP, Zhao Y, Wang CG, Hu JF (2010). *Gynostemosides A–E, megastigmane glycosides from Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry* 71(5): 693-700.
175. Zhao X, Ge W, Miao ZJSR (2024). *Integrative metabolomic and transcriptomic analyses reveals the accumulation patterns of key metabolites associated with flavonoids and terpenoids of Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino*. 14(1): 8644.
176. Zhen-xing W, Jin-mei Y, Zhi-bin Z, Xiao-tian Z, Ping X, Jian S, Xia-hong HJJoSA (2023). *Chemical constituents and biological activity of Gynostemma pentaphyllum: A review*. 54(6): 1741-1752.