

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 1 tháng 6 năm 2026

Tác giả

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'D' followed by a long horizontal stroke.

Đặng Ngọc Sáng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH.....	vii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT.....	viii
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	12
1.2.1. Nuôi cấy huyền phù tế bào thực vật	12
1.2.2. Sản xuất hợp chất thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào.....	14
1.2.3. Chiến lược trong sản xuất các sản phẩm thứ cấp bằng nuôi cấy tế bào	15
1.3. ELICITOR.....	16
1.3.1. Khái niệm.....	16
1.3.2. Phân loại.....	16
1.3.3. Cơ chế tác dụng của elicitor.....	18
1.3.4. Các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình kích kháng	19
1.3.5. Sản xuất hợp chất thứ cấp ở thực vật có bổ sung elicitor	20
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. Cảm ứng và nuôi cấy mô sẹo (callus).....	36
2.2.2. Nuôi cấy tế bào huyền phù	36
2.2.3. Xử lý elicitor	40
2.2.4. Xác định đặc điểm của một số gene CYP và UGT	41
2.2.5. Xác định mức độ phiên mã của các gene CYP và UGT.....	44
2.2.6. Phân tách hợp chất thứ cấp	46
2.2.7. Thử nghiệm khả năng ức chế tế bào ung thư.....	46
2.2.8. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột của cao chiết.....	48
2.2.9. Xử lý thống kê.....	50
2.2.10. Thiết bị, hóa chất.....	51
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	52
3.1. ẢNH HƯỞNG CỦA ĐIỀU KIỆN NUÔI CẤY LÊN QUÁ TRÌNH TÍCH LŨY GYPENOSIDE TRONG TẾ BÀO HUYỀN PHỤ	52
3.1.1. Xây dựng đường cong sinh trưởng và tích lũy gypenoside.....	52
3.1.2. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù.....	57
3.1.3. Ảnh hưởng của các điều kiện nuôi cấy lên tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù	61
3.1.4. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor 12 L	63
3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA ELICITOR TRONG TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG SẢN XUẤT GYPENOSIDE TỪ NUÔI CẤY HUYỀN PHỤ.....	65
3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside trong tế bào	66
3.2.2. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	69
3.2.3. Ảnh hưởng của sự phối hợp nhiều elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	73
3.2.4. Xác định mức độ biểu hiện của các gene CYP và UGT	76
3.3. THU NHẬN VÀ THỬ NGHIỆM HOẠT TÍNH CỦA CHẾ PHẨM CÓ CHỨA GYPENOSIDE TỪ TẾ BÀO HUYỀN PHỤ	85
3.3.1. Thu nhận cao chiết và chế phẩm có chứa gypenoside.....	85
3.3.2. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào ung thư.....	85
3.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ mô tinh hoàn chuột <i>in vivo</i> của chế phẩm cao chiết	92
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	95
NHỮNG CÔNG TRÌNH ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	97

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Phân loại elicitor trong sản xuất các hợp chất thứ cấp [43]	17
Bảng 2.1. Trình tự mỗi trong nhận diện các gene [134]	42
Bảng 2.2. Các môi được sử dụng để phân tích mức độ phiên mã	45
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên tích lũy gypenoside và Rb1	53
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của BAP hoặc KIN kết hợp với 0,5 mg/L IBA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	57
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	59
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của mật độ tiếp giống nuôi cấy lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	61
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của tốc độ lắc lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	63
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của MeJA và SA lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	67
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của YE và Fox lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	68
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào	69
Bảng 3.9. Ảnh hưởng của phối hợp các elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside	74
Bảng 3.10. Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm lý hóa của enzyme	81
Bảng 3.11. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư phổi người của cao chiết Giảo cổ lam	86
Bảng 3.12. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư của chế phẩm chứa gypenoside	89

DANH MỤC CÁC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Cây Giảo cổ lam 5 lá	7
Hình 1.2. Cấu trúc chung của gypenoside kiểu dammarane	9
Hình 1.3. Sơ đồ con đường sinh tổng hợp triterpen gypenoside	24
Hình 2.1. Callus thứ cấp cây Giảo cổ lam	34
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án	35
Hình 3.1. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù	52
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	54
Hình 3.3. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù nuôi cấy trong bioreactor 12 L	64
Hình 3.4. Nuôi cấy tế bào huyền phù Giảo cổ lam trong bioreactor 12 L	65
Hình 3.5. Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung elicitor	71
Hình 3.6. Sắc ký đồ HPLC tế bào huyền phù Giảo cổ lam	75
Hình 3.7. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự gene <i>CYP89A2</i>	79
Hình 3.8. Cây phát sinh loài dựa trên các trình tự gene <i>UGT91A1</i>	79
Hình 3.9. Dự đoán cấu trúc không gian của enzyme <i>CYP89A2</i> (trái) và <i>UGT91A1</i> (phải)	82
Hình 3.10. Dự đoán topo xuyên màng (2D) của <i>CYP89A2</i> (trên) và <i>UGT91A1</i> -QN (dưới) được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0	83
Hình 3.11. Vị trí các amino acid có thể glycosyl hóa của <i>CYP89A2</i>	83
Hình 3.12. Ảnh chụp khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư nuôi cấy bám dính của dịch chiết chứa gypenoside	91
Hình 3.13. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên cấu trúc vi thể ống sinh tinh ở mô tinh hoàn chuột.	92
Hình 3.14. Ảnh hưởng của cao chiết Giảo cổ lam lên nồng độ testosterone trong máu chuột xử lý nhiệt	93

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

2,4 D	: 2,4 - Dichlorophenoxyacetic acid
BAP	: 6-benzylaminopurine
<i>CYP</i>	: 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
LC - MS/MS: Sắc ký lỏng ghép nối khối phổ hai lần (hay khối phổ kép)	
IC ₅₀	: Nồng độ chất gây ra 50% mức ức chế đáp ứng sinh học
PgSS	: Gene sinh tổng hợp squalene ở nhân sâm (<i>Panax ginseng</i>)
PgSE	: Squalene - 2,3 – epoxidase ở nhân sâm (<i>Panax ginseng</i>)
LOD	: Giới hạn phát hiện
LOQ	: Giới hạn định lượng

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 cơ sở khoa học và phát triển quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) nhằm nâng cao hiệu quả sinh trưởng và sinh tổng hợp hoạt chất thứ cấp, phục vụ định hướng phát triển nguồn nguyên liệu 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 thời điểm xử lý elicitor thích hợp để thu được gypenoside từ tế bào huyền phù cao nhất.

Phân lập và đánh giá mức độ biểu hiện của một số gene tham gia con đường sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam dưới tác động của elicitor.

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. Trong toàn bộ luận án, tên gọi "Giảo cổ lam" được sử dụng thống nhất để chỉ loài *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino là đối tượng nghiên cứu, nhằm tránh nhầm lẫn với các loài khác thuộc chi *Gynostemma*.

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 của luận án góp phần hoàn thiện quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giảo cổ lam, tạo cơ sở cho việc sản xuất nguồn nguyên liệu giàu gypenoside phục vụ lĩnh vực dược phẩm. Đồng thời, hoạt tính sinh học của cao chiết cho thấy tiềm năng ứng dụng trong nghiên cứu và phát triển các chế phẩm có nguồn gốc tự nhiên.

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

2. Nâng cao khả năng tích lũy gypenoside trong nuôi cấy tế bào huyền phù

bằng elicitor. Đối với xử lý đơn lẻ, SA ở nồng độ 100 μM sau 6 ngày nuôi cấy cho hàm lượng gypenoside cao nhất đạt 79,721 mg/g chất khô, xấp xỉ gấp 2 lần mẫu tự nhiên. Khi phối hợp elicitor, tổ hợp MeJA (50 μM), SA (100 μM) và YE (3 g/L) cho hiệu quả tối ưu, với hàm lượng gypenoside đạt 103,810 mg/g chất khô và ginsenoside Rb1 đạt 0,127 mg/g chất khô.

3. Đã xác định được mức độ biểu hiện của 12 gene liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam dưới tác động của elicitor. Xử lý MeJA làm tăng biểu hiện của các gene CYP86A8, CYP94A1 và CYP89A2 lần lượt 8,25; 10,01 và 11,14 lần so với đối chứng, trong khi gene UGT73B4 biểu hiện mạnh nhất khi xử lý SYM với mức tăng 15,35 lần.

4. Xác định được hoạt tính sinh học của cao chiết tế bào Giảo cổ lam, thể hiện khả năng ức chế một số dòng tế bào ung thư gan, phổi và bạch cầu, đồng thời tăng khả năng sinh tinh và nồng độ testosterone trong mô hình 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, Srilanca, 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], [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 loài thực vật ưa ẩm và thích hợp với điều kiện ánh sáng tán xạ, sinh trưởng tốt trong môi trường có độ ẩm cao trên nhiều loại đất giàu dinh dưỡng và thoát nước tốt. Cây có khả năng thích nghi với điều kiện nhiệt độ tương đối rộng, chịu lạnh khá và duy trì sinh trưởng ổn định ở các vùng khí hậu ẩm [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. Hình 1.2 đã thể hiện cấu trúc điển hình của 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

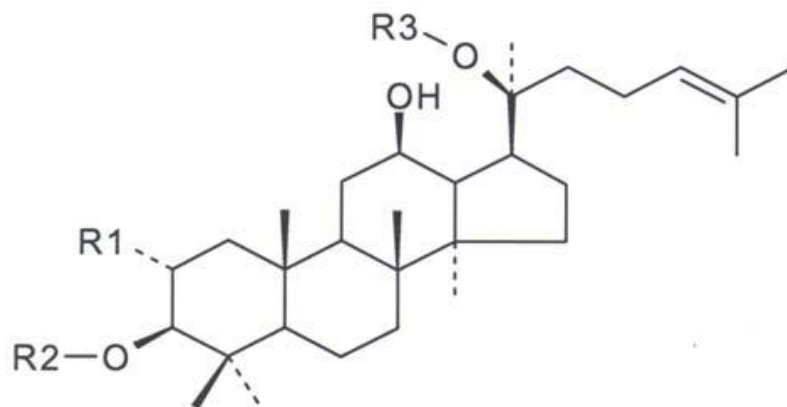
protopanaxadiol (PPD), protopanaxatriol (PPT) và ocotillol - type dựa trên kiểu hydroxyl hóa ở khung dammarane và mức độ biến đổi ở vị trí C - 20. Hai nhóm PPD và PPT chiếm ưu thế trong họ Araliaceae và họ Cucurbitaceae, trong khi nhóm ocotillol-type xuất hiện hạn chế hơn. Các biến thể như acetyl hóa, 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].

Gypenoside là nhóm saponin triterpenoid đặc trưng của Giảo cổ lam, có vai trò quan trọng trong cơ chế phòng vệ tự nhiên của thực vật. Các hợp chất này giúp tăng khả năng chống chịu trước sự tấn công của vi sinh vật gây bệnh, côn trùng và các điều kiện bất lợi của môi trường thông qua hoạt tính chống oxy hóa và bảo vệ tế bào. Sự tích lũy gypenoside thường tăng lên khi cây chịu các tác nhân stress sinh học hoặc phi sinh học, góp phần nâng cao khả năng thích nghi và duy trì sinh trưởng của thực vật.

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].

(R1 và R2 = glucose, rhamnose; R3 = glucose, xylose))

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 gồm dòng tế bào ung thư phổi A549, ung thư gan HepG2, ung thư gan Huh7 và ung thư bạch cầu HL – 60.

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 ngừng 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 khỏe 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 kì 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].

Các nghiên cứu thực nghiệm trên động vật cho thấy việc sử dụng cao chiết Giảo cổ lam có thể cải thiện cấu trúc ống sinh tinh, tăng số lượng và khả năng di động của tinh trùng, đồng thời góp phần duy trì nồng độ testosterone huyết thanh thông qua bảo vệ chức năng của tế bào Leydig. Ngoài ra, Giảo cổ lam còn được ghi nhận có khả năng điều hòa quá trình chết theo chương trình của tế bào, giảm phản ứng viêm và duy trì cân bằng oxy hóa khử trong mô tinh hoàn. Những đặc tính được lý này là cơ sở khoa học quan trọng cho việc nghiên cứu tác dụng bảo vệ tinh hoàn của cao chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam trong điều kiện stress nhiệt của luận án.

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 để 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 vẫn tồn tại nhiều hạn chế mang tính hệ thống, ảnh hưởng đến khả năng ứng dụng trong sản xuất quy mô lớn. Việc mất cấu trúc mô làm thay đổi cơ chế điều hòa sinh lý tự nhiên của tế bào, từ đó thường làm giảm hiệu quả sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp. Trong quá trình nuôi cấy, tế bào có xu hướng kết tụ thành cụm, tạo nên các vi môi trường không đồng nhất trong cùng một hệ thống. Khi mở rộng quy mô, tế bào dễ chịu tác động của stress cơ học, dẫn đến suy giảm khả năng sinh trưởng và tích lũy sinh khối trong bioreactor. Bên cạnh đó, nuôi cấy huyền phù phụ thuộc chặt chẽ vào thể tích làm việc và mật độ tế bào tối ưu; nếu thiết kế bioreactor và các thông số vận hành không được kiểm soát phù hợp, hiệu suất nuôi cấy và chất lượng sản phẩm có thể bị suy giảm. Ngoài ra, tính không ổn định di truyền của dòng tế bào cùng với hiệu quả kinh tế còn hạn chế cũng là những yếu tố cản trở việc 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 Bất ruồi 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 lắc 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	<i>Hóa học</i>	<i>Muối và các kim loại nặng</i>	$\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$, AgNO_3 , CdCl_2 , CuCl_2 , CuSO_4 , VOSO_4 , NiSO_4 , selenium, ...
		<i>Stress thẩm thấu</i>	Mannitol, sorbitol, sodium chloride, potassium chloride, cadmium chloride, polyvinyl pyrrolidone, ...
		<i>Cơ chất</i>	NO , ethylene, ...

		<i>dạng khí</i>	
	<i>Vật lý</i>	Tia UV, thay đổi trạng thái nhiệt độ, muối, hạn hán,...	
	<i>Các phân tử tính hiệu nội bào</i>	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

Elicitor là các tín hiệu sinh học hoặc phi sinh học có khả năng kích hoạt hệ thống phòng vệ của thực vật. Sau khi được tế bào nhận biết, elicitor sẽ hoạt hóa các con đường truyền tín hiệu nội bào, thúc đẩy biểu hiện các gene liên quan đến sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp và làm tăng hoạt tính của các enzyme tham gia con đường chuyển hóa. Nhờ đó, quá trình tích lũy các hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó có gypenoside, được tăng cường đáng kể. Có nhiều giả thuyết khác nhau về cơ chế tác dụng của elicitor lên thực vật như:

Giả thuyết cho rằng Ca^{2+} 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 μM và 100 μM 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 amyris

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 μM 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 được 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.

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

cỏ 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].

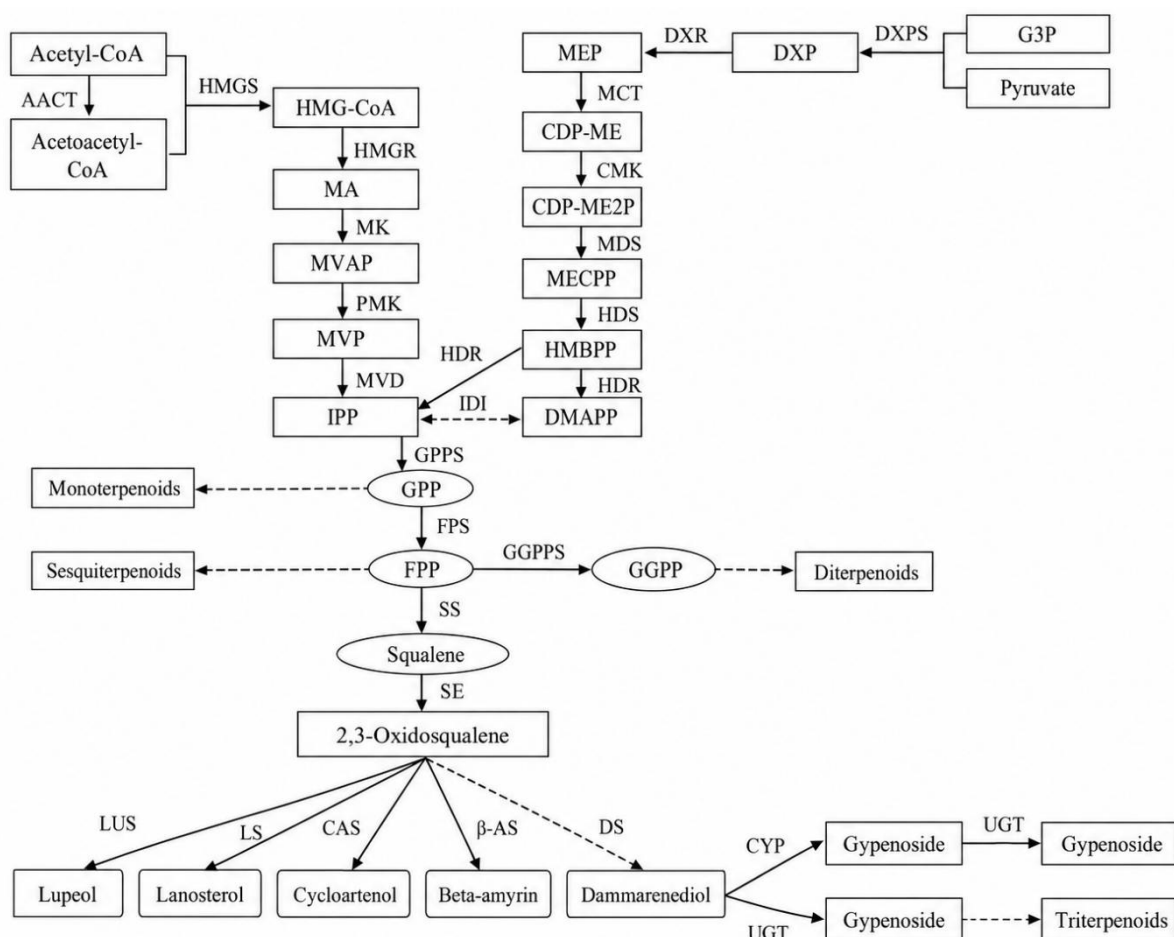
Mặc dù các nghiên cứu trước đây đã thực hiện nuôi cấy callus hoặc rễ tơ Giảo cổ lam và ghi nhận sự biến động hàm lượng gypenoside dưới tác động của một số yếu tố môi trường, các công trình này chỉ dừng lại ở mức mô tách rời và chưa tiếp cận hệ thống nuôi cấy huyền phù vốn là nền tảng quan trọng để phát 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 1.3. Sơ đồ con đường sinh tổng hợp triterpen gypenoside [173]

Hình 1.3 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 kết hợp 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].

