

ĐẠI HỌC HUẾ
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC
---o0o---

ĐẶNG NGỌC SÁNG

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

Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

Công trình được hoàn thành tại: Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế

Người hướng dẫn khoa học: TS. Hoàng Tấn Quảng
PGS.TS. Trần Quốc Dung

Phản biện 1:

.....
.....
.....

Phản biện 2:

.....
.....
.....

Phản biện 3:

.....
.....
.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế, họp tại cơ quan Đại học Huế, vào hồi ... giờ... ngày... tháng... năm...

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

1. Thư viện quốc gia Việt Nam.
2. Trung tâm học liệu Đại học Huế.
3. Thư viện Viện Công nghệ Sinh học, Đại học Huế.

DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

[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 giao 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 giao 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

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. 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. Ở thực vật bậc cao, các triterpen saponin là những hợp chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm isoprenoid. So với *Panax ginseng*, 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.

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. 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. 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, ... Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giảo cổ lam như Jala và cs (2012) hay Ao và cs (1998), 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

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

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu: Cây Giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

Phạm vi nghiên cứu

- Phạm vi thời gian: từ tháng 3/2021 đến tháng 9/2025.
- Phạm vi đối tượng: tế bào huyền phù các gypenoside cây giảo cổ lam, các dòng tế bào ung thư, tinh hoàn chuột.
- Phạm vi không gian: Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế; Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế; Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn Lâm khoa học Việt Nam.

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 gen tham gia vào chu trình sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào huyền phù, khả năng kháng tế bào ung thư của gypenoside.

Ý nghĩa thực tiễn: Làm nguồn thông tin, tài liệu tham khảo giá trị cho việc ứng dụng kỹ thuật nuôi cấy huyền phù tế bào, phân tích biểu hiện gen, đánh giá hoạt tính của gypenoside trên các dòng tế bào ung thư.

6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

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.

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.

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.

Đánh giá được khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột của cao chiết tế bào cây Giảo cổ lam. Cao chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam có khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn, tăng khả năng sinh tinh và nồng độ testosterone trong máu chuột xử lý nhiệt.

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

- **Đối tượng nghiên cứu:** Cây Giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino)

Vật liệu nghiên cứu:

- Tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam
- Gypenoside có nguồn gốc từ tế bào huyền phù
- Các dòng tế bào ung thư gan (HepG2, Huh7), ung thư phổi (A549), và tế bào ung thư bạch cầu (HL-60).

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nuôi cấy callus

Callus được nuôi cấy duy trì trên môi trường MS cơ bản có chứa 3% đường sucrose, 0,8% agar, bổ sung 2,0 mg/L kinetin (KIN) và 0,5 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), pH 5,8.

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 lỏng có thành phần giống như môi trường nuôi cấy callus tốt nhất (không có agar). Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy để xác định khối lượng tươi và khối lượng khô.

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 80% có sử dụng siêu âm ở 40°C.

Xác định hàm lượng gypenoside: Hàm lượng gypenoside được xác định bằng phản ứng màu với vanillin. Phản ứng so màu được thực hiện trên máy quang phổ ở bước sóng 544 nm.

Xác định hàm lượng Rb1: HPLC được thực hiện trên hệ thống Alliance E2695 với cột Symmetry®C18 (4,6 mm × 250 mm × 5 mm). Pha động bao gồm nước và acetonitrile (34%) trong thời gian 20 phút, nhiệt độ chạy 30°C, tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích chạy 20 µL.

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

- Chất điều hòa sinh trưởng: phối hợp giữa cytokinin (BAP và KIN) và auxin (IBA)
- Nguồn carbon: sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose và glycerol
- Cỡ mẫu: các cỡ mẫu ban đầu khác nhau từ 4-8%

- Tốc độ lắc: tốc độ lắc khác nhau (100, 120 và 150 vòng/phút).

2.2.2.4. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor

Hệ hồng LiFlux GX (Hanil, Hàn Quốc), thể tích nuôi cấy 6 lít, tỷ lệ tiếp giống 10% (v/v), tốc độ khuấy 150 vòng/phút, các thông số khác được cài đặt mặc định.