Glycosyl hóa là quá trình gắn một hoặc nhiều phân tử đường vào hợp chất thứ cấp dưới xúc tác của các enzyme glycosyltransferase (UGTs). Quá trình này làm tăng độ tan, độ ổn định và khả năng vận chuyển của các hợp chất trong tế bào thực vật, đồng thời làm giảm độc tính của các chất trung gian chuyển hóa. Đối với các saponin triterpenoid như gypenoside, glycosyl hóa là bước quan trọng quyết định sự đa dạng về cấu trúc và hoạt tính sinh học của sản phẩm cuối cùng. Vì vậy, các gene thuộc họ UGT, trong đó có UGT91A1, đóng vai trò quan trọng trong quá trình sinh tổng hợp và tích lũy hợp chất thứ cấp ở thực vật. 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 hệ phiên mã (scRNA-seq) đã cung cấp bằng chứng rõ ràng rằng một số UGT, như Gp*UGT71V3* và Gp*UGT71AW1*, 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 Pg*UGT74AE2* 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].

Stress phi sinh học như hạn hán, độ mặn, nhiệt độ cao hoặc nhiệt độ thấp có thể kích hoạt sự biểu hiện của các gene liên quan đến sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp,

trong đó có các gene thuộc họ UGT. Sự tăng cường hoạt động của UGT91A1 thúc đẩy quá trình glycosyl hóa các chất chuyển hóa, góp phần ổn định cấu trúc, tăng khả năng chống oxy hóa và duy trì cân bằng nội môi của tế bào. Nhờ đó, thực vật nâng cao khả năng thích nghi và giảm thiểu tổn thương do các điều kiện môi trường bất lợi gây ra. 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 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 Giảo 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:

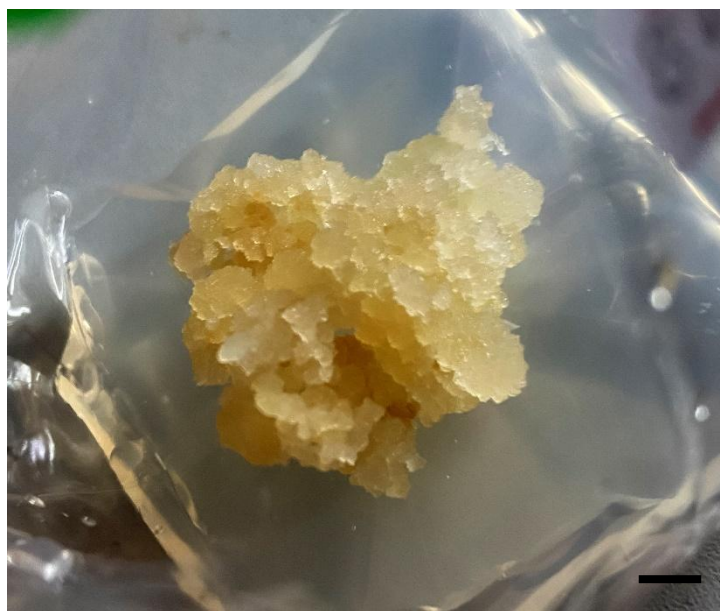
- Vật liệu để nuôi cấy huyền phù là callus thứ cấp có nguồn gốc từ callus sơ cấp (Bắt đầu từ cây *in vitro*, sử dụng lá non để tạo callus sơ cấp, sau đó tiếp tục nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung 2,0 mg/L KIN và 0,5 mg/L IBA để tạo callus thứ cấp. Đây là dòng callus tốt nhất, có thể sử dụng để nuôi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

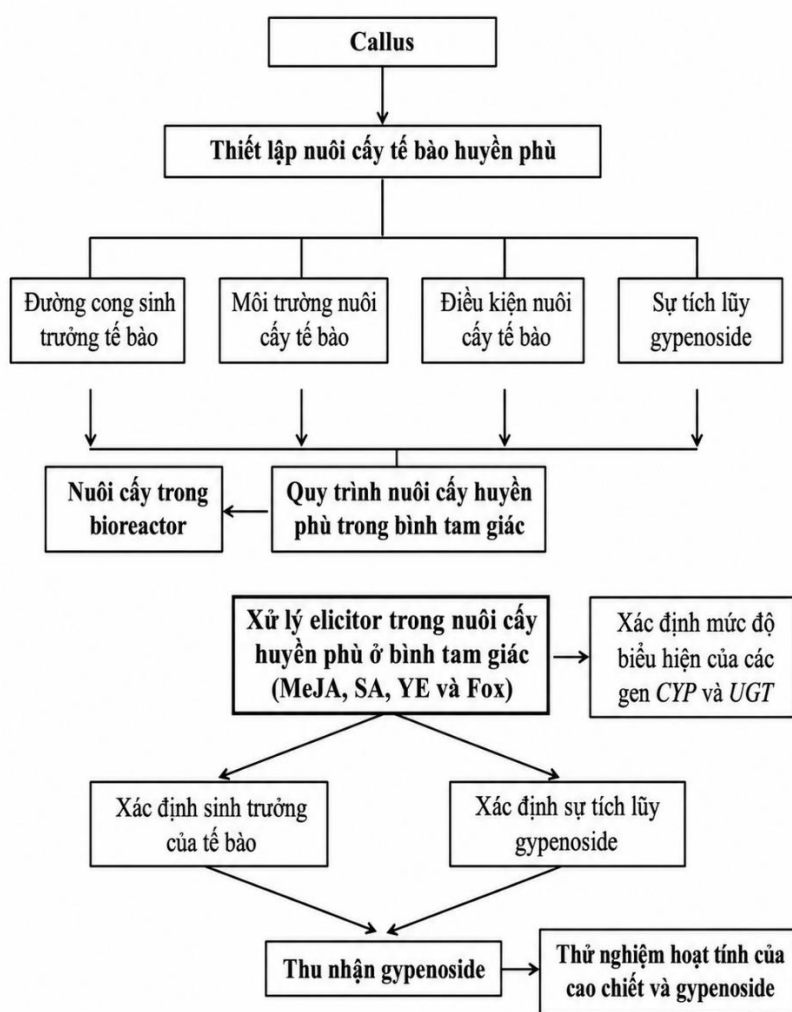
Chuột đực trưởng thành dòng Swiss



Hình 2.1. Callus thứ cấp cây Giảo cổ lam

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hình 2.2 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*.



Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án

Quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây *Giảo cổ lam* được thực hiện theo trình tự từ tạo callus, lựa chọn callus thứ cấp, thiết lập hệ nuôi cấy huyền phù, xây dựng đường cong sinh trưởng, xử lý elicitor, xác định hàm lượng gypenoside và đánh giá mức độ biểu hiện của các gene liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside.

Các điều kiện nuôi cấy và phương pháp phân tích được tối ưu hóa và triển khai thống nhất trong toàn bộ quá trình nghiên cứu nhằm bảo đảm tính ổn định, khả năng lặp lại và độ tin cậy của kết quả thực nghiệm.

2.2.1. Cấy và nuôi cấy mô sẹo (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 cấy, 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 mật độ tiếp giống 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. Sinh khối được thu nhận định kỳ sau mỗi 2 ngày nuôi cấy bằng phương pháp lọc chân không, rửa nhẹ bằng nước cất để loại bỏ môi trường nuôi cấy còn bám trên bề mặt tế bào, sau đó xác định khối lượng tươi. Một phần sinh khối tiếp tục được sấy ở 50°C đến khối lượng không đổi để xác định khối lượng khô. Các chỉ tiêu này được sử dụng để xây dựng đường cong sinh trưởng và xác định thời điểm tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù [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 µm 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 µL dịch chiết gypenoside được chuyển vào ống nghiệm sau đó bổ sung 250 µL 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)

Trong phân tích HPLC, các thông số giới hạn phát hiện (Limit of Detection, LOD) và giới hạn định lượng (Limit of Quantification, LOQ) được sử dụng để đánh giá độ nhạy của phương pháp phân tích. LOD biểu thị nồng độ thấp nhất của chất phân tích có thể được phát hiện, còn LOQ là nồng độ thấp nhất có thể định lượng với độ chính xác và độ lặp lại phù hợp. Các thông số này là cơ sở để khẳng định khả năng ứng dụng của phương pháp HPLC trong phân tích và định lượng ginsenoside trong mẫu nghiên cứu.

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 mật độ tiếp giống 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 μ m 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 lacc các tế bào *Giáo 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 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

Các nồng độ của elicitor cho tế bào huyền phù *Giáo 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 μ M), SA (100 μ M), 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 (Open Reading Frame) 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 mỗi trong nhận diện các gene [173]

Gene	Trình tự mỗi (Chiều từ 5' -> 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)	Nhiệt độ gắn mỗi °C
<i>CYP 71B19</i>	TAAACCAAAGAAACCATGAAGGA TCATCCGACCATAAACTTTTCA	1666	52
<i>CYP 77A3</i>	CCCATTTCCTTTCTTCAACAAT ATGCTCCTTTAAACCCTAGA	1522	50
<i>CYP 86A7</i>	GTCAATGATGGATACGGTG TCGGCCTGAAACCTCAA	1637	50
<i>CYP 86A8</i>	AAGAAAGATATGGAGTTGGG CAACCAATCACGCCTTC	1668	49
<i>CYP 89A2</i>	GAAGTGAAACAGAAATGGAGA GCTAGAACCTGGAACGTAAA	1533	50
<i>CYP 90A1</i>	CCCATTTCATGGCGTG CTGCTCCTCTCTACATTATCAA	1506	51
<i>CYP 94A1</i>	TCTTTCTCTAATGGATATCTGTGTT GAACTCACATCTCCCTCTTCT	1523	51
<i>UGT 73B4</i>	AGAAGAAACGGAGCACA ACCATTTCATAAATCAAACCG	1466	48
<i>UGT 76B1</i>	CATGGACAGGATCCAACAA CAAGCATTTTTTACAATCTTATCG	1375	50
<i>UGT 74F2</i>	GGCAGACAAAAATGAAAACGG TTGATTCTATTTCAAAGCCAAA	1398	54
<i>UGT 91C1</i>	GCCTTCAAATGGAAAACGAA CCTTCCATTTTTTCAAATCCTCA	1425	49
<i>UGT 91A1</i>	AAGCACATTTACCATGGCTGC AGCATCAATGGCTTTTCAGATACT	1400	49

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]. Dự đoán topo xuyên màng (2D) 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 cDNA mạch đơn

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 cDNA mạch đơn bằng kit First Strand cDNA Synthesis (#K1612, Fermentas) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tổng thể tích phản ứng 20 μ L chứa 5 μ g RNA tổng số, 0.5 μ g oligo(dT)18 primer, 4 μ L đệm phản ứng, 20 đơn vị enzyme RiboLockTM ribonuclease inhibitor, 2 μ L 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 μ L Go Taq qPCR Master Mix 2X (Promega, Mỹ), 1 μ L mồi mỗi loại (10 pmol), 1 μ L cDNA, 7 μ L 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Giá trị C_t được xác định cho gene đích và gen nội chuẩn. Với mỗi mẫu, tính $\Delta C_t = C_{t_gene\ đích} - C_{t_gene\ nội\ chuẩn}$. Tính $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_xử\ lý} - \Delta C_{t_đối\ chứng}$.

Hệ số thay đổi biểu hiện (fold-change) được tính theo công thức: Fold-change = $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

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

Gene	Trình tự môi ((Chiều từ 5' -> 3'))	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>CYP 71B19</i>	AATGGCGGAACTCGCAAAAC TCATCGGTTTCGGTTTCGGT	111
<i>CYP 77A3</i>	CAATCTCTTCCAAATCGCTC AATCAAACCAGCATCACTCA	136
<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>	TTTCTTTTCCGGCGAACCC 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 tám 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 µL 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 µg/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 µL 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 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 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 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, 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 đực 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, bóc 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 hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) 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.

2.2.10. Thiết bị, hóa chất

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu bao gồm môi trường nuôi cấy Murashige và Skoog (MS), các chất điều hòa sinh trưởng thực vật (KIN, IBA, BAP, NAA), các chất cảm ứng sinh tổng hợp thứ cấp (MeJA, SA, YE), cùng các dung môi và hóa chất đạt cấp độ HPLC grade phục vụ phân tích sắc ký. Các bộ kit tách RNA, tổng hợp cDNA, SYBR Green Master Mix, enzyme và thuốc thử cho phản ứng PCR, qRT-PCR được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các dụng cụ và thiết bị chính được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm tủ cấy vô trùng, tủ nuôi cấy thực vật, máy lắc tròn, máy ly tâm lạnh, máy đo quang phổ, máy PCR, hệ thống qRT-PCR, hệ thống điện di DNA, hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) và hệ thống bioreactor nuôi cấy tế bào huyền phù. Tất cả các thiết bị được vận hành theo đúng quy trình của nhà sản xuất và được hiệu chuẩn, bảo trì định kỳ nhằm đảm bảo độ chính xác và độ tin cậy của kết quả nghiên cứu.

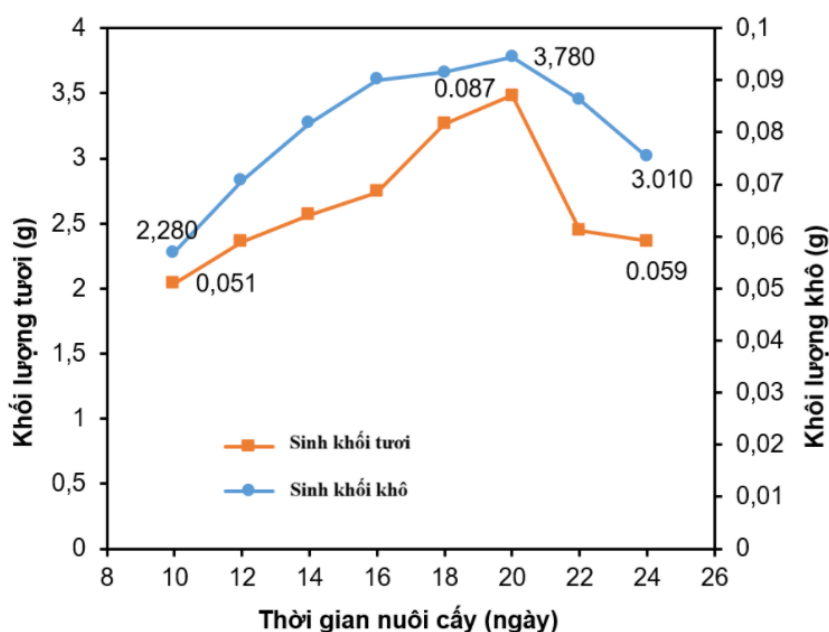
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

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

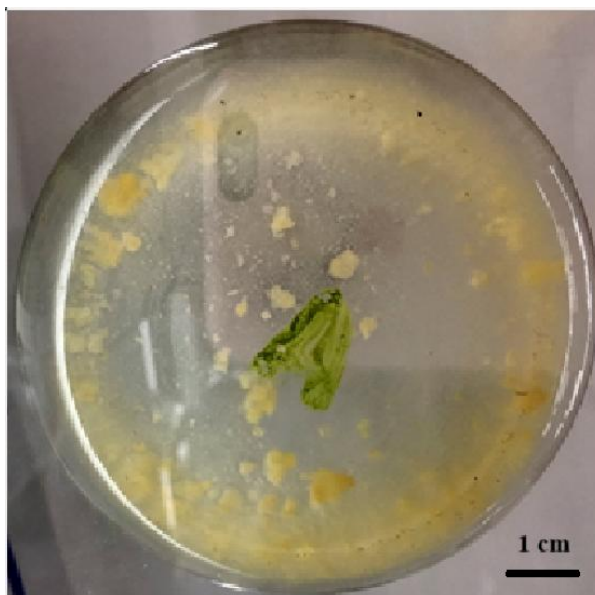
Thời gian nuôi cấy (ngày)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
10	28,291 ^{cd}	0,010 ^d
12	30,343 ^c	0,011 ^d
14	36,210 ^b	0,012 ^d
16	41,321 ^a	0,022 ^c
18	42,122 ^a	0,049 ^a
20	34,100 ^c	0,050 ^a
22	25,510 ^d	0,041 ^a
24	24,081 ^d	0,024 ^c

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 Giáo 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].

Mặc dù sinh khối tế bào tiếp tục tăng và đạt giá trị cao nhất vào ngày thứ 20, hàm lượng gypenoside lại đạt cực đại ở ngày thứ 18 và giảm sau đó. Điều này

cho thấy quá trình tích lũy hợp chất thứ cấp không hoàn toàn đồng bộ với quá trình tăng sinh sinh khối. Ở giai đoạn cuối pha lũy thừa và đầu pha cân bằng (khoảng ngày 16–18), tế bào bắt đầu chuyển một phần nguồn carbon và năng lượng từ sinh trưởng sang sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp, dẫn đến sự gia tăng hàm lượng gypenoside. Khi nuôi cấy kéo dài, mặc dù sinh khối vẫn tiếp tục tăng do tế bào tích lũy nước và vật chất dự trữ, tốc độ sinh tổng hợp gypenoside giảm và hoạt chất có thể bị tiêu thụ hoặc pha loãng bởi sự gia tăng sinh khối, làm cho hàm lượng gypenoside tính trên đơn vị khối lượng khô giảm ở các thời điểm sau.



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 Neube 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 Le 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 khối 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 chưa 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 ($p \geq 0,05$).

Đối với sinh trưởng, hai công thức MS bổ sung 2,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA và 2 mg/L KIN + 0,5 mg/L IBA đều cho sinh khối thuộc nhóm cao nhất và không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$). Tuy nhiên, xét đồng thời khả năng tích lũy gypenoside, môi trường chứa 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo do cho hàm lượng gypenoside cao hơn và thuộc nhóm thống kê cao nhất.

Sự khác biệt về sinh khối và khả năng tích lũy gypenoside giữa các nghiệm thức cho thấy tỷ lệ cytokinin và auxin có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa thứ cấp của tế bào huyền phù. KIN kết hợp với IBA ở nồng độ thích hợp không chỉ duy trì khả năng phân chia tế bào mà còn thúc đẩy con đường sinh tổng hợp gypenoside, dẫn đến hàm lượng hoạt chất cao hơn so với các công thức sử dụng BAP. Tuy nhiên, khi tăng nồng độ chất điều hòa sinh trưởng vượt mức tối ưu, hiệu quả tích lũy gypenoside có xu hướng giảm, cho thấy sự cân bằng hormone đóng vai trò quan trọng trong việc điều hòa đồng thời quá trình sinh trưởng và tổng hợp hợp chất thứ cấp của tế bào thực vật.

Hàm lượng gypenoside trong Bảng 3.2 thấp hơn so với điều kiện nuôi cấy chuẩn trong môi trường MS lỏng là do các thí nghiệm được thực hiện ở các giai đoạn tối ưu hóa khác nhau và với mục đích đánh giá khác nhau. Ở Bảng 3.2, thí nghiệm tập trung khảo sát ảnh hưởng riêng của BAP hoặc KIN khi phối hợp với 0,5 mg/L IBA đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside, nhằm lựa chọn tổ hợp chất

điều hòa sinh trưởng phù hợp cho nuôi cấy tế bào huyền phù. Trong khi đó, điều kiện nuôi cấy chuẩn được xác lập sau khi đã lựa chọn môi trường phù hợp và tối ưu các yếu tố nuôi cấy khác. Ngoài ra, sự tích lũy gypenoside phụ thuộc không chỉ vào loại và nồng độ chất điều hòa sinh trưởng mà còn chịu ảnh hưởng bởi trạng thái sinh lý của tế bào, thời gian nuôi cấy, mật độ cấy ban đầu và điều kiện vận hành. Vì vậy, sự khác biệt về hàm lượng gypenoside giữa các thí nghiệm là phù hợp với đặc điểm biến động của hệ nuôi cấy tế bào huyền phù.

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 chi... 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

cây tế bào của cây Cà độc dược lá bạc, Sung tâm 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 mật độ tiếp giống 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 mật độ tiếp giống 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 mật độ tiếp giống 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 mật độ tiếp giống 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 mật độ tiếp giống 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, mật độ tiếp giống nuôi cấy có ảnh hưởng đến sự sản xuất sinh khối cũng như tích lũy hợp chất thứ cấp [54]. Trong nghiên cứu này, mật độ tiếp giống 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, mật độ tiếp giống 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 cầm 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

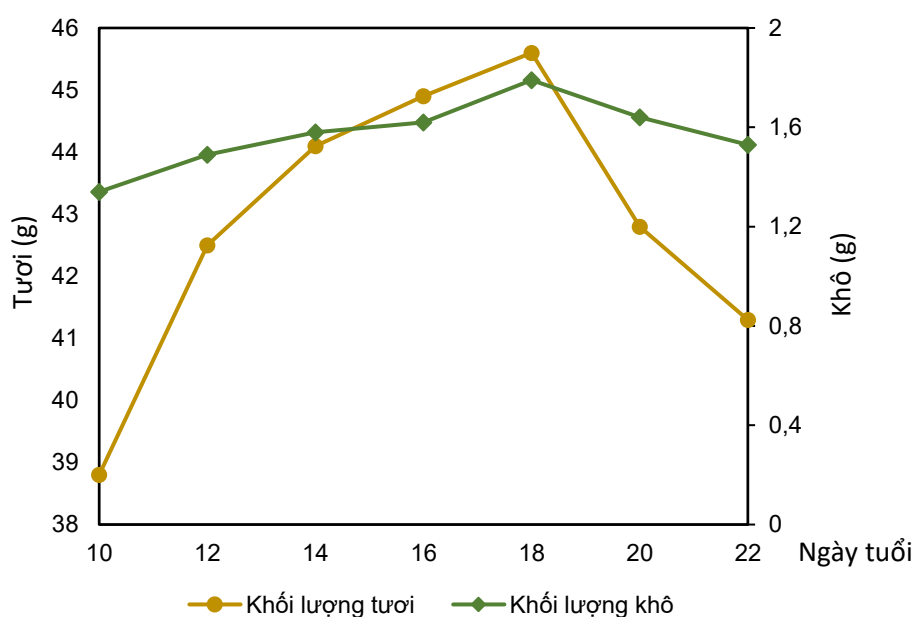
Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA một nhân tố: tốc độ lắc; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).

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

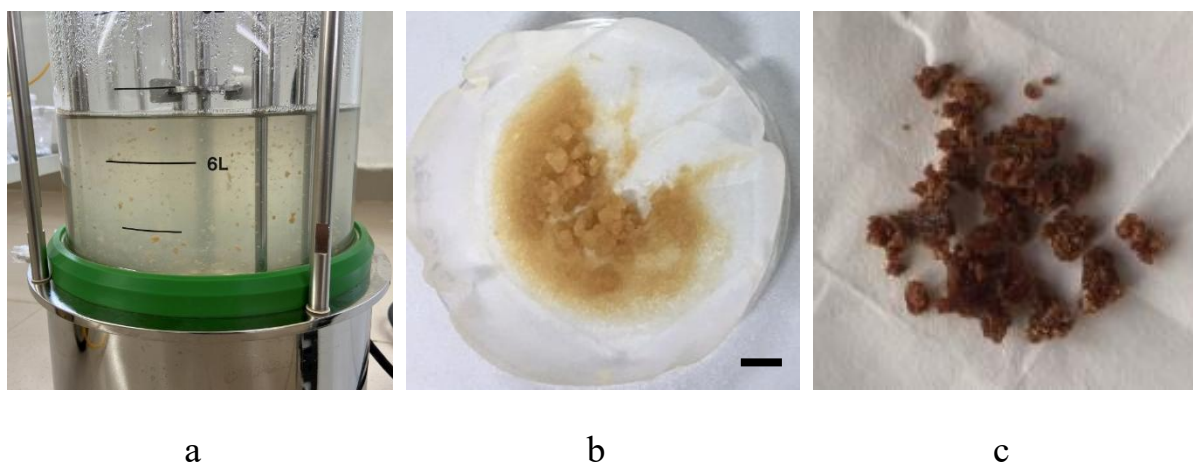
Sau 7 ngày nuôi cấy, sinh khối tế bào Giảo cổ lam chưa tăng trưởng nhiều, khối lượng tươi thu được là khoảng 3,1 g.

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.

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 Giảo 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].

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

Trong nuôi cấy tế bào thực vật, hàm lượng hợp chất thứ cấp thường thấp hơn

so với cây tự nhiên do thiếu các tín hiệu sinh học từ môi trường sống. Vì vậy, việc sử dụng elicitor được xem là một trong những chiến lược hiệu quả nhằm kích hoạt cơ chế phòng vệ của tế bào, từ đó thúc đẩy quá trình sinh tổng hợp và tích lũy các hợp chất có hoạt tính sinh học. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh các elicitor như methyl jasmonate (MeJA), salicylic acid (SA) và yeast extract (YE) có khả năng làm tăng đáng kể hàm lượng hợp chất thứ cấp ở nhiều loài thực vật. Trên cơ sở đó, nghiên cứu này tiến hành đánh giá ảnh hưởng của các elicitor đến khả năng sản xuất gypenoside trong hệ nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam. 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 3.6 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 3.6. 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 ^{bcde}	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 ^{bcde}	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}

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 3.7 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 3.7).

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 nghiên 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 3.7. 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

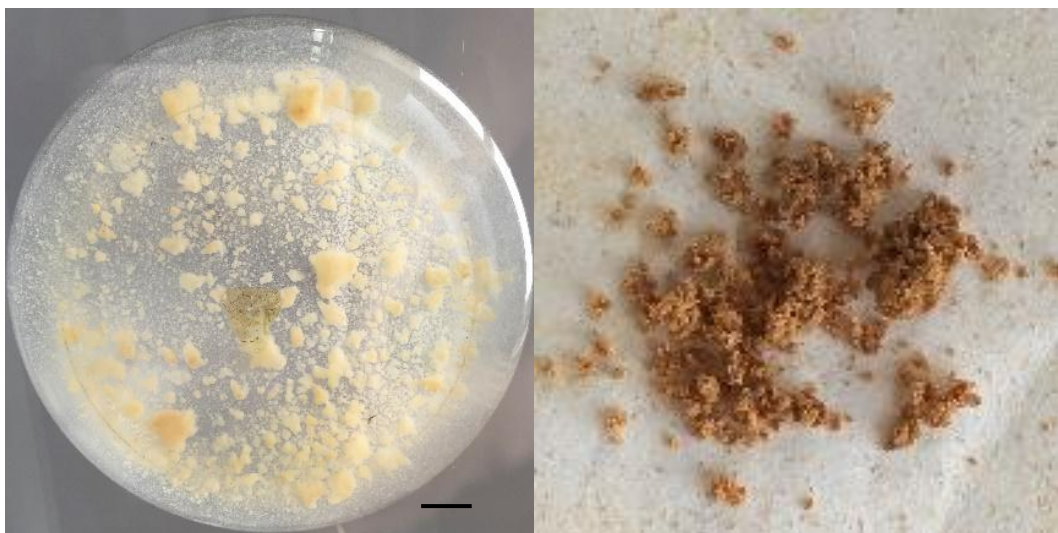
Trong thí nghiệm tối ưu hóa thời điểm cảm ứng, các giá trị được so sánh theo baseline nội tại (ngày 0) của từng elicitor. Kết quả cho thấy MeJA đạt hiệu quả cảm ứng cao nhất khi bổ sung ở ngày thứ 9 với hàm lượng gypenoside 73,901 mg/g khô. SA tạo đáp ứng mạnh nhất khi xử lý ở ngày thứ 6, đạt 79,721 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 3.8. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung elicitor lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào

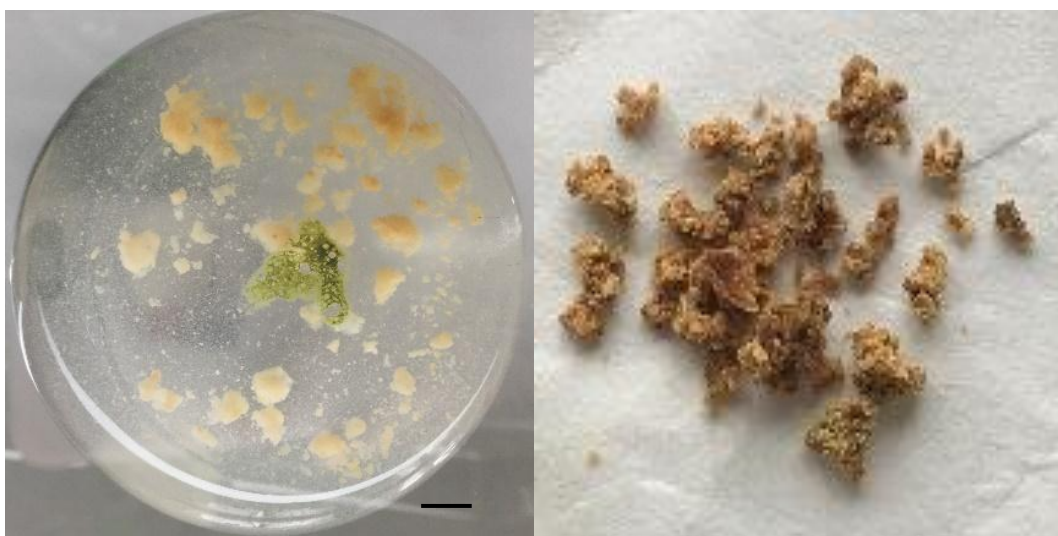
Ngày xử lý	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	MeJA	4,968 ^{cde}	0,207 ^{fg}	57,852 ^{hi}	0,052 ^g
	SA	4,908 ^{cde}	0,148 ^l	76,480 ^{ab}	0,075 ^c

3	YE	4,855 ^e	0,186 ⁱ	74,579 ^{bc}	0,061 ^f
	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

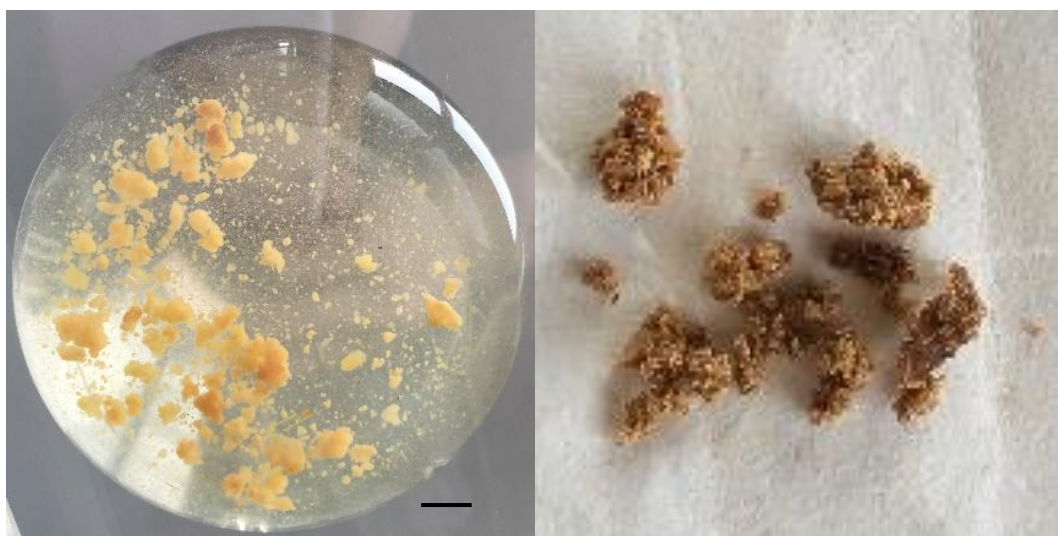
Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (ANOVA hai nhân tố: ngày xử lý và loại elicitor; phép thử hậu nghiệm Duncan, $p < 0,05$). Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0,05$).



a (scale bar = 10 mm)



b (scale bar = 10 mm)



c (scale bar = 10 mm)

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

- Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 50 μ M MeJA vào ngày thứ 9
- Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 100 μ M SA vào ngày thứ 6
- Sinh khối tươi và khô sau khi bổ sung 3 g/L YE vào ngày đầu tiên

Kết quả ở Bảng 3.8 cho thấy thời điểm bổ sung elicitor có ảnh hưởng rõ rệt đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù *Giáo cổ lam*, 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 Giáo 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 3.9.

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

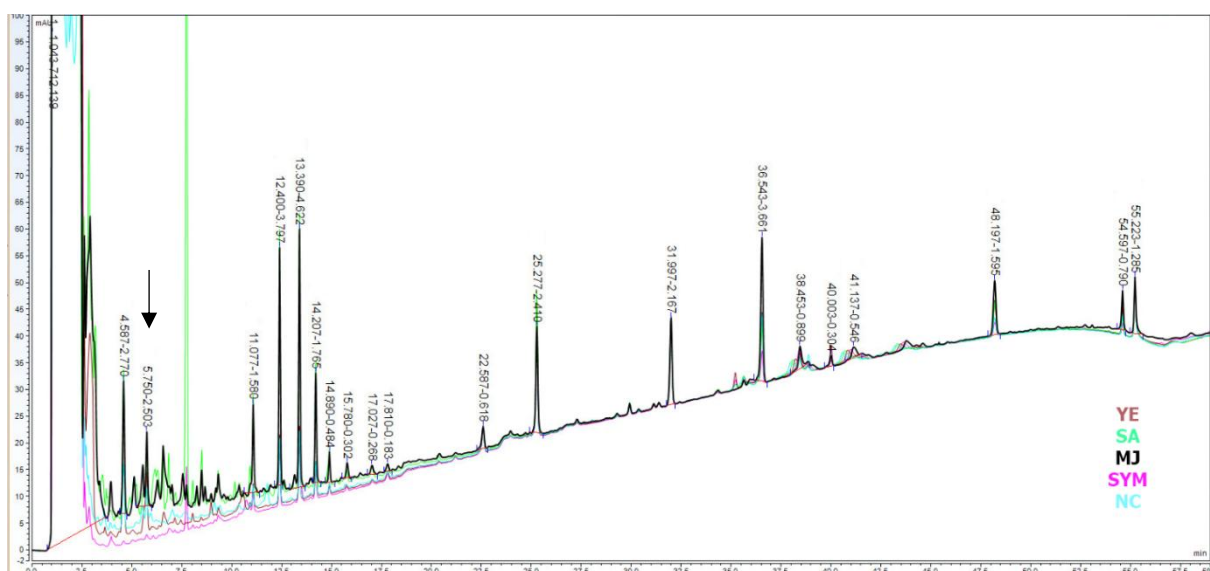
Elicitor	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
MeJA	4,958 ^a	0,172 ^a	73,114 ^b	0,055 ^c
SA	3,887 ^b	0,122 ^{bc}	79,830 ^b	0,087 ^b
YE	4,031 ^b	0,152 ^b	73,767 ^b	0,067 ^{bc}
MeJA + SA	3,475 ^c	0,106 ^c	79,487 ^b	0,075 ^b
MeJA + YE	4,623 ^a	0,197 ^a	77,554 ^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 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. Sắc ký đồ HPLC tế bào huyền phù Giảo cổ lam dưới ảnh hưởng của elicitor. Mũi tên thể hiện peak Rb1.