2.2.3. Xử lý elicitor

2.2.3.1. Chuẩn bị elicitor

Các elicitor bao gồm MeJA, SA, YE và sinh khối nấm *Fusarium* (Fox) được sử dụng cho nghiên cứu này.

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 vào môi trường với các nồng độ khác nhau tại thời điểm bắt đầu nuôi cấy. Trong đó, MeJA và SA có nồng độ từ 25-200 μ M, 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

Elicitor được bổ sung vào môi trường ở thời điểm từ 3-15 ngày nuôi cấy. Đối chứng là công thức bổ sung elicitor tại thời điểm ban đầu.

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

2.2.4.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá cây *in vitro* bằng kit TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam). 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 cs (2021).

2.2.4.2. Phân tích trình tự gen 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.

2.2.4.3. Dự đoán đặc điểm và chức năng của enzyme

Đặc điểm và chức năng của enzyme đại diện cho 2 nhóm *CYP* và *UGT* được dự đoán bằng các công cụ tin sinh học.

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

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

RNA tổng số của tế bào được tách chiết bằng kit GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ). Phản ứng tổng hợp sợi cDNA thứ nhất bằng kit First Strand cDNA Synthesis (#K1612, Fermentas) theo hướng

dẫn của nhà sản xuất.

2.2.5.2. Phân tích realtime-PCR

Để đánh giá mức độ phiên mã của các gen *CYP* và *UGT*, chúng tôi tiến hành phản ứng realtime PCR với cặp mồi đặc hiệu của gen này, sử dụng nội đối chứng (control - house keeping gen) là 18sRNA.

2.2.6. Chuẩn bị chế phẩm gypenoside

2.2.6.1. Chuẩn bị cao chiết Giảo cổ lam

Sau khi tách chiết, dịch chiết được để bay hơi đến khối lượng không đổi, cao chiết được tái hòa tan đến các nồng độ nhất định.

2.2.6.2. Tinh chế gypenoside

Quy trình tách chiết được thực hiện theo theo Liang và cs (2014) có điều chỉnh phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

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

Phân tích độc tính tế bào bằng nhuộm Sulforhodamine B (SRB)

Phương pháp nhuộm sulforhodamine B được thực hiện theo Vajrabhaya và cs (2018).

Phân tích Tetrazolium (MTT)

Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên sự sinh trưởng và phát triển của tế bào ung thư bạch cầu HL-60 được xác định bằng phân tích MMT.

2.2.8. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột

Chuột được phân bố ngẫu nhiên: nhóm chứng 10 con chuột được xử lý với nhiệt độ 25°C, nhóm stress nhiệt 40°C (H40) gồm 10 con chuột được xử lý với nhiệt độ 40°C, nhóm stress nhiệt 40°C uống dịch chiết Giảo cổ lam tự nhiên 200 mg/kg (H40+N) và nhóm stress nhiệt 40°C uống dịch chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam 200 mg/kg (H40+CS).

Phương pháp xử lý stress 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.

Phương pháp xác định nồng độ testosterone

Huyết tương được dùng để xác định nồng độ testosterone bằng phương pháp ELISA sử dụng máy xét nghiệm miễn dịch tự động Cobas e411 (ROCHE).

Nhuộm Hematoxylin và Eosin (H&E)

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.

2.2.9. Xử lý thống kê

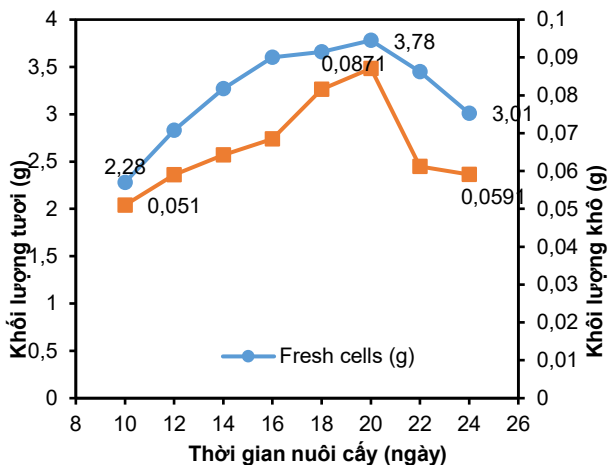
Các thí nghiệm nuôi cấy được bố trí ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test với $p < 0,05$ sử dụng phần mềm SPSS ver 20.0./.