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. Sák 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 - deacetylbaaccatin (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 - deacetylbaaccatin [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*

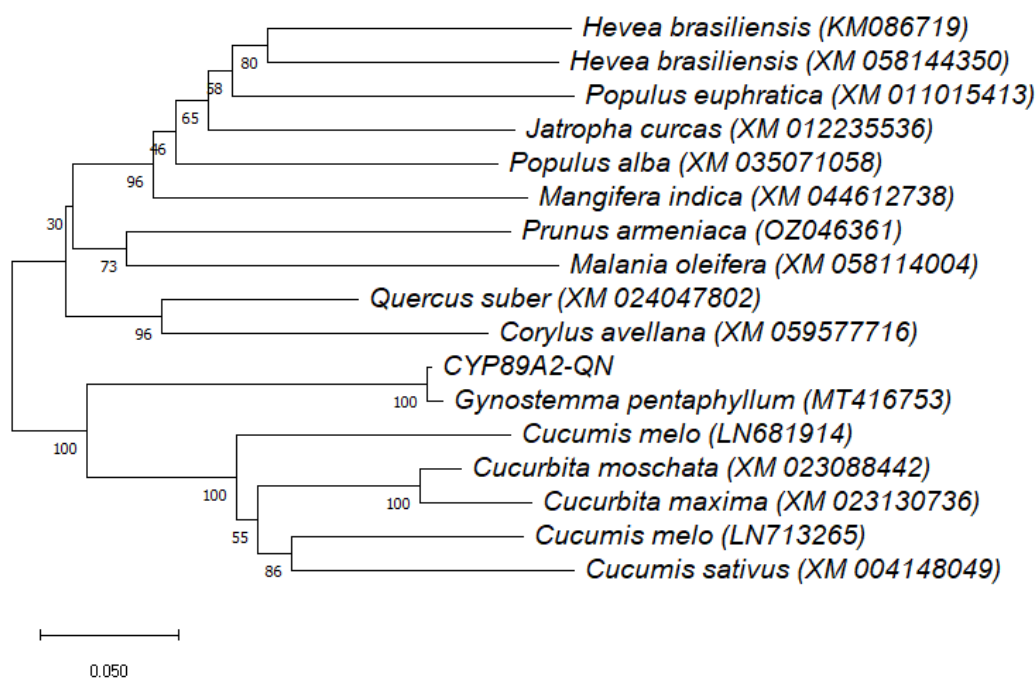
DNA tổng số của mẫu cây Giảo cổ lam được sử dụng làm khuôn mẫu để thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu, sản phẩm PCR sau đó được điện di trên agarose gel 1%. Kết quả thăm dò với cặp mồi đặc hiệu cho 12 gene theo mô tả của Zhang và cộng sự (2021) cho thấy có 7 gene *CYP* và 5 gene *UGT* có sản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

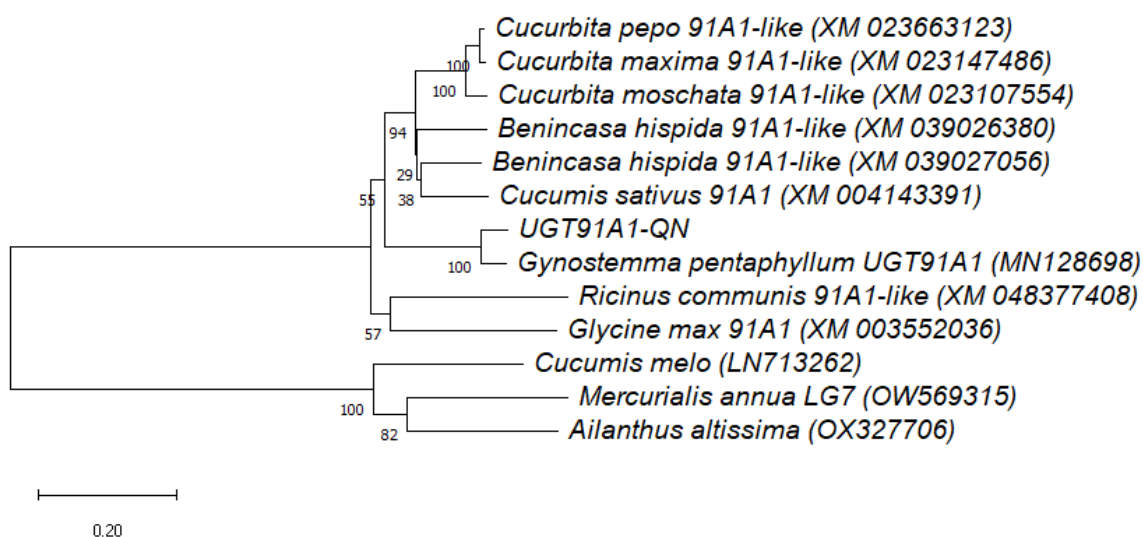
Sản phẩm PCR gene *CYP89A2* (CpQN) được sử dụng để phân tích trình tự trực tiếp, kết quả cho thấy đoạn trình tự nucleotide thu được có chiều dài 850 bp đảm bảo chất lượng để so sánh trình tự. Kết quả so sánh trên ngân hàng gene cho

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 phát sinh loài dựa trên trình tự gene *CYP89A2*. Chỉ số ở mỗi nhánh thể hiện mức độ tin cậy với bootstrap 1000.



Hình 3.8. Cây phát sinh loài 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 3.10).

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%.

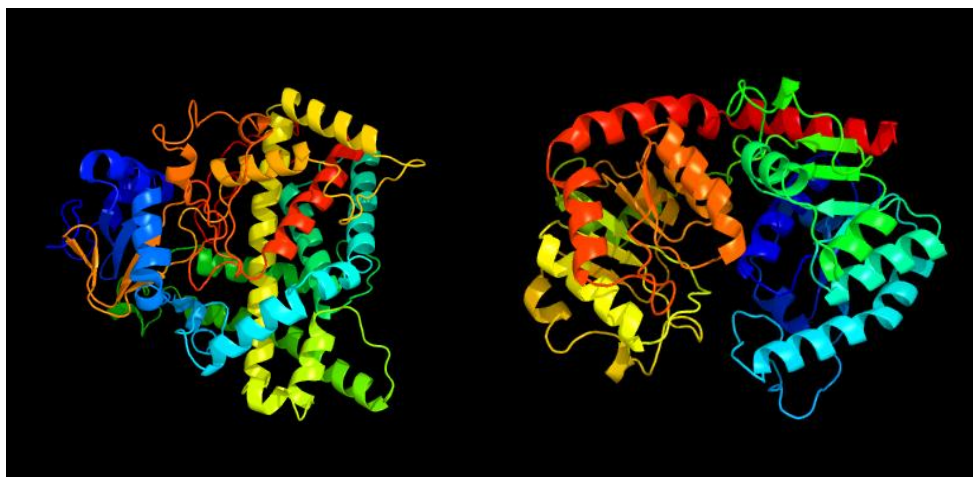
Đối với *CYP89A2*, trình tự mRNA có chiều dài 1.521 bp và mã hóa đoạn polypeptide dài 506 amino acid, enzyme có khối lượng phân tử là 58,44 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 7,06. Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của *CYP89A2* bằng công cụ Tm Predictor cho thấy enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55 - 65°C (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.

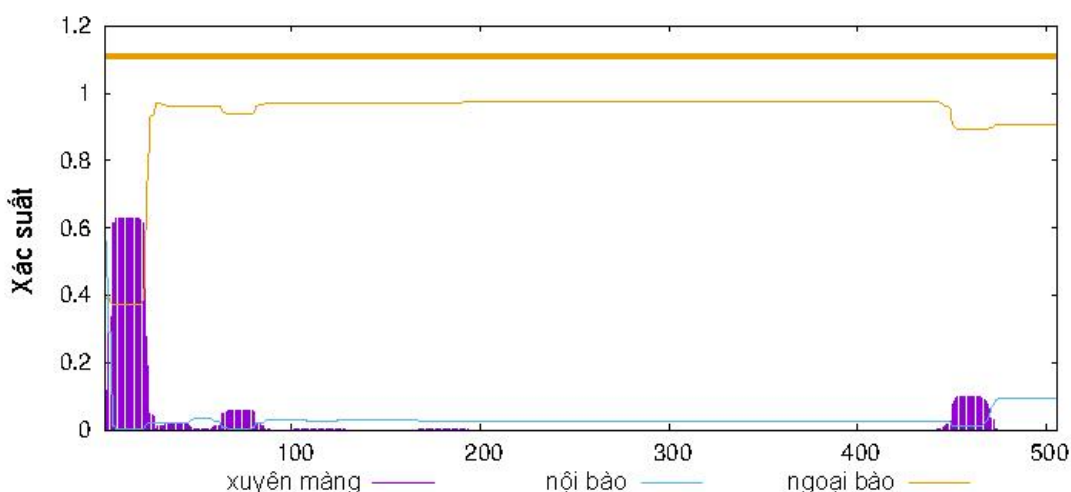
Bảng 3.10. Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm lý hóa của enzyme

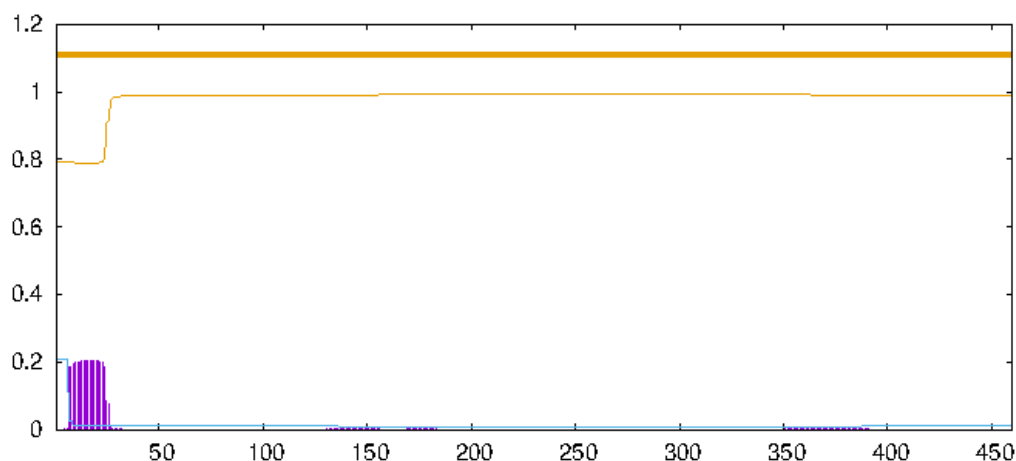
Đặc điểm	<i>CYP89A2</i>	<i>UGT91A1-QN</i>
Gene hoàn chỉnh (bp)	2.438	1.460
cDNA	1.521	1.383
Chuỗi polypeptide (amino acid)	506	460
Khối lượng phân tử (kDa)	58,44	52,786
Điểm đẳng điện (pI)	7,06	5,66
T _m	55°C~65°C	55°C~65°C
Acid/base	kiềm	kiềm
Domain	PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, 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.

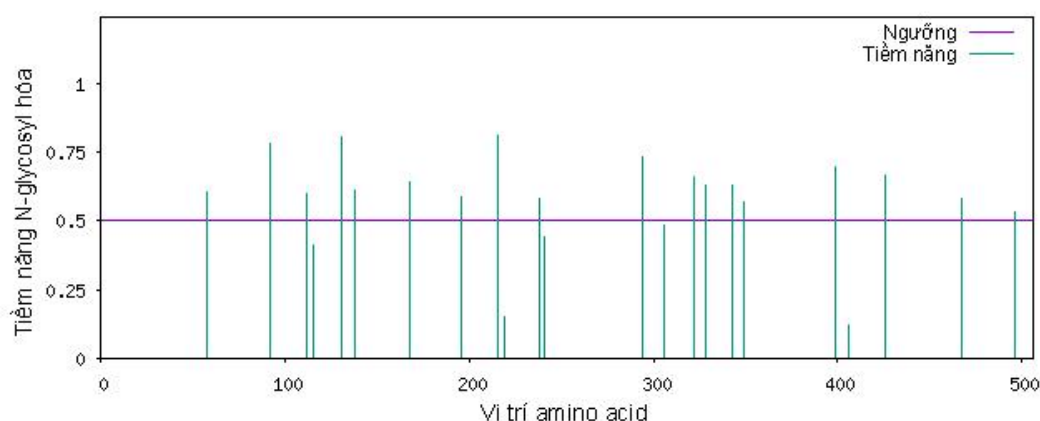
Vùng bảo tồn được dự đoán bằng chương trình SMART cho thấy *CYP89A2* có 13 domain hiện diện là PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding, ClpB_D2_small và MoCF_biosynth. Kết quả dự đoán cấu trúc xuyên màng cho thấy phân tử enzyme phần lớn nằm xuyên màng và một phần 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. Dự đoán topo xuyên màng (2D) 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.

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. 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.

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 YE 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 3.9, 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. Thu nhận cao chiết và chế phẩm có chứa gypenoside

3.3.1.1. Thu nhận cao chiết

Các mẫu cao được phân tích hàm lượng gypenoside bằng phương pháp quang phổ và hàm lượng Rb1 bằng kỹ thuật HPLC. Kết quả hàm lượng gypenoside 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.

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 µg/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 3.11). Tuy nhiên, khả năng ức chế đối với dòng tế bào A549 không mạnh.

Bảng 3.11. 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	$0,63 \pm 0,38$	$0,69 \pm 0,13$
20	$8,93 \pm 0,6$	$8,81 \pm 0,93$
100	$22,51 \pm 0,58$	$32,89 \pm 1,43^*$
200	$34,36 \pm 1,12$	$41,16 \pm 2,18^*$
IC ₅₀	>100	>100
Tế bào ung thư gan Huh7		
4	$2,44 \pm 0,13$	$1,72 \pm 0,47$
20	$7,24 \pm 1,06$	$7,42 \pm 0,57$
100	$34,84 \pm 1,72$	$15,19 \pm 0,63^*$
200	$36,07 \pm 1,89$	$44,43 \pm 1,65^*$

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 3.11).

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 µg/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 µg/mL trong cả mẫu tự nhiên (khoảng 42,17%) và mẫu tế bào (khoảng 48,76%) (Bảng 3.11).

Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương và cho hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên các dòng A549, HepG2, Huh7, HL-60 và HEK-293A, với tỷ lệ ức chế đạt 88,30–99,12% ở nồng độ 10 µg/mL và 77,49–87,52% ở nồng độ 2

$\mu\text{g/mL}$. Giá trị IC_{50} nằm trong khoảng $0,33 \pm 0,03$ – $0,42 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, thấp hơn rất nhiều so với các mẫu nghiên cứu, khẳng định hiệu lực gây độc tế bào cao của đối chứng dương.

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 3.12).

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 $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ [2].

Đối chứng dương Ellipticine thể hiện hoạt tính gây độc tế bào rất mạnh trên các dòng A549, HepG2, Huh7 và HL-60, với tỷ lệ ức chế đạt 81,78–97,65% ở nồng độ 10 $\mu\text{g/mL}$ và 70,63–76,13% ở nồng độ 2 $\mu\text{g/mL}$. Giá trị IC_{50} dao động từ $0,46 \pm 0,04$ đến $0,52 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$, thấp hơn nhiều so với các mẫu nghiên cứu, khẳng định hiệu lực gây độc tế bào cao của chất đối chứng.

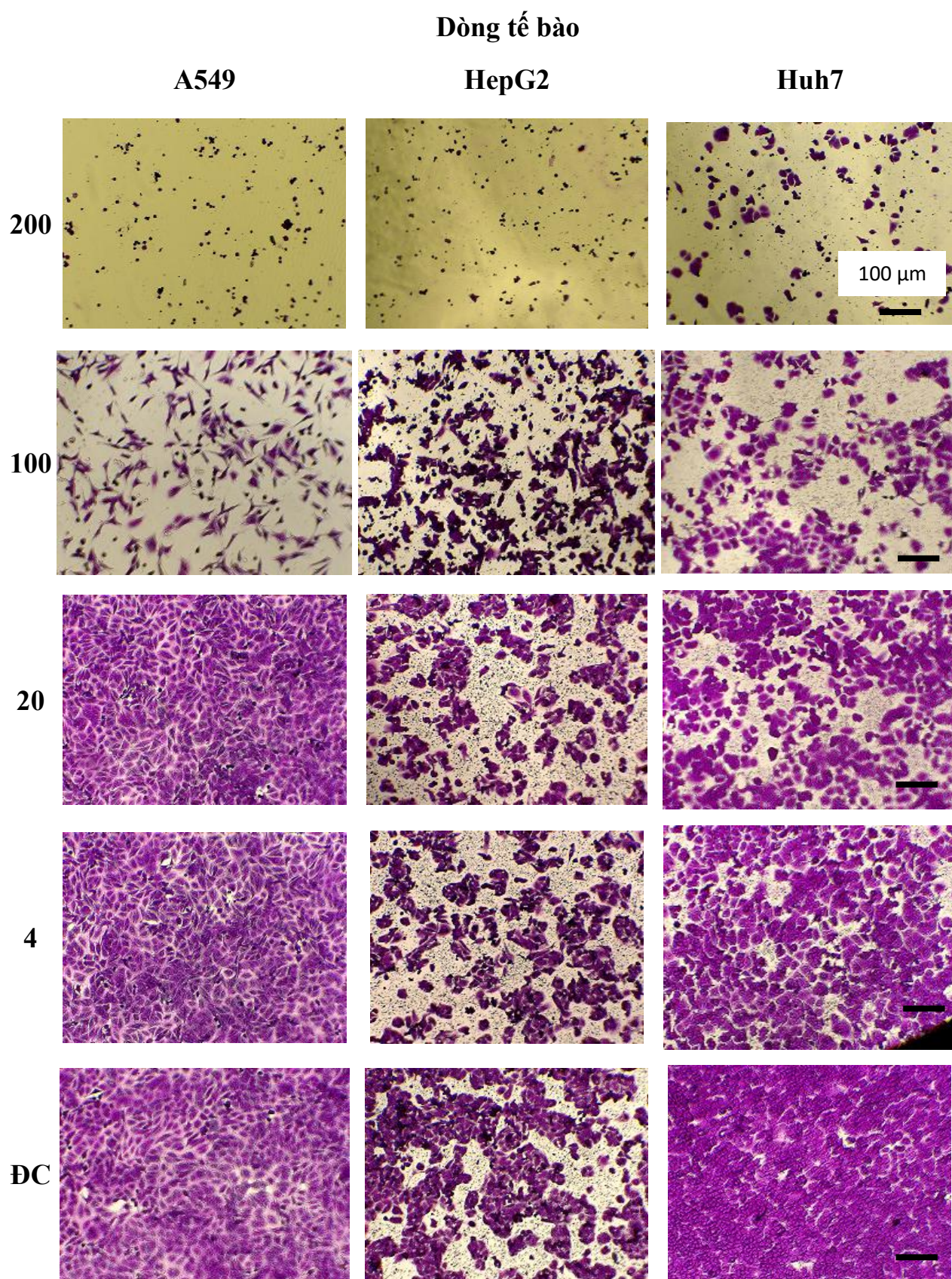
Bảng 3.12. Khả năng ức chế các dòng tế bào ung thư của chế phẩm chứa gypenoside

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.

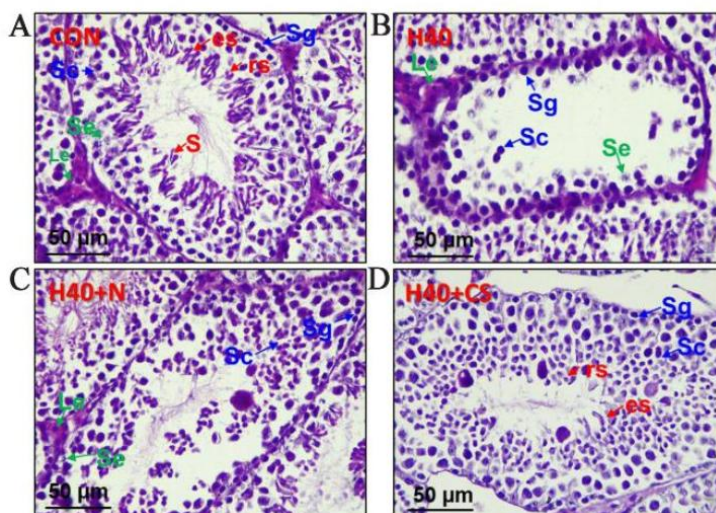
3.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ mô tinh hoàn chuột *in vivo* của chế phẩm cao chiết

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).

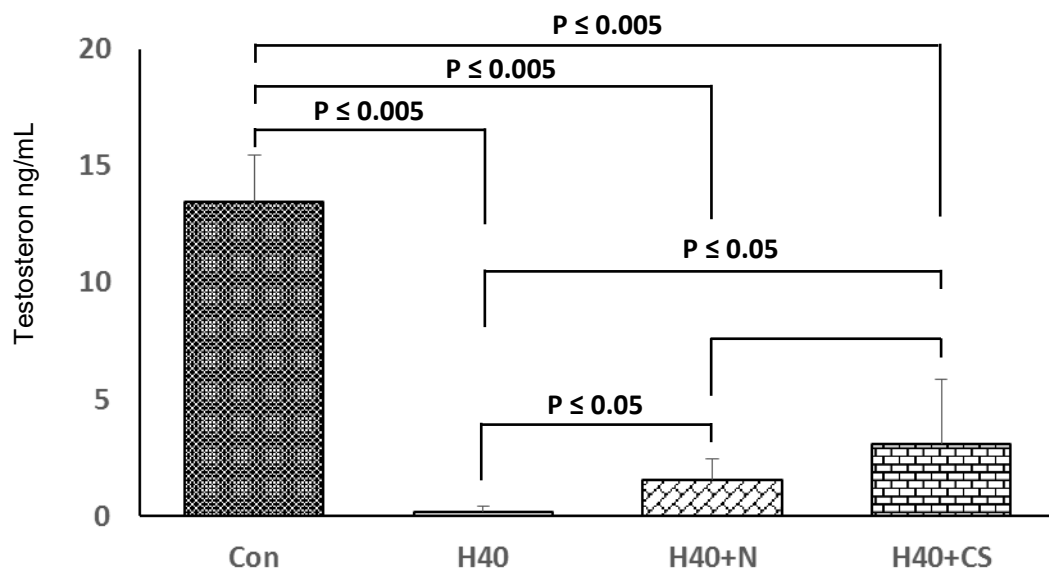
Cao chiết từ tế bào Giảo cổ lam nuôi cấy huyền phù cải thiện đáng kể quá trình sinh tinh diễn ra trong lòng ống sinh tinh. Số lượng tế bào dòng tinh trong lòng ống đã tăng lên đáng kể, đã quan sát thấy một số tế bào tinh tử tròn và tinh tử dài. Tuy nhiên rất khó để quan sát thấy tinh trùng trong lòng 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 như *CYP89A2* tăng 11,14 lần, *CYP94A1* tăng 10,01 lần, *UGT73B4* tăng 15,35 lần. Những kết quả đó 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 xây dựng quy trình xử lý cao chiết tổng số thông qua các bước loại bỏ thành phần kém phân cực và kỵ nước, thu được phân đoạn hòa tan

tốt trong methanol và DMSO, phù hợp cho phân tích HPLC và các thử nghiệm hoạt tính sinh học.

5. Gypenoside và cao chiết từ tế bào huyền phù *Gynostemma pentaphyllum* thể hiện hoạt tính sinh học đáng chú ý, trong đó gypenoside có khả năng ức chế dòng tế bào ung thư gan HepG2 (IC_{50} khoảng 86,7 $\mu\text{g/mL}$), đồng thời cao chiết có tác dụng bảo vệ tế bào tinh hoàn, cải thiện quá trình sinh tinh và tăng nồng độ testosterone trong mô hình chuột xử lý nhiệt.

KIẾN NGHỊ

Cần tiếp tục mở rộng quy mô nuôi cấy và tối ưu quy trình sản xuất gypenoside trên hệ thống pilot nhằm đánh giá tính ổn định của sinh trưởng, khả năng tích lũy hoạt chất và tính khả thi của việc ứng dụng hệ nuôi cấy tế bào trong sản xuất nguồn nguyên liệu dược liệu.

Nghiên cứu chức năng của các gene *CYP* và *UGT* tham gia con đường sinh tổng hợp gypenoside, kết hợp với các chiến lược xử lý elicitor và nuôi cấy quy mô lớn nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất gypenoside từ tế bào huyền phù *Giáo cổ lam*.

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 KWJAJotC (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 EJJotFP (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.

BẢN NHẬN XÉT ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Họ tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Tên luận án: *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

Người hướng dẫn:

1. PGS.TS. Trần Quốc Dung, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế
2. TS. Hoàng Tấn Quảng, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Quá trình thực hiện luận án của nghiên cứu sinh

Qua quá trình thực hiện luận án, NCS Đặng Ngọc Sáng đã thể hiện được năng lực tự độc lập nghiên cứu, nghiêm túc trung thực với số liệu đạt được, tự cố gắng nỗ lực, khắc phục các khó khăn khách quan để hoàn thành luận án.

Quan hệ với giáo viên hướng dẫn, các bạn bè và đồng nghiệp tốt, có tinh thần học hỏi không ngại khó.

NCS hoàn thành tốt luận án theo các yêu cầu đặt ra.

2. Chất lượng và ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Luận án là nghiên cứu đầu tiên xây dựng được quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù và quy trình sản xuất gypenoside thông qua nuôi cấy tế bào huyền phù cây giảo cổ lam có sử dụng elicitor; Lần đầu tiên công bố khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột của cao chiết tế bào cây giảo cổ lam. Đồng thời đã đánh giá được mức độ phiên mã của 12 gen 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. Luận án đã đạt được những kết quả nghiên cứu tốt và đã được xuất bản trên tạp chí quốc tế uy tín SCIE/Scopus và các tạp chí trong nước.

Kết quả nghiên cứu của đề tài là những 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, 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. Đây là 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.

3. Kết luận

Công trình của NCS Đặng Ngọc Sáng đã đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ ngành Sinh học. Chúng tôi đề nghị cho phép nghiên cứu sinh được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án.

Thành phố Huế, ngày 28 tháng 1 năm 2026

Xác nhận của tập thể hướng dẫn



PGS.TS. Trần Quốc Dung

TS. Hoàng Tấn Quảng

QUYẾT ĐỊNH
Về việc thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế
GIÁM ĐỐC ĐẠI HỌC HUẾ

Căn cứ Nghị định số 30/CP ngày 04 tháng 4 năm 1994 của Chính phủ về việc thành lập Đại học Huế;

Căn cứ Thông tư số 10/2020/TT-BGDĐT ngày 14 tháng 5 năm 2020 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của đại học vùng và các cơ sở giáo dục đại học thành viên;

Căn cứ Nghị quyết số 36/NQ-HĐĐH ngày 20 tháng 5 năm 2022 của Hội đồng Đại học Huế về việc ban hành Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế; Nghị quyết số 50/NQ-HĐĐH ngày 23 tháng 11 năm 2023 của Hội đồng Đại học Huế về việc sửa đổi, bổ sung một số điều của Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế và Nghị quyết số 14/NQ-HĐĐH ngày 19 tháng 3 năm 2025 của Hội đồng Đại học Huế về việc sửa đổi một số điều của Quy chế tổ chức và hoạt động của Đại học Huế;

Căn cứ Thông tư số 08/2017/TT-BGDĐT ngày 04 tháng 4 năm 2017 của Bộ trưởng Bộ Giáo dục và Đào tạo về việc ban hành Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ;

Căn cứ Quyết định số 1695/QĐ-ĐHH ngày 20 tháng 12 năm 2019 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy định về tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ tại Đại học Huế;

Căn cứ Quyết định số 278/QĐ-ĐHH ngày 16 tháng 3 năm 2021 của Giám đốc Đại học Huế về việc công nhận nghiên cứu sinh khoá năm 2021 của Đại học Huế và Quyết định số 47/QĐ-VCNSH ngày 30 tháng 3 năm 2021 của Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học về việc giao đề tài luận án và cử người hướng dẫn nghiên cứu sinh khoá năm 2021 của Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế;

Theo đề nghị của Trưởng Ban Đào tạo và Công tác sinh viên.

QUYẾT ĐỊNH:

Điều 1. Thành lập Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế với 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)”.
٢٤

Của Nghiên cứu sinh: **Đặng Ngọc Sáng**

Ngành: **Sinh học**

Mã số: **9420101**

(Danh sách thành viên Hội đồng kèm theo Quyết định này)

Điều 2. Hội đồng có trách nhiệm đánh giá luận án theo đúng Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ của Bộ Giáo dục và Đào tạo và Quy định đào tạo trình độ tiến sĩ của Đại học Huế.

Điều 3. Chánh Văn phòng Đại học Huế, Trưởng các Ban: Đào tạo và Công tác sinh viên; Tổ chức cán bộ; Kế hoạch, Tài chính và Cơ sở vật chất; Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế và các Ông (Bà) có tên ở Điều 1 chịu trách nhiệm thi hành Quyết định này./.

Nơi nhận:

- Như Điều 3;

- Lưu: VT, ĐTCTSV, HLQC.

KT. GIÁM ĐỐC
PHÓ GIÁM ĐỐC

Bùi Văn Lợi

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC HUẾ

DANH SÁCH HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

(Ban hành kèm theo Quyết định số: 174 /QĐ-ĐHH ngày 30 tháng 01 năm 2026
của Giám đốc Đại học Huế)

Cho luận án của Nghiên cứu sinh: **Đặng Ngọc Sáng**

Đơn vị đào tạo: **Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế**

Người hướng dẫn:

- **PGSTS. Trần Quốc Dung, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế**
- **TS. Hoàng Tấn Quảng, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế**

TT	Họ và tên	Đơn vị công tác	Chức trách trong Hội đồng
1	GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Chủ tịch
2	PGS.TS. La Việt Hồng	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	Phản biện 1
3	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh	Phản biện 2
4	PGS.TS. Đinh Trường Sơn	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	Phản biện 3
5	TS. Nguyễn Bảo Hưng	Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế	Thư ký
6	PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng	Trường Đại học Đà Lạt	Ủy viên
7	PGS.TS. Nguyễn Xuân Huy	Đại học Huế	Ủy viên

Danh sách gồm 07 thành viên./.



Huế, ngày tháng năm 2026

**DANH SÁCH THÀNH VIÊN THAM DỰ
HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ**

Cho luận án của nghiên cứu sinh:

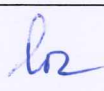
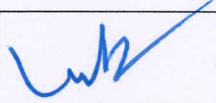
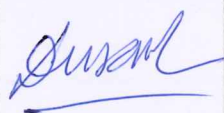
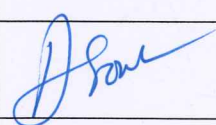
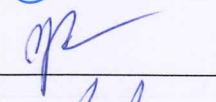
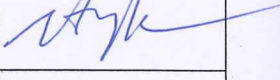
Về đề tài: **Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)**

Ngành: **Sinh học**

Mã số: 9420101

Đơn vị đào tạo: Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

Hội đồng họp: Ngày 13 tháng 3 năm 2026

STT	Họ và tên	Đơn vị công tác	Chức trách trong Hội đồng	Chữ ký
1.	GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Chủ tịch	
2.	PGS.TS. La Việt Hồng	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	Phản biện 1	
3.	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh	Phản biện 2	
4.	PGS.TS. Đinh Trường Sơn	Học viện Nông nghiệp Việt Nam	Phản biện 3	
5.	TS. Nguyễn Bảo Hưng	Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế	Thư ký	
6.	PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng	Trường Đại học Đà Lạt	Ủy viên	
7.	PGS.TS. Nguyễn Xuân Huy	Đại học Huế	Ủy viên	

Danh sách này có 07 thành viên./.

Huế, ngày 16 tháng 3 năm 2026

**NGHỊ QUYẾT CỦA HỘI ĐỒNG
ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ**

Tên 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)**

Nghiên cứu sinh: **Đặng Ngọc Sáng**

- Khóa: **2021**
- Ngành: **Sinh học**
- Mã số: **9420101**

Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế, được thành lập theo quyết định số 174/QĐ-ĐHH ngày 30 tháng 01 năm 2026 của Giám đốc Đại học Huế đã họp vào lúc 14h00, ngày 13/3/2026 tại Đại học Huế. Sau khi thảo luận, Hội đồng đã thống nhất với quyết nghị về luận án như sau:

1. Kết luận về tính cấp thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Giảo cổ lam là loài dược liệu có giá trị cao, chứa nhiều hợp chất saponin triterpen (gypenoside) có hoạt tính sinh học đa dạng như chống oxy hóa, chống ung thư, điều hòa miễn dịch và bảo vệ gan. Tuy nhiên, nguồn dược liệu tự nhiên đang bị khai thác quá mức và có nguy cơ suy giảm trong tự nhiên. Trong bối cảnh đó, việc nghiên cứu nuôi cấy tế bào huyền phù để sản xuất hợp chất thứ cấp được xem là hướng tiếp cận hiện đại, cho phép chủ động nguồn nguyên liệu sinh học, giảm áp lực khai thác tự nhiên và có khả năng mở rộng quy mô sản xuất.

2. Kết luận về phương pháp nghiên cứu, mức độ chính xác của dữ liệu sử dụng

Luận án sử dụng nhiều phương pháp nghiên cứu hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu, bao gồm: nuôi cấy callus và nuôi cấy tế bào huyền phù; nuôi cấy bioreactor 12 L; phân tích hợp chất bằng HPLC; phân tích biểu hiện gene bằng kỹ thuật sinh học phân tử; thử nghiệm hoạt tính sinh học in vitro và in vivo.

Các phương pháp này phù hợp với mục tiêu nghiên cứu và được áp dụng khá đầy đủ. Việc áp dụng phương đó tạo ra những kết quả có độ chính xác và độ tin cậy cao.

3. Kết luận về những thành công và đóng góp mới của luận án về lý luận và thực tiễn

Luận án đã lần đầu tiên xây dựng được hệ nuôi cấy tế bào huyền phù Giảo cổ lam trên môi trường MS bổ sung KIN và IBA với điều kiện nuôi cấy tối ưu tại Việt Nam.

Luận án đã xác định được ảnh hưởng của các elicitor (SA, MeJA, YE) đến quá trình tích lũy gypenoside.

Luận án lần đầu tiên xác định và phân tích biểu hiện của các gen CYP và UGT tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside.

Luận án đã làm rõ cơ chế điều hòa sinh tổng hợp triterpen saponin ở thực vật bậc cao, cung cấp dữ liệu mới về mối quan hệ giữa tác nhân kích kháng – biểu hiện gen – tích lũy hợp chất thứ cấp.

4. Kết luận về sự phù hợp của tên đề tài với nội dung và mã số ngành:

Tên đề tài phản ánh sự phù hợp với nội dung nghiên cứu; có mục tiêu nghiên cứu rõ ràng, phù hợp với ngành Sinh học, mã số: 9420101.

5. Kết luận về các hạn chế và yêu cầu chỉnh sửa

Luận án còn một số thiếu sót cần bổ sung chỉnh sửa về hình thức và nội dung theo biên bản của hội đồng và các góp ý của các thành viên hội đồng.

6. Kết luận về việc trả lời câu hỏi, trình độ hiểu biết của nghiên cứu sinh

Nghiên cứu sinh đã trả lời đầy đủ những câu hỏi mà các thành viên hội đồng đặt ra. Các thành viên hội đồng đánh giá cao sự hiểu biết NCS trong lĩnh vực nghiên cứu mà NCS đang theo đuổi.

7. Kết luận chung

- Kết quả bỏ phiếu:

- Kết quả bỏ phiếu:

Có 07/07 phiếu tán thành luận án.

Có 0/07 phiếu không tán thành luận án.

- Kết luận về giá trị khoa học và thực tiễn của luận án, kết luận về trình độ và năng lực của nghiên cứu sinh:

Đảm bảo tính khoa học và thực tiễn

Nghiên cứu sinh đủ trình độ và năng lực để nhận bằng Tiến sĩ

- Kết luận yêu cầu về chỉnh sửa của luận án:

+ Cần chỉnh sửa các lỗi chính tả, lỗi văn bản như góp ý.

+ Các tài liệu tham khảo nên được cân trọng rà soát về cách thức tham khảo, nơi tham khảo và định dạng danh sách tham khảo. Liệt kê đầy đủ các chữ viết tắt.

- Nội dung:

Nhìn chung, luận án vẫn còn 1 số hạn chế nhất định, ví dụ như thiếu quy trình nuôi cấy tế bào tích lũy gypenoside.

Luận án cần chỉnh sửa theo các ý kiến của hội đồng góp ý nên ra trong các bản nhận xét.

+ *Phần tổng quan*

Chỉnh sửa theo ý kiến của hội đồng

+ *Phần phương pháp*

Viết theo các nội dung nghiên cứu

Bổ sung và chỉnh sửa các phương pháp như góp ý

+ *Phần kết quả:*

Bổ sung và chỉnh sửa theo ý kiến hội đồng

+ *Phần kết luận và kiến nghị*

Rà soát, viết ngắn gọn lại kết luận bám sát các vấn đề đặt ra tại mục tiêu nghiên cứu

- **Kết luận về việc đề nghị cấp bằng tiến sĩ và nhận học vị tiến sĩ:**

- Hội đồng đề nghị Giám đốc Đại học Huế công nhận học vị và cấp bằng tiến sĩ chuyên ngành Sinh học cho nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng.

Thư ký Hội đồng

Nguyễn Bảo Hưng

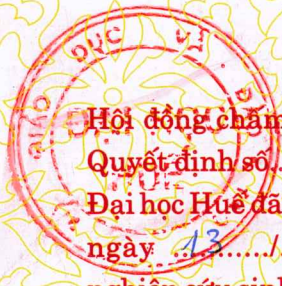
Chủ tịch Hội đồng

Nguyễn Hoàng Lộc

Xác nhận của đơn vị đào tạo

PGS.TS. Trương Thị Hồng Hà

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**



Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 174...../QĐ-DHH ngày 30/01/2026 của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế ngày 13...../.....3...../2026..... để đánh giá Luận án tiến sĩ của

nhà nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sương

với đề tài Nghiên cứu thu nhận và xác định

hoạt tính của gypenoside từ nước cây tè bèo

cây gạo cổ lam (*Cynostemma pentaphyllum*

(Thunb.) Makino)

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 174...../QĐ-ĐHH ngày 30...../...../2026..... của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại..... phòng Tập Đại học Huế..... ngày 13/01...../...../2026..... để đánh giá Luận án tiến sĩ của

nhà nghiên cứu sinh..... Đặng Ngọc Sang..... với đề tài..... Nguồn cấu trúc nhân và xác định hoạt tính

củ Gynenoside từ nuôi cấy tế bào cây gỗ c' tam
(Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino.).....