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

Từ khi bắt đầu nuôi cấy đến giai đoạn 10 ngày, tế bào sinh trưởng rất ít, chỉ tăng từ 2 g lên 2,280 g. Sau đó, sinh khối tế bào tăng liên tục từ 10 ngày đến 20 ngày nuôi cấy, sinh khối cao nhất đạt 3,780 g tươi/bình, tương ứng với 0,087 g khô/bình với chỉ số sinh trưởng là 1,89 sau 20 ngày nuôi cấy (Hình 3.1). Sau khi đạt đỉnh, sinh khối tế bào giảm liên tục, đến ngày thứ 24 chỉ thu được 3,010 g tươi (0,059 g khô) với chỉ số sinh trưởng là 1,51.



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

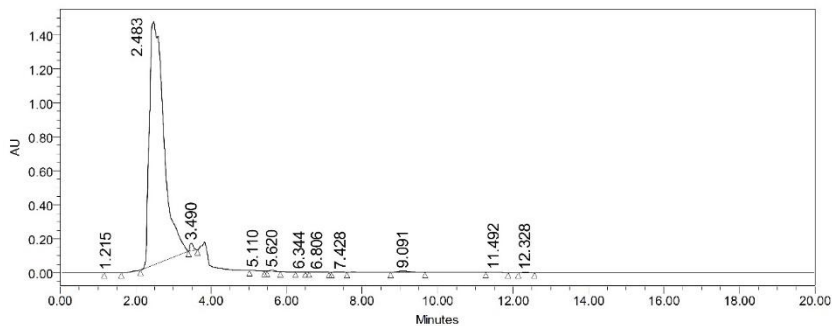
So với sinh trưởng của tế bào, sự tích lũy gypenoside trong tế bào Giảo cổ lam đạt cực đại sớm hơn từ 2-4 ngày. Khả năng tích lũy gypenoside

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 tổng số khoảng 2 ngày.

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

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

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



Hình 3.2. Phổ HPLC mẫu tế bào

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.

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 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.

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

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 (3,641 g tươi/bình) và tích lũy gypenoside của tế bào (39,845 mg gypenoside/ g khô), tiếp theo là glucose. Ở tất cả các nguồn carbon khác, tế bào đều sinh trưởng và tích lũy gypenoside không tốt bằng.

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 ^c	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

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

3.1.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

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 5,392 g/bình) và tích lũy gypenoside cao (46,498 mg/g khô).

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

3.1.3.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

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 (rpm)	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

3.1.4. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor

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 (1,341 - 1,792 g sinh khối khô); trong đó sinh khối đạt đỉnh ở ngày thứ 18.

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

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). 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 kích kháng.

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. Hàm lượng gypenoside tích lũy cao nhất khi 3 g/L YE được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (73,767 mg/g chất khô), cao gấp khoảng 1,46 lần so với đối chứng.

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

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 ^{bcd}	23,066 ^h	0,039 ^d

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

SA cho hiệu quả tốt nhất khi bổ sung vào môi trường từ ngày thứ 6, hàm lượng gypenoside thu được là 79,721 mg/g khô, cao gấp 1,58 lần so với đối chứng không xử lý elicitor, gấp 1,4 lần so với thân và 2 lần so với lá cây tự nhiên.

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 ^{bcde}	0,204 ^g	57,543 ^{hi}	0,035 ^k
9	MeJA	5,302 ^{bc}	0,244 ^b	73,901 ^{bc}	0,066 ^{de}
	SA	5,025 ^{cde}	0,178 ^j	73,558 ^{bc}	0,063 ^{ef}
	YE	5,137 ^{bcde}	0,209 ^f	54,163 ^{ij}	0,031 ^{ij}
12	MeJA	5,254 ^{bcd}	0,229 ^c	68,622 ^{de}	0,067 ^d
	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}
15	MeJA	5,018 ^{cde}	0,191 ^{hi}	60,814 ^{gh}	0,045 ^j
	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