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒



PHIẾU ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo
Quyết định số/QĐ-ĐHH ngày/...../2026 của Giám đốc
Đại học Huế đã họp tại Đại học Huế
ngày/...../2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của
nghiên cứu sinh.....

với đề tài Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính
của gypenoside hệ nuôi cấy tế bào cây ginseng s'lam
(*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 174 /QĐ-ĐHH ngày 30/1 /2026 của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại Phòng I1 - Đại học Huế

ngày 13 / 3 /2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh ĐẶNG NGỌC SÁNG

với đề tài Nghiên cứu thu nhận và xác định

hoạt tính của Gynenoside từ mủ cây

tế bào quả cây lòn (Gynostemma penta-

phyllum (Thunb.) Makino)

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo
Quyết định số 174 /QĐ-ĐHH ngày 30 / 1 /2026 của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại Phòng họp T.1
ngày 13 / 3 /2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của

nhà nghiên cứu Đặng Ngọc Sang

với đề tài Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính

Củ gypenoside từ nước cây tĩ' bèo cây già

cổ' lam (Gynostemma pentaphyllum (Thunb.)

Makino).

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 174 /QĐ-ĐHH ngày 30 / 01 /2026 của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại Phòng Họp T.1 ngày 13 / 03 /2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của

nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sông

với đề tài Nghiên cứu ảnh hưởng của nhân tố xác định

hoạt tính của gypenoside từ loài cây tế bào

cây Giảo cổ lam (Gynostemma pentaphyllum

(Thunb.) Makino)

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒

**PHIẾU ĐÁNH GIÁ
LUẬN ÁN TIẾN SĨ**

Hội đồng chấm Luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo Quyết định số 174 /QĐ-ĐHH ngày 30 /01 /2026 của Giám đốc

Đại học Huế đã họp tại Phòng I.1 Đại học Huế ngày 13 /3 /2026 để đánh giá Luận án tiến sĩ của nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng

với đề tài Nghiên cứu ảnh hưởng của các hợp chất terpenoid từ nước cây tỏi hương (Allium graveolens) đối với sự phát triển của nấm mốc (Gyromitra melleocephala) (Thảo) Makino

Ý KIẾN ĐÁNH GIÁ

(Đánh dấu x vào ô trống cạnh những chữ phù hợp với ý kiến của mình)

KHÔNG TÁN THÀNH ☐

TÁN THÀNH ☒



BIÊN BẢN KIỂM PHIẾU

(Dùng trong buổi đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế)

Ngày 11 tháng 3 năm 2026, Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo quyết định số 174/QĐ-ĐHH ngày 30 tháng 01 năm 2026 của Đại học Huế cho nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng, ngành Sinh học đã bầu ra Ban kiểm phiếu với thành phần như sau:

- 1/ ... Phó TS. Nguyễn Xuân Huy: Trưởng Ban
- 2/ ... Phó TS. La Việt Hồng: Ủy viên
- 3/ ... Phó TS. Hoàng Thanh Tùng: Ủy viên

Ban kiểm phiếu đã tiến hành kiểm phiếu với kết quả như sau:

Số phiếu phát ra: <u>07</u>	Số phiếu thu vào: <u>07</u>
Số phiếu hợp lệ: <u>07</u>	Số phiếu không hợp lệ: <u>0</u>
Số phiếu tán thành: <u>07</u>	Số phiếu không tán thành: <u>0</u>

ỦY VIÊN

(ký và ghi họ tên)

La Việt Hồng

ỦY VIÊN

(ký và ghi họ tên)

Hoàng Thanh Tùng

TRƯỞNG BAN

(ký và ghi họ tên)

Nguyễn Xuân Huy

Huế, ngày 16 tháng 3 năm 2026

BIÊN BẢN
HỌP HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

1. Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Khoá: 2021

Ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên 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. Thành phần hội đồng: Theo quyết định số 174/QĐ-ĐHH ngày 30 tháng 01 năm 2026 của Giám đốc Đại học Huế gồm các thành viên sau:

	Họ và tên	Đơn vị công tác	Chức trách trong Hội đồng
1.	GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc	Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế	Chủ tịch
2.	PGS.TS. La Việt Hồng	Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2	Phản biện 1
3.	PGS.TS. Nguyễn Du Sanh	Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia TP. Hồ Chí Minh	Phản biện 2
4.	PGS.TS. Đinh Trường Sơn	Học viện Nông nghiệp Việt Nam,	Phản biện 3
5.	TS. Nguyễn Bảo Hưng	Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế	Thư ký
6.	PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng	Viện Bảo vệ thực vật, Viện KH Nông nghiệp Việt Nam	Ủy viên
7.	PGS.TS. Nguyễn Xuân Huy	Đại học Huế	Ủy viên

Số thành viên có mặt: 07 / 07 thành viên.

3. Diễn biến chi tiết buổi bảo vệ như sau:

3.1. Khai mạc buổi bảo vệ luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế

Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế được thành lập theo quyết định số 174/QĐ-ĐHH ngày 30/01/2026 của Giám đốc Đại học Huế tuyên bố lý do, giới thiệu đại biểu và đọc quyết định thành lập Hội đồng.

Giới thiệu chủ tịch hội đồng - GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc, điều khiển buổi đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế.

3.2. Chủ tịch Hội đồng thông qua chương trình làm việc

Chủ tịch Hội đồng thông báo danh sách thành viên Hội đồng có mặt 07 / 07 thành viên, như vậy Hội đồng đủ điều kiện cho buổi bảo vệ làm việc.

Chủ tịch Hội đồng thông qua chương trình làm việc của Hội đồng và toàn bộ thành viên Hội đồng đã đồng ý về chương trình làm việc.

3.3. Hội đồng thông qua điều kiện bảo vệ

Thư ký hội đồng công bố các điều kiện để bảo vệ của nghiên cứu sinh Nguyễn Quang Hoàng Vũ như sau:

- Nghiên cứu sinh đã hoàn thành chương trình đào tạo theo đúng quy định tại khoản 2, 3 Điều 5 của Quyết định số 1695/QĐ-ĐHH ngày 20 tháng 12 năm 2019 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy định về đào tạo trình độ tiến sĩ, cụ thể nghiên cứu sinh đã hoàn thành:

STT	Các học phần/ chuyên đề/ tiêu luận tổng quan	Mã số	Số tín chỉ	Điểm TB
05 học phần bắt buộc				
1	Hóa sinh hiện đại	HPBSSH-04	2	9,1
2	Vì sinh vật học nâng cao	HPBSSH-09	2	9,6
3	Công nghệ DNA tái tổ hợp	HPBSSH-05	2	8,2
4	Công nghệ sinh học nâng cao	HPBSSH-01	2	9,5
5	Sinh học tế bào	HPBSSH-03	2	8,5
02 học phần bắt buộc				
1	Di truyền phân tử và hệ gen	HPTSSH-01	2	8,6
2	Bảo tồn đa dạng sinh học	HPTSSH-02	2	8,8
02 học phần tự chọn				
1	Sinh lý thực vật ứng dụng	HPTSSH-07	2	9,1
2	Tin sinh học ứng dụng	HPTSSH-11	2	9,4
03 chuyên đề				
1	Chẩn đoán phân tử	CDTSSH-05	2	9,7

2	Ứng dụng công nghệ tế bào trong sản xuất các hợp chất dược liệu	CDTSSH-12	2	8,8
3	Công nghệ sinh học nấm dược liệu	CDTSSH-13	2	9,3
01 tiểu luận tổng quan				
1	Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giáo cổ lam (<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino)		2	9,4

- Luận án đáp ứng đầy đủ yêu cầu ở Điều 17 của Quyết định số 1695/QĐ-ĐHH ngày 20 tháng 12 năm 2019 của Giám đốc Đại học Huế về việc ban hành Quy định về tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ tại Đại học Huế.

- Tập thể hướng dẫn đã có văn bản khẳng định chất lượng của luận án và đồng ý cho nghiên cứu sinh được bảo vệ luận án trước hội đồng cấp Đại học Huế.

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.

4. **Đặng Ngọc Sáng**, Nguyễn Quang Hoàng Vũ, Nguyễn Thị Nguyên Mẫn, Nguyễn Hữu Thuần 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 giáo 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 giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*). Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn 134(3A): 119-129

Các nội dung đăng báo trên đúng với các nội dung trong luận án.

3.4. Nghiên cứu sinh trình bày luận án

Nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng trình bày tóm tắt nội dung luận án tiến sĩ trong thời gian 30 phút.

3.5. Các ý kiến đánh giá và góp ý của thành viên Hội đồng

Chi tiết các ý kiến của thành viên hội đồng xem bản nhận xét của các thành viên hội đồng đính kèm biên bản này. Sau đây là những nhận xét cơ bản của các thành viên hội đồng:

- Ý nghĩa khoa học của đề tài luận án:

+ Đề tài có ý nghĩa khoa học thể hiện:

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thumb.) Makino) là một dược liệu quý có giá trị cao trong y học cổ truyền cũng như hiện đại, hiện đã được xếp vào nhóm cây thuốc nguy cấp trong Sách đỏ Việt Nam (2007), loài này được ghi nhận với nhiều tác dụng dược lý quan trọng như bảo vệ tế bào gan, ức chế sự phát triển của khối u, chống viêm và điều hòa đường huyết. Thành phần hoạt chất chủ yếu trong Giảo cổ lam là gypenosid, một nhóm saponin triterpenoid có cấu trúc và hoạt tính sinh học tương đồng với ginsenosid trong nhân sâm (*Panax ginseng*). Nhờ khả năng sinh trưởng mạnh, dễ thích nghi với điều kiện tự nhiên và có thời gian thu hoạch ngắn, Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy tiềm năng.

Về ý nghĩa khoa học, đề tài đã xây dựng được quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giảo cổ lam và quy trình sản xuất gypenoside có sử dụng các elicitor. Công trình cung cấp dữ liệu mới về cơ chế sinh tổng hợp và biểu hiện gen (CYP, UGT) liên quan đến tổng hợp gypenoside, đồng thời lần đầu tiên công bố khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn và hoạt tính ức chế tế bào ung thư của cao chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam. Những kết quả này góp phần làm rõ cơ sở khoa học của việc tăng cường tích lũy hợp chất thứ cấp bằng kỹ thuật nuôi cấy tế bào thực vật, có giá trị tham khảo và ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực sinh học phân tử và công nghệ dược liệu.

+ Đề tài có ý nghĩa thực tiễn thể hiện:

Về ý nghĩa thực tiễn, kết quả của luận án có thể ứng dụng trong sản xuất gypenoside quy mô phòng thí nghiệm, góp phần giảm khai thác tự nhiên, chủ động nguồn nguyên liệu sạch, an toàn và ổn định cho ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm chức năng. Quy trình được thiết lập có thể mở rộng quy mô công nghiệp, đồng thời là cơ sở khoa học cho các nghiên cứu tiếp theo về sinh tổng hợp và tách chiết hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào thực vật.

- Sự hợp lý, độ tin cậy và tính hiện đại của các phương pháp nghiên cứu:

Các phương pháp nghiên cứu, sử dụng trong luận án đều là phương pháp chuẩn, phù hợp gồm: i) Nhóm phương pháp nuôi cấy tế bào như nuôi cấy callus (mô sẹo), khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố nuôi cấy trong bioreactor; ii) Nhóm phương pháp

hóa sinh và phân tích hợp chất như tách chiết, định lượng gypenoside sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC); iii) Nhóm phương pháp xử lý elicitor; iv) Nhóm phương pháp sinh học phân tử như phân tích biểu hiện gen; phân tích trình tự gen và xây dựng cây phát sinh loài; giải trình tự Sanger sequencing, phân tích đồng dạng, dự đoán chức năng enzyme (tín sinh học); v) Nhóm phương pháp thử nghiệm hoạt tính sinh học như phân tích độc tính tế bào (cytotoxicity assays), Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột stress nhiệt; vi) Phương pháp xử lý và phân tích số liệu kết quả được tính trung bình $\pm$ sai số chuẩn, phân tích ANOVA và Duncan's test ($p < 0,05$) bằng SPSS v20.0. Vật liệu nghiên cứu nêu trong luận án có nguồn gốc rõ ràng, Phòng thí nghiệm thực hiện luận án có nguồn gốc, địa chỉ rõ ràng, tin cậy.

- Đánh giá kết quả đạt được, những đóng góp mới và giá trị của những đóng góp đó:

Luận án “là công trình có tính mới, có hệ thống, và đạt nhiều kết quả nghiên cứu đáng ghi nhận. Kết quả của luận án có giá trị khoa học và thực tiễn và đóng góp thiết thực cho phát triển khoa học công nghệ sinh học dược liệu của Việt Nam.

Tác giả đã lần đầu tiên xây dựng được quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào cây Giảo cổ lam tại Việt Nam, xác định các điều kiện tối ưu cho sự sinh trưởng và tích lũy gypenoside, đạt hàm lượng 46,87 mg/g khô sau 18 ngày nuôi cấy. Đặc biệt, việc ứng dụng kết hợp các elicitor (MeJA, SA, YE) giúp hàm lượng gypenoside tăng lên 103,81 mg/g khô, cao gấp 2,2 lần so với đối chứng và 2,8 lần so với mẫu tự nhiên.

Ngoài ra, luận án lần đầu tiên xác định và phân tích biểu hiện của các gen CYP và UGT tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside, đồng thời chứng minh hoạt tính sinh học của chế phẩm gypenoside in vitro, thể hiện khả năng ức chế tế bào ung thư gan HepG2 và bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột stress nhiệt.

Luận án đã làm rõ cơ chế điều hòa sinh tổng hợp triterpen saponin ở thực vật bậc cao, cung cấp dữ liệu mới về mối quan hệ giữa tác nhân kích kháng – biểu hiện gen – tích lũy hợp chất thứ cấp, góp phần hoàn thiện hướng tiếp cận công nghệ tế bào thực vật trong sản xuất dược chất tự nhiên. Đây là những đóng góp quan trọng cho chuyên ngành Công nghệ sinh học dược liệu và sinh học phân tử thực vật.

Về đóng góp cho sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống: Kết quả nghiên cứu luận án đã hình thành công nghệ nền cho sản xuất gypenoside quy mô phòng thí nghiệm, tạo nguồn nguyên liệu ổn định, sạch và bền vững thay thế khai thác tự nhiên. Luận án có ý nghĩa thực tiễn trong phát triển dược phẩm, thực phẩm chức năng, bảo tồn đa dạng sinh học và phát triển kinh tế sinh học vùng trồng dược liệu.

- Những ưu điểm và nhược điểm, thiếu sót, những điểm cần bổ sung và sửa chữa:

Luận án vẫn còn 1 số tồn tại nhất định, và đã được các thành viên hội đồng nêu ra trong buổi bảo vệ thông qua các ý kiến nhận xét. Nghiên cứu sinh cần nghiên cứu cẩn thận những ý kiến của 7 thành viên hội đồng, và bám sát 7 bản nhận xét để chỉnh sửa hoàn thiện luận án.

- Nhận xét về chất lượng các bài báo khoa học:

Với kết quả đề tài, nghiên cứu sinh đã công bố 5 công trình trên các tạp chí uy tín trong và ngoài nước. Đảm bảo chất lượng.

Bao gồm:

- 1 Bài báo trên Molecules (SCI Q1) về tác động của elicitor đối với nuôi cấy với (đồng tác giả)
- 1 Bài nghiên cứu sinh khối và ức chế tế bào ung thư trên Research Journal of Biotechnology (Scopus, Q4) (đồng tác giả)
- 1 Bài về sản xuất gypenoside và phục hồi sinh tinh trên Avicenna Journal of Medical Biotechnology (đồng tác giả)
- 1 Báo cáo tại Hội nghị Sinh lý thực vật Việt Nam (tác giả chính)
- 1 Bài đăng trên Tạp chí Khoa học Đại học Huế (tác giả chính)

- Kết luận:

nhìn chung luận án đáp ứng được yêu cầu của 1 luận án tiến sĩ, tuy nhiên cần chỉnh sửa theo như ý kiến nhận xét hội đồng trước khi bảo vệ ở cấp Đại học Huế.

3.6. Nghiên cứu sinh giải thích các ý kiến của các thành viên Hội đồng:

Nghiên cứu sinh đã trả lời đầy đủ những câu hỏi mà các thành viên hội đồng đặt ra. Các thành viên hội đồng đánh giá cao sự hiểu biết NCS trong lĩnh vực nghiên cứu mà NCS đang theo đuổi.

3.7. Hội đồng họp kín đánh giá kết quả

- Hội đồng bầu ban kiểm phiếu và nhất trí bầu:

PGS.TS Nguyễn Xuân Huy Trưởng ban

PGS.TS La Việt Hồng Ủy viên

PGS.TS Hoàng Thanh Tùng Ủy viên

- Kết quả bỏ phiếu:

Có 07/07 phiếu tán thành luận án.

Có 0/07 phiếu không tán thành luận án.

- Ban kiểm phiếu thông qua kết quả trước Hội đồng và đã được toàn thể nhất trí.

(có biên bản kiểm phiếu đính kèm theo biên bản này)

- Hội đồng thông qua nghị quyết với các nội dung sau:

+ Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án:

Về ý nghĩa khoa học: đề tài đã xây dựng được hệ nuôi cấy tế bào huyền phù Giáo cổ lam được quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giáo cổ lam sản xuất gypenoside có sử dụng các elicitor. Công trình cung cấp dữ liệu mới về cơ chế sinh tổng hợp và biểu hiện gen (CYP, UGT) liên quan đến tổng hợp gypenoside, đồng thời

lần đầu tiên công bố khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn và hoạt tính ức chế tế bào ung thư của cao chiết tế bào huyền phù Giảo cổ lam.

Về ý nghĩa thực tiễn: kết quả của luận án có thể ứng dụng trong sản xuất gypenoside quy mô phòng thí nghiệm, góp phần giảm khai thác tự nhiên, chủ động nguồn nguyên liệu sạch, an toàn và ổn định cho ngành công nghiệp dược phẩm và thực phẩm chức năng.

+ *Độ tin cậy của các luận điểm khoa học nêu trong luận án:*

Các luận điểm khoa học nêu ra trong luận án đáng tin cậy

+ *Những điểm mới của công trình:*

Luận án đã lần đầu tiên xây dựng được hệ nuôi cấy tế bào huyền phù Giảo cổ lam trên môi trường MS bổ sung KIN và IBA với điều kiện nuôi cấy tối ưu tại Việt Nam.

Luận án đã xác định được ảnh hưởng của các elicitor (SA, MeJA, YE) đến quá trình tích lũy gypenoside.

Luận án lần đầu tiên xác định và phân tích biểu hiện của các gen CYP và UGT tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside.

Luận án đã làm rõ cơ chế điều hòa sinh tổng hợp triterpen saponin ở thực vật bậc cao, cung cấp dữ liệu mới về mối quan hệ giữa tác nhân kích kháng – biểu hiện gen – tích lũy hợp chất thứ cấp.

+ *Sự phù hợp của tên đề tài với nội dung và mã số ngành:*

- Tên đề tài phản ánh sự phù hợp với nội dung nghiên cứu; có mục tiêu nghiên cứu rõ ràng, phù hợp với ngành Sinh học, mã số: 9420101.

+ *Những thiếu sót cần chỉnh sửa:*

- Tên đề tài phản ánh sự phù hợp với nội dung nghiên cứu; có mục tiêu nghiên cứu rõ ràng, phù hợp với ngành Sinh học, mã số: 9420101.

+ *Đánh giá chung:*

Luận án nhìn chung bảo đảm tính khoa học và thực tiễn. Nội dung và hình thức của luận án đáp ứng được yêu cầu một luận án tiến sĩ theo quy định và có đủ điều kiện để bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế. Tuy nhiên, luận án còn một số thiếu sót cần bổ sung chỉnh sửa về hình thức và nội dung theo biên bản của hội đồng và các góp ý của các thành viên hội đồng.

3.8. Hội đồng công bố kết quả và nghị quyết

- Trưởng ban kiểm phiếu đọc biên bản kiểm phiếu và công bố kết quả đánh giá của Hội đồng.

- Chủ tịch Hội đồng đọc nghị quyết của hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế cho nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng.

- Hội đồng đề nghị Giám đốc Đại học Huế công nhận học vị và cấp bằng tiến sĩ chuyên ngành Sinh học cho nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng.

Thư ký Hội đồng



Nguyễn Bảo Hưng

Chủ tịch Hội đồng



Nguyễn Hoàng Lộc

Xác nhận của đơn vị đào tạo



PGS.TS. Trương Thị Hồng Hà

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: La Việt Hồng

Học hàm: PGS

Học vị: TS

Chuyên ngành: Sinh lý học thực vật

Cơ quan công tác: Trường Đại học Sư phạm Hà Nội 2

Chức trách trong hội đồng: phản biện 1

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên đề tài: **Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Luận án nghiên cứu về thu nhận và xác định hoạt tính của gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*). Giáo cổ lam là loài dược liệu có giá trị cao, chứa nhiều hợp chất saponin triterpen (gypenoside) có hoạt tính sinh học đa dạng như chống oxy hóa, chống ung thư, điều hòa miễn dịch và bảo vệ gan. Tuy nhiên, nguồn dược liệu tự nhiên đang bị khai thác quá mức và có nguy cơ suy giảm trong tự nhiên. Trong bối cảnh đó, việc nghiên cứu nuôi cấy tế bào huyền phù để sản xuất hợp chất thứ cấp được xem là hướng tiếp cận hiện đại, cho phép chủ động nguồn nguyên liệu sinh học, giảm áp lực khai thác tự nhiên và có khả năng mở rộng quy mô sản xuất. Đồng thời, việc ứng dụng elicitor nhằm kích thích tích lũy gypenoside và phân tích biểu hiện các gene liên quan đến sinh tổng hợp là hướng nghiên cứu có giá trị khoa học cao.

Do vậy, đề tài luận án có tính cần thiết, tính thời sự và ý nghĩa khoa học rõ ràng, góp phần bổ sung dữ liệu về công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật trong sản xuất hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Qua tổng quan tài liệu và nội dung trình bày trong luận án cho thấy đề tài không trùng lặp với các công trình đã công bố trước đây. Một số nghiên cứu trước đây mới chỉ dừng lại ở mức: tạo callus từ Giảo cổ lam hoặc khảo sát sơ bộ sinh trưởng tế bào.

Trong khi đó, luận án đã thực hiện một hệ thống nghiên cứu tương đối đầy đủ bao gồm: xây dựng hệ nuôi cấy tế bào huyền phù; tối ưu điều kiện nuôi cấy; khảo sát ảnh hưởng của elicitor; phân tích biểu hiện gene CYP và UGT; thử nghiệm hoạt tính sinh học của cao chiết.

Tài liệu tham khảo nhìn chung được trích dẫn khá đầy đủ. Tuy nhiên thứ tự trích dẫn trong danh mục tài liệu tham khảo cần được kiểm tra và sắp xếp lại theo thứ tự tăng dần, do hiện còn một số chỗ chưa thống nhất.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên 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)” phù hợp với nội dung nghiên cứu, phản ánh rõ các hướng nghiên cứu chính: nuôi cấy tế bào huyền phù; tăng cường sinh tổng hợp gypenoside; xác định hoạt tính sinh học của sản phẩm.

Nội dung luận án cũng phù hợp với chuyên ngành Sinh học (mã số 9420101), đặc biệt trong các lĩnh vực: công nghệ sinh học thực vật, sinh học phân tử, sinh hóa hợp chất thứ cấp.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng nhiều phương pháp nghiên cứu hiện đại, phù hợp với nội dung nghiên cứu, bao gồm: nuôi cấy callus và nuôi cấy tế bào huyền phù; nuôi cấy bioreactor 12 L; phân tích hợp chất bằng HPLC; phân tích biểu hiện gene bằng kỹ thuật sinh học phân tử; thử nghiệm hoạt tính sinh học in vitro và in vivo.

Các phương pháp này phù hợp với mục tiêu nghiên cứu và được áp dụng khá đầy đủ. Tuy nhiên trong phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, nên bổ sung thêm tiêu mục mô tả chi tiết hóa chất, thiết bị và hệ thống phân tích (ví dụ: model, các tham số/điều kiện vận hành hệ HPLC, hệ thống bioreactor, hãng cung cấp hóa chất chuẩn) để tăng tính chuẩn hóa của phương pháp.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã đạt được một số kết quả đáng chú ý: (i) Xây dựng được hệ nuôi cấy tế bào huyền phù Giáo cổ lam trên môi trường MS bổ sung KIN và IBA với điều kiện nuôi cấy tối ưu. (ii) Xác định được ảnh hưởng của các elicitor (SA, MeJA, YE) đến quá trình tích lũy gypenoside. (iii) Xác định mức độ biểu hiện của một số gene CYP và UGT liên quan đến con đường sinh tổng hợp gypenoside. (iv) Đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết đối với một số dòng tế bào ung thư và mô hình bảo vệ tinh hoàn chuột.

Các kết quả này có giá trị khoa học nhất định và góp phần cung cấp dữ liệu về sinh tổng hợp gypenoside, ứng dụng nuôi cấy tế bào thực vật trong sản xuất dược liệu.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

Ưu điểm: Luận án có bố cục rõ ràng, hợp lý; Phương pháp nghiên cứu đa dạng, kết hợp nuôi cấy tế bào, sinh học phân tử, hóa sinh, thử nghiệm hoạt tính sinh học. Kết quả nghiên cứu đa dạng, có chất lượng tốt, được trình bày tương đối chi tiết.

Các góp ý chỉnh sửa:

Về hình thức trình bày, danh mục tài liệu tham khảo cần được rà soát và sắp xếp lại theo thứ tự tăng dần của số trích dẫn, vì hiện vẫn còn một số vị trí trích dẫn chưa đúng thứ tự.

Ở Hình 1.3 (trang 22), đây là sơ đồ quy trình nghiên cứu nên phù hợp hơn khi đặt trong phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, do đó có thể chuyển sang mục 2.2 (trang 35). Đồng thời cần thay hình có độ phân giải cao hơn vì hình hiện còn mờ. Hình 1.4 (trang 24) cũng nên kiểm tra lại chất lượng hình ảnh để đảm bảo khả năng quan sát.

Trong phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (trang 34), nên bổ sung tiểu mục riêng về hóa chất, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu, trong đó nêu rõ thông tin các hệ thống phân tích như HPLC (hãng, model) hoặc hệ bioreactor. Ở Hình 2.1, cần bổ sung thanh tỷ lệ (scale bar).

Tiêu đề mục 2.2.1 (trang 35) nên chỉnh thành “Cảm ứng và nuôi cấy mô sẹo (callus)”. Ở trang 36, nên thay các thuật ngữ “trọng lượng khô”, “trọng lượng không đổi” bằng “khối lượng khô” và “khối lượng không đổi”.

Tại trang 37, cần bổ sung thông tin hãng cung cấp đối với chất chuẩn Ginsenoside Rb1 (98%). Khi sử dụng ký hiệu ORF (trang 40) nên viết đầy đủ khi xuất hiện lần đầu:

Open Reading Frame (ORF). Ngoài ra, câu mô tả về nguồn trình tự gene cần diễn đạt lại rõ ràng hơn và kèm trích dẫn tài liệu.

Trong Bảng 2.1 (trang 40) và Bảng 2.2 (trang 43), phần trình tự mỗi nên ghi rõ chiều (5'→3'). Ở mục 2.2.9 – Xử lý thống kê (trang 49), nên mô tả đầy đủ rằng thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với ba lần lặp lại.

Ở Hình 3.2 (trang 52), cần kiểm tra lại hình ảnh vì có dấu hiệu mẫu chưa thật sự đồng nhất với mô tả dòng huyền phù.

Trong Bảng 3.2 (trang 55), kết luận về môi trường tối ưu chưa đầy đủ vì cả hai công thức BAP 2,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L và KIN 2 mg/L + IBA 0,5 mg/L đều đạt cùng mức phân hạng thống kê cao nhất; do đó cần điều chỉnh phần nhận xét cho phù hợp với số liệu.

Trong Bảng 3.6 (trang 62), chú thích về việc thí nghiệm chỉ thực hiện một lần do hạn chế nguồn lực nên được diễn đạt lại hoặc chuyển sang phần phương pháp nghiên cứu.

Nội dung mục 3.2.1 nên chia thành hai tiểu mục riêng để rõ ràng hơn: nhóm elicitor MeJA, JA và nhóm YE, FOX. Ở Hình 3.5 (trang 68) cần bổ sung scale bar.

Đối với Hình 3.6 (trang 72), tiêu đề hình nên viết đầy đủ hơn, ví dụ: “Phổ HPLC xác định gypenoside trong tế bào huyền phù Giáo cổ lam dưới ảnh hưởng của elicitor”; đồng thời điều chỉnh cách hiển thị để các peak sắc ký dễ phân biệt hơn.

Trong mục 3.3.1 (trang 86) nên thay cụm từ “sản xuất cao chiết” bằng “thu nhận cao chiết” cho phù hợp với quy mô nghiên cứu. Ở Bảng 3.16 (trang 87) nên bổ sung thêm giá trị đối chứng dương (Ellipticine) để thuận tiện so sánh.

Cuối cùng, phần kết luận (trang 96) nên viết lại ngắn gọn, bám sát mục tiêu nghiên cứu, tránh các câu mang tính diễn giải.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Trong quá trình thực hiện luận án, nghiên cứu sinh đã công bố một số công trình khoa học liên quan trực tiếp đến nội dung nghiên cứu. Các công trình này bao gồm các bài báo đăng trên tạp chí khoa học quốc tế và trong nước, cũng như báo cáo tại hội nghị khoa học chuyên ngành. Các kết quả nghiên cứu về nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam, tích lũy gypenoside và đánh giá hoạt tính sinh học của cao chiết đã được công bố trên các tạp chí quốc tế như Research Journal of Biotechnology (ScopusQ4, ESCI), Molecules (SCIE) và Avicenna Journal of Medical Biotechnology (tạp chí có phản biện). Các bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về tích lũy sinh khối và gypenoside trong nuôi cấy tế bào, ảnh hưởng của các elicitor đến quá trình sinh tổng hợp gypenoside,

cũng như tiềm năng hoạt tính sinh học của cao chiết tế bào huyền phù đối với các mô hình bệnh học. Bên cạnh đó, một số kết quả của luận án cũng đã được công bố trên các tạp chí khoa học trong nước và kỷ yếu hội nghị chuyên ngành, bao gồm nghiên cứu về sản xuất sinh khối và gypenoside từ nuôi cấy tế bào *Giảo cổ lam* và nghiên cứu phân lập, dự đoán đặc điểm và phân tích mức độ phiên mã của gene CYP89A2 liên quan đến con đường sinh tổng hợp gypenoside. Các công trình này góp phần làm rõ cơ sở sinh học và tiềm năng ứng dụng của hệ nuôi cấy tế bào trong sản xuất hợp chất thứ cấp từ cây *Giảo cổ lam*.

Nhìn chung, các công trình đã công bố phản ánh khá đầy đủ các nội dung chính của luận án, góp phần khẳng định giá trị khoa học và tính cập nhật của các kết quả nghiên cứu.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

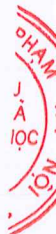
Luận án đã nghiên cứu một cách hệ thống về nuôi cấy tế bào cây *Giảo cổ lam* (*Gynostemma pentaphyllum*), từ xây dựng hệ thống nuôi cấy mô sẹo và tế bào huyền phù, khảo sát ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng và elicitor đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside, đến thu nhận cao chiết và đánh giá một số hoạt tính sinh học. Bên cạnh đó, luận án cũng bước đầu phân lập và phân tích đặc điểm của gene CYP89A2 liên quan đến con đường sinh tổng hợp gypenoside, góp phần làm rõ cơ sở sinh học của quá trình tích lũy hợp chất thứ cấp trong hệ nuôi cấy tế bào.

Các kết quả nghiên cứu của luận án có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, góp phần bổ sung dữ liệu về nuôi cấy tế bào và sinh tổng hợp gypenoside ở cây *Giảo cổ lam*, đồng thời mở ra khả năng ứng dụng hệ nuôi cấy tế bào trong sản xuất các hợp chất có hoạt tính sinh học. Một số kết quả chính của luận án đã được công bố trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế.

Tuy nhiên, luận án vẫn còn một số điểm cần chỉnh sửa về hình thức trình bày, cách diễn đạt và một số nội dung thảo luận như đã nêu ở trên. Những vấn đề này không làm thay đổi bản chất khoa học của luận án và có thể được tác giả chỉnh sửa, bổ sung trong quá trình hoàn thiện luận án.

Trên cơ sở các kết quả đạt được, có thể khẳng định rằng luận án đáp ứng các yêu cầu của một luận án tiến sĩ chuyên ngành Sinh học. Vì vậy, tôi đề nghị Hội đồng xem xét cho phép nghiên cứu sinh được bảo vệ luận án trước Hội đồng chấm luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ



(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng
đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Luận án được thực hiện công phu, có ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, đặc biệt trong nghiên cứu nuôi cấy tế bào và sinh tổng hợp gypenoside ở cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*). Các kết quả nghiên cứu cơ bản đáp ứng mục tiêu đề ra và đã được công bố một phần trên các tạp chí khoa học trong nước và quốc tế. Tuy luận án vẫn còn một số điểm cần chỉnh sửa, bổ sung về hình thức trình bày, thuật ngữ và một số nội dung thảo luận như đã nêu trong bản nhận xét. Các điểm này không ảnh hưởng đến kết quả và giá trị khoa học của luận án.

Vì vậy, tôi đề nghị Hội đồng cho phép nghiên cứu sinh chỉnh sửa, hoàn thiện luận án theo các góp ý và được bảo vệ luận án tiến sĩ trước Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế.

Xác nhận của cơ quan



PHÓ VIỆN TRƯỞNG
Dương Đình Chăng

Phú Thọ, ngày 5 tháng 3 năm 2026

Người nhận xét ký tên

PGS.TS. La Việt Hồng

11

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: Nguyễn Xuân Huy

Học hàm: PGS

Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh học

Cơ quan công tác: Văn phòng Đại học Huế

Chức trách trong hội đồng: Ủy viên

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên 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)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) là dược liệu quý, chứa hơn 180 loại gypenoside – có cấu trúc và hoạt tính tương tự ginsenoside trong nhân sâm, khiến nó trở thành nguồn dược liệu đầy triển vọng. Loài cây này có nhiều tác dụng dược lý quan trọng như bảo vệ gan, chống khối u, chống viêm, ổn định đường huyết và lipid máu. Tuy nhiên, nguồn Giảo cổ lam đang ngày càng khan hiếm và được xếp vào nhóm nguy cấp (EN) trong Sách đỏ Việt Nam. Do đó, nghiên cứu nuôi cấy tế bào huyền phù – đặc biệt kết hợp elicitor để tăng tích lũy gypenoside – trở nên cấp thiết, nhằm tạo nguồn nguyên liệu *in vitro* chủ động, hiệu quả cao, thay thế dần khai thác tự nhiên và góp phần bảo tồn loài cây quý này. Từ thực tiễn trên, đề tài “Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam” mang tính thời sự và khoa học cao.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án không sao chép hay trùng lặp nội dung với bất kỳ nghiên cứu độc lập nào trước.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Tên đề tài và nội dung luận án hoàn toàn phù hợp với Chuyên ngành: Sinh học; Mã số: 9420101

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng thiết kế thí nghiệm toàn diện, kết hợp nuôi cấy *in vitro*, phân tích phân tử, hóa sinh và thử nghiệm sinh học để thu nhận và đánh giá gypenoside hoặc cao chiết từ tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam. Các phương pháp nghiên cứu bao gồm: (1) Nuôi cấy callus và bổ sung chất điều hòa sinh trưởng (auxin và cytokinin phù hợp); (2) Nuôi cấy tế bào huyền phù (suspension culture); thử nghiệm điều kiện tối ưu và Kích thích sản xuất gypenoside bằng elicitor (Methyl jasmonate - MeJA 25–200 μ M; Salicylic acid - SA 25–200 μ M; biotic (Yeast extract - YE 1–5 g/L; *Fusarium* biomass – Fox và phối hợp đa elicitor (MeJA + SA + YE)). (3) Phân tích phân tử và gene *CYP* và *UGT* tham gia sinh tổng hợp gypenoside; định lượng mức độ biểu hiện (mRNA) của các gene này dưới tác động elicitor bằng kỹ thuật RT-qPCR với mỗi đặc hiệu. (4) Thu nhận và Chiết xuất cao methanol từ tế bào huyền phù, phân tích thành phần gypenoside bằng phương pháp màu (colorimetric) và HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) để định lượng tổng gypenoside và các thành phần cụ thể (Rb1, v.v.). (5) Đánh giá hoạt tính sinh học: Khả năng ức chế tế bào ung thư (*in vitro*) bằng thử nghiệm trên các dòng tế bào ung thư (HepG2, A549, Huh7, HL-60) bằng phương pháp MTT hoặc tương tự để đo IC50 và độc tính chọn lọc và khả năng bảo vệ tinh hoàn (in vivo): Thử nghiệm trên mô hình chuột bị tổn thương tinh hoàn do nhiệt (scrotal heat exposure), đánh giá phục hồi sinh tinh, nồng độ testosterone máu và thay đổi mô học. Số liệu được xử lý thống kê bằng ANOVA (SPSS 20.0); Duncan ($p < 0,05$) lặp 3 lần. Phương pháp nghiên cứu đảm bảo tính khoa học và độ lặp lại cao.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất,

kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án tiến sĩ đã có 04 đóng góp chính cho khoa học, đặc biệt trong lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật, sản xuất hợp chất thứ cấp từ nuôi cấy tế bào huyền phù và ứng dụng dược liệu của Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) như sau:

- Xây dựng và tối ưu hóa quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù quy mô lớn.
- Tăng cường tích lũy gypenoside bằng phối hợp elicitor đa loại với các thời điểm thời điểm bổ sung elicitor tối ưu và nồng độ phù hợp, giúp tăng hiệu suất sản xuất hợp chất thứ cấp mà không ảnh hưởng lớn đến sinh trưởng tế bào.
- Phân tích biểu hiện gene liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside: Xác định và dự đoán cấu trúc không gian, đặc điểm lý hóa của một số gene *CYP* (cytochrome P450, *CYP89A2*) và *UGT* (UDP-glycosyltransferase) – các enzyme trong chu trình tổng hợp gypenoside và định lượng mức độ biểu hiện mRNA (RT-qPCR) dưới tác động elicitor.
- Đánh giá hoạt tính sinh học toàn diện từ cao chiết tế bào huyền phù: Chống ung thư *in vitro* và bảo vệ tính hoàn chuột *in vivo*.