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

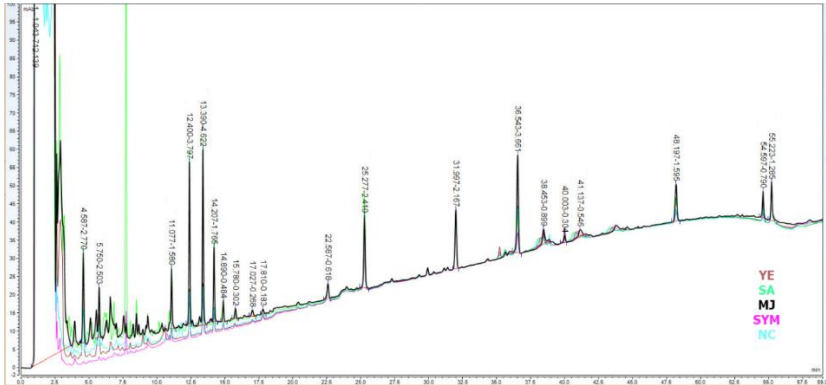
Công thức kết hợp tốt nhất (kết hợp cả 3 chất) cho lượng gypenoside đạt 103,810 mg/g khô, cao hơn khoảng 2,22 lần so với tế bào không được

xử lý elicitor và khoảng 2,78 lần so với mẫu tự nhiên.

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)	Gypenosi de (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

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 3.12). 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).



Hình 3.12. Phổ HPLC tế bào huyền phù giảo cổ lam

Bảng 3.11. Các peak gypenoside chính trong tế bào Giảo cổ lam

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

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

3.2.4.1. Phân lập và xác định đặc điểm của gen CYP và UGT

Kết quả thăm dò với cặp mồi đặc hiệu cho 12 gen theo mô tả của

Zhang và cs (2021) cho thấy có 4/7 gen CYP và 1/5 gen UGT có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu. Trong đó, gen *CYP89A2* và *UGT91A1* thể hiện sự khuếch đại mạnh nhất. Sản phẩm PCR gen *CYP89A2* (CpQN) tương đồng 99,17% với trình tự mRNA *CYP89A2* của cây giảo cổ lam (mã số MT416753), của gen *UGT91A1-QN* từ cây giảo cổ lam Quảng Nam chỉ tương đồng 92,55% so với trình tự tham chiếu (MN128698).

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

Kết quả dự đoán cho thấy protein CYP89A2 có cấu trúc tương đồng 26% với sugiol synthase của cây đàn sâm *Salvia miltiorrhiza* CYP76AH3. Enzyme UGT91A1-QN có cấu trúc tương đồng 40% với glycosyltransferase OsUGT91C1 (apo form) của *Oryza sativa* subsp. *japonica* (Bảng 3.12).

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

Đặc điểm	CYP89A2	UGT91A1-QN
Gen hoàn chỉnh (bp)	-	1.460
cDNA	1.521	1.383
Chuỗi polypeptide	506 aa	460 aa
Khối lượng phân tử (kDa)	58,44	52,786
Điểm đẳng điện (pI)	7,06	5,66
Tm	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

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

Đối với các gen CYP, trong tế bào huyền phù các gen *CYP71B19*, *CYP86A8*, *CYP89A2* và *CYP 94A1* phiên mã mạnh, trong khi các gen còn lại không được phiên mã hoặc phiên mã rất yếu. Gen *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 gen khác tăng mức độ phiên mã lên nhiều lần khi được xử lý với MeJa. Gen *CYP86A8* tăng 8,25 lần so với đối chứng, gen *CYP94A1* tăng 10,01 lần và gen *CYP89A2* tăng 11,14 lần (Bảng 3.13).

Đối với các gen UGT, trong tế bào huyền phù chỉ có gen *UGT73B4* phiên mã mạnh, trong khi các gen còn lại không được phiên mã (không phát hiện). Gen *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 gen CYP trong tế bào huyền phù

Gen	Mẫu xử lý	Giá trị Ct		Giá trị 2- $\Delta\Delta$ Ct
		GP-18S	Gen	
<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	-	-
<i>CYP86A8</i>	YE	26,30	30,53	0,22
	SA	28,79	30,90	0,96
	MJ	32,43	31,44	8,25
	SYM	22,23	31,37	0,01
	NC	28,94	30,99	1,00
<i>CYP89A2</i>	YE	26,30	35,01	0,10
	SA	28,79	37,28	0,11