Các kết quả nghiên cứu có độ tin cậy.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

*** Ưu điểm của luận án:**

- Cấu trúc luận án logic, đáp ứng yêu cầu của luận án tiến sĩ
- Luận án có tính cấp thiết và ý nghĩa thực tiễn cao; số liệu và hình ảnh rõ ràng và có tính khoa học rõ.
- Luận án đã có tính mới trong đó có 04 đóng góp chính cho khoa học.
- Phương pháp hiện đại, đáng tin cậy: Kết hợp nuôi cấy tế bào, elicitor, bioreactor, RT-qPCR, HPLC, thử nghiệm *in vitro/in vivo* trên tế bào ung thư và trên chuột.
- Công bố chất lượng: Kết quả đã đăng trên tạp chí WoS/Scopus (Journal of Biotechnology 2022, Molecules 2022, Avicenna J Med Biotech 2023) và Tạp chí KH ĐH Huế 2025 – chứng tỏ tính khoa học và được công nhận.

*** Các nội dung cần chỉnh sửa:**

- Danh mục các từ viết tắt: cần rà soát và bổ sung các từ viết tắt của toàn bộ luận án: ví dụ viết tắt về các gen ở cây nhân sâm...
- Chương 1. Tổng quan về vấn đề nghiên cứu
 - + Trang 5 về những đóng góp mới của luận án: “Hoạt tính của cao chiết tế bào huyền phù đến đến các dòng tế bào ung thư *in vitro*” có phải tính mới không?
 - + Trang 10 câu cuối ở đoạn đầu tiên cần nói rõ một số tế bào nào đã được dùng để thử nghiệm là dòng tế bào ung thư nào?
 - + Bổ sung tổng quan về tác dụng dược lý của Giáo cổ lam đến bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột hoặc các hoạt chất liên quan đến tác dụng dược lý này để đề xuất nghiên cứu và có kết quả nghiên cứu ở các phần sau.
 - + Hình 1.3 (trang 22). Sơ đồ thí nghiệm thực hiện các bước chính của luận án nên đưa vào phần phương pháp nghiên cứu và bổ sung thêm phần tạo tế bào callus từ mẫu lá như mô tả ở phần 2.2.1. Nuôi cấy callus (trang 35).
- Chương 3.
 - + Phần 3.1.1. nên bổ sung thảo luận vì sao sinh khối tươi và khô đều cao nhất sau 20 ngày nuôi cấy nhưng tích lũy gypenoside lại đạt cao nhất (42,122 mg/g khô) vào ngày 18.
 - + Bảng 3.2 (trang 55). Vì sao khi nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và KIN lên tích lũy gypenoside thì hàm lượng tích lũy gypenoside (35, 850 mg/g khô và 40,9 mg/g khô tương ứng) lại thấp hơn điều kiện nuôi cấy chuẩn trong môi trường MS lỏng. Điều này cũng tương tự như khi nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn carbon ở Bảng 3.3 (trang 56).
 - + Ở mục 3.2 (trang 63) cần bổ sung thêm phần viết biện luận ở khổ đầu tiên để làm rõ ý về ảnh hưởng của elicitor đến sản xuất gypenoside từ nuôi cấy huyền phù.
 - + Ở mục 1.4.2 đã tổng quan 05 nhóm gene mã hóa enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside nhưng khi nghiên cứu thì chỉ nghiên cứu 02 họ gene Cytochrome P450 gene (*CYP* – 5 gene) và UDP- glucuronosyltransferase gene (*UGT* – 7 gene). Hãy bổ sung các lí do giải thích cho sự lựa chọn trên.
 - Bổ sung hình ảnh chạy điện di khi phân lập 12 gene trên vào phần 3.2.4.1. Khi sử dụng các cặp mồi từ Zhang Y và Cs 2021 thì có gặp khó khăn gì khi phân lập 12 gene này ở Giáo cổ lam được nghiên cứu không?

- Bảng 3.13 ở trang 82, kết quả phân tích của *CYP89A2* khác với kết quả công bố trên Kỷ yếu Hội nghị sinh lý thực vật lần Toàn quốc lần thứ 3 – 2025?
- Bảng 3.13 và Bảng 3.14. Hãy giải thích vì sao giá trị Ct của gene *GP-18s RNA* có giá trị cao hơn 32 (15 kết quả) trong khi RT-PCR chạy 40 chu kỳ?
- Phần kết luận và kiến nghị: Kết luận 03 cần ghi rõ gene *CYP* và *UGT* nào tăng phiên mã. Không nên lặp lại từ “luận án” quá nhiều lần ở 05 kết luận.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

- Kết quả nghiên cứu đã được công bố trên các tạp chí WoS/Scopus (Journal of Biotechnology 2022, Molecules 2022, Avicenna J Med Biotech 2023) và Tạp chí KH ĐH Huế: Nông nghiệp và phát triển nông thôn 2025; Kỷ yếu Hội nghị sinh lý thực vật Toàn quốc lần thứ 3 – 2025. Tuy nhiên, NCS không phải là tác giả chính của các công bố trên các tạp chí WoS/Scopus.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

- Nội dung của luận án và các công bố khoa học đáp ứng các yêu cầu đối với luận án tiến sĩ theo Thông tư 08/ 2017/TT-BGDĐT về Quy chế tuyển sinh và đào tạo trình độ tiến sĩ.
- Bản tóm tắt phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

Đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế



Huế, ngày 02 tháng 03 năm 2026
Người nhận xét ký tên

Nguyễn Xuân Huy

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: **Nguyễn Bảo Hưng**

Học hàm:

Học vị: TS

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Cơ quan công tác: Viện Công nghệ sinh học

Chức trách trong hội đồng: Thư ký

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên đề tài: **Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside
nuôi cấy tế bào cây giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.)
Makino)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là dược liệu có giá trị dược tính cao, hiện được xếp vào danh mục các loài nguy cấp trong Sách đỏ Việt Nam (2007). Các nghiên cứu thực nghiệm đã chứng minh loài này sở hữu phổ tác dụng dược lý rộng, bao gồm bảo vệ tế bào gan, kháng viêm, hạ đường huyết và ức chế sự tăng sinh tế bào khối u. Về mặt hóa học, thành phần hoạt chất chính là gypenoside – nhóm saponin triterpenoid có cấu trúc và hoạt tính sinh học tương đồng với ginsenoside trong nhân sâm (*Panax ginseng*). Với đặc tính sinh trưởng mạnh, khả năng thích nghi cao và chu kỳ thu hoạch ngắn, *G. pentaphyllum* được đánh giá là nguồn nguyên liệu tiềm năng để thay thế hoặc bổ trợ cho nhân sâm trong công nghiệp dược phẩm.

Trong bối cảnh nhu cầu dược liệu tăng cao, công nghệ nuôi cấy tế bào thực vật (*in vitro*) được xem là giải pháp chiến lược nhằm sản xuất sinh khối và các hợp chất tự nhiên một cách bền vững. Phương pháp này cho phép chủ động kiểm soát quy mô sản xuất, đảm bảo tính ổn định về chất lượng và không bị phụ thuộc vào các yếu tố ngoại cảnh như khí hậu hay thổ nhưỡng. Đặc biệt, hệ thống nuôi cấy tế bào đảm bảo độ tinh khiết của sản phẩm, loại bỏ nguy cơ ô nhiễm kim loại nặng và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật. Ngoài ra, việc ứng dụng các kỹ thuật bổ sung tiền chất (precursors), chất kích

kháng (elicitors) hoặc chuyển gen cho phép tối ưu hóa và nâng cao hiệu suất tổng hợp các hoạt chất có giá trị.

Mặc dù các nghiên cứu về nuôi cấy mô sẹo (callus) trên Giảo cổ lam đã được ghi nhận, tuy nhiên việc thiết lập hệ thống nuôi cấy huyền phù tế bào nhằm khai thác và đánh giá hoạt tính sinh học của gypenoside vẫn còn nhiều hạn chế. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xây dựng quy trình nuôi cấy tế bào Giảo cổ lam tối ưu, đồng thời thu nhận và định lượng hoạt tính của gypenoside từ nguồn sinh khối này. Kết quả của luận án không chỉ góp phần làm sáng tỏ cơ sở khoa học của công nghệ tế bào thực vật trong sản xuất dược chất mà còn cung cấp dữ liệu thực tiễn quan trọng cho lĩnh vực công nghệ sinh học dược phẩm.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Các kết quả nghiên cứu trình bày trong luận án không trùng lặp với bất kỳ công trình, luận văn hay luận án nào đã được công bố trong và ngoài nước. Toàn bộ nội dung nghiên cứu được xây dựng trên cơ sở kế thừa, phân tích và tổng hợp có chọn lọc từ 176 tài liệu tham khảo có nguồn gốc rõ ràng, trong đó gồm 14 tài liệu tiếng Việt và 162 tài liệu tiếng Anh. Đáng chú ý, 58/176 tài liệu được trích dẫn thuộc giai đoạn 5 năm gần đây (2021–2026), phản ánh tính cập nhật và hiện đại của cơ sở lý luận. Tác giả đã thực hiện việc trích dẫn đầy đủ, chính xác và trung thực, tuân thủ các quy định về đạo đức và chuẩn mực trong nghiên cứu khoa học.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Luận án có 3 nội dung nghiên cứu liên quan, phù hợp với tên và mục tiêu đề tài luận án “Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)” và phù hợp với chuyên ngành Sinh học, mã số 9420101.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án đã sử dụng tổng hợp nhiều phương pháp nghiên cứu hiện đại, có độ tin cậy cao, được xem là phương pháp chuẩn trong lĩnh vực công nghệ sinh học dược liệu, đảm bảo tính chính xác và giá trị khoa học của các kết quả thu được.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã xác lập được những đóng góp quan trọng, có giá trị khoa học và thực tiễn cao trong lĩnh vực công nghệ sinh học dược liệu. Cụ thể, công trình đã xây dựng thành công quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) đạt hiệu suất cao trong việc sinh tổng hợp gypenoside – nhóm saponin triterpenoid có hoạt tính sinh học đặc hữu. Đặc biệt, nghiên cứu này lần đầu tiên phân tích định lượng và làm sáng tỏ sự biến đổi mức độ biểu hiện (gene expression) của các gen then chốt trong con đường sinh tổng hợp gypenoside dưới tác động của các tác nhân kích kháng (elicitors).

Những kết quả đạt được không chỉ cung cấp các dẫn liệu khoa học mới về cơ chế điều hòa sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp ở Giảo cổ lam, mà còn tạo tiền đề cho hướng nghiên cứu ứng dụng sản xuất các hợp chất sinh học có giá trị kinh tế cao ở quy mô công nghiệp thông qua hệ thống bioreactor. Qua đó, luận án góp phần củng cố cơ sở khoa học cho việc bảo tồn, khai thác và phát triển bền vững nguồn dược liệu bản địa, đáp ứng nhu cầu nguyên liệu cho ngành công nghiệp dược phẩm và nâng cao giá trị kinh tế – xã hội.

Tính khoa học và độ tin cậy của các phát hiện trong luận án đã được khẳng định thông qua việc công bố 05 bài báo khoa học trên các tạp chí chuyên ngành uy tín trong nước và quốc tế. Điều này minh chứng cho tính mới, tính khách quan và sự thừa nhận của cộng đồng khoa học đối với kết quả nghiên cứu.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

a. Ưu điểm

Luận án có hình thức trình bày khoa học, rõ ràng, dễ theo dõi, đúng quy định và đạt yêu cầu về bố cục và nội dung của một luận án tiến sĩ.

Ngoài ra, luận án có hình ảnh bảng biểu, đồ thị trình bày đẹp tài liệu tham khảo phong phú.

b. Nhược điểm

Hình thức:

- Mục lục cần định dạng lại để dòng cuối không bị sang 1 trang mới
- Danh mục hình cần định dạng lại để giảm những dòng cuối sang 1 trang mới
- Danh mục các từ viết tắt tách riêng sang trang mới
-

- Cần rà soát và thống nhất 1 định dạng trích dẫn để hoàn thiện luận văn
- Cần rà soát và sắp xếp lại danh mục tài liệu tham khảo theo đúng trình tự trích dẫn (tăng dần). Hiện nay, một số trích dẫn trong nội dung luận án và danh mục tham khảo chưa đảm bảo tính đồng nhất về thứ tự

- Hình 1.3; 1.4 mờ cần làm lại. Tương tự rà soát tất cả các hình.

- Bảng 2.2 cần bổ sung chiều của trình tự môi

Nội dung:

- Ở các chú thích về thống kê phân tích: cần lưu ý độ chính xác các đoạn “Các giá trị có cùng chữ cái không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \geq 0.05$)”

- Nên thay cụm từ “sản xuất cao chiết” bằng “thu nhận cao chiết” cho phù hợp với quy mô nghiên cứu.

- Vì công thức BAP 2,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L và KIN 2 mg/L + IBA 0,5 mg/L không cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (cùng thuộc nhóm hạng cao nhất), nên kết quả cần được diễn đạt lại để phản ánh sự tương đương về hiệu quả giữa hai tổ hợp này

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Với kết quả đề tài, nghiên cứu sinh đã công bố 5 công trình trên các tạp chí uy tín.

Bao gồm:

- 1 Bài báo trên Molecules (SCI Q1) về tác động của elicitor đối với nuôi cấy với (đồng tác giả)
- 1 Bài nghiên cứu sinh khối và ức chế tế bào ung thư trên Research Journal of Biotechnology (Scopus, Q4) (đồng tác giả)
- 1 Bài về sản xuất gypenoside và phục hồi sinh tinh trên Avicenna Journal of Medical Biotechnology (đồng tác giả)
- 1 Báo cáo tại Hội nghị Sinh lý thực vật Việt Nam (tác giả chính)
- 1 Bài đăng trên Tạp chí Khoa học Đại học Huế (tác giả chính)

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

Nhìn chung, luận án được đánh giá cao về giá trị khoa học hệ thống và tính thực tiễn rõ rệt. Hệ thống phương pháp luận được thiết lập và triển khai một cách bài bản, phù hợp với mục tiêu nghiên cứu, đảm bảo độ tin cậy và tính khách quan của các số liệu thực nghiệm. Các kết quả nghiên cứu được phân tích và trình bày theo cấu trúc logic, phản ánh toàn diện các nội dung chuyên môn cũng như định hướng khoa học mà đề tài đã xác lập.

Bản tóm tắt luận án đã khái quát hóa một cách trung thực, cô đọng các đóng góp cốt lõi và những phát hiện mới của công trình. Đặc biệt, giá trị của luận án còn được khẳng định thông qua các công bố khoa học trên các tạp chí chuyên ngành uy tín thuộc danh mục trong nước và quốc tế. Điều này minh chứng cho việc luận án đã đáp ứng đầy đủ, nghiêm túc các tiêu chuẩn về khối lượng và chất lượng công việc theo Quy chế đào tạo trình độ tiến sĩ hiện hành của cơ sở đào tạo.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế

Xác nhận của cơ quan



Huế, ngày 28 tháng 2 năm 2025

Người nhận xét ký tên


Nguyễn Bảo Hưng



BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Thông tin về người nhận xét:

Họ và tên: Nguyễn Hoàng Lộc

Chức danh: GS Học vị: TS

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Cơ quan công tác: Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Chức trách trong hội đồng: Chủ tịch

Họ tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Ngành: Sinh học Mã số: 9420101

Tên đề tài: Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Đề tài nghiên cứu về Giáo cổ lam là rất cấp thiết nhằm giải quyết sự khan hiếm nguồn dược liệu tự nhiên và đáp ứng nhu cầu hoạt chất gypenoside chất lượng cao thông qua kỹ thuật nuôi cấy tế bào huyền phù kết hợp elicitor và hệ thống bioreactor hiện đại. Về mặt khoa học, luận án cung cấp những dẫn liệu mới về cơ chế sinh tổng hợp ở cấp độ phân tử cũng như chứng minh các hoạt tính sinh học quan trọng như kháng ung thư và bảo vệ tế bào tinh hoàn, tạo nền tảng lý thuyết vững chắc cho lĩnh vực công nghệ tế bào thực vật. Về mặt thực tiễn, quy trình sản xuất sinh khối ổn định ở quy mô lớn không chỉ giúp chủ động nguồn nguyên liệu sạch, an toàn cho ngành dược mà còn mở ra tiềm năng phát triển các dòng thực phẩm chức năng và dược phẩm hỗ trợ điều trị bệnh, góp phần nâng cao giá trị kinh tế và bảo tồn nguồn gene dược liệu quý của Việt Nam.

2. Sự không trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án với các đề tài, luận văn, luận án, công trình khoa học khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Đề tài luận án không trùng lặp với các kết quả nghiên cứu liên quan đã được công bố trước đây ở trong và ngoài nước. Tài liệu tham khảo trong luận án được trích dẫn rõ ràng, đầy đủ, trung thực, cập nhật và phù hợp với nội dung luận