	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 gen *UGT* trong tế bào huyền phù

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

<i>UGT91A1</i>	NC	28,94	35,11	1,00
	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	33,35	-	-
	NC	28,94	35,61	1,00
<i>UGT91C1</i>	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	34,72	1,00

3.3. THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH CỦA GYPENOSIDE TỪ TẾ BÀO HUỖN PHÙ

3.3.1. Sản xuất cao chiết và chế phẩm 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 huỷ 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 gypenoside

Để sản xuất chế phẩm gypenoside, tế bào Giảo cổ lam được nuôi cấy trong các bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường nuôi cấy (294

bình, chia làm 7 lần nuôi). Bổ sung elicitor phối hợp gồm MeJA (50 μ M), SA (100 μ M) và YE (3 g/L) vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy. Sinh khối khô sau khi chiết với methanol 80% thu được 11,13 g cao chiết. Cao chiết tiếp tục được tinh chế để thu được khoảng 5,2 g 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

3.3.3.1. 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

Cao chiết Giảo cổ lam cho thấy sự ức chế phụ thuộc vào nồng độ đối với sự tăng sinh tế bào A549. Tuy nhiên, khả năng ức chế đối với dòng tế bào A549 không mạnh.

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.

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 μ g/mL.

3.3.3.2. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào ung thư của gypenoside

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào A549

Hiệu quả ức chế ở nồng độ cao nhất (200 μ g/mL) là $83,37 \pm 5,04$ đối với mẫu tế bào và $33,76 \pm 2,70\%$ đối với mẫu tự nhiên.

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào HepG2 và Huh7

Thử nghiệm ở nồng độ 200 μ g/mL cho thấy hoạt tính ức chế cao nhất trong mẫu chiết tự nhiên ($42,30 \pm 3,37$ ở HepG2 và $42,17 \pm 2,03$ ở Huh7) cũng như trong mẫu huyền phù tế bào ($88,21 \pm 4,87$ ở HepG2 và $63,11 \pm 3,12$ 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 μ 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 μ g/mL trong cả mẫu tự nhiên ($37,80 \pm 3,81$) và mẫu tế bào ($96,35 \pm 3,48$).

Bảng 3.17. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư của 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	$119,30 \pm 5,45$

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

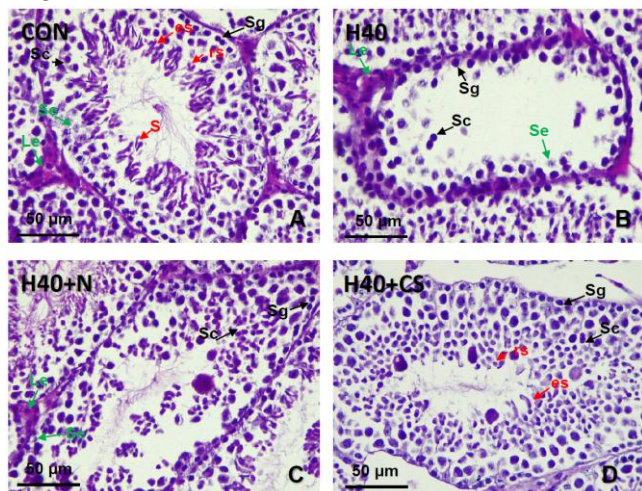
3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết

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

Dịch chiết từ tế bào Giao 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

ting trong lòng ống đã tăng lên đáng kể (Hình 3.21d).

Nhóm chuột xử lý nhiệt có uống dịch chiết giao cổ lam từ huyền phù tế bào có nồng độ testosterone trong máu là $3,19 \pm 2,65$ ng/mL, cao hơn so với nhóm chuột xử lý nhiệt có uống dịch chiết giao cổ lam từ cây tự nhiên là $1,57 \pm 0,89$ ng/mL.



Hình 3.21. Ảnh hưởng của dịch chiết Giao cổ lam lên cấu trúc vi thể ống sinh tinh ở mô tinh hoàn chuột.

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

Cao chiết của Giao 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.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

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 (IC₅₀ khoảng 86,7 µg/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 *Gynostemma pentaphyllum* 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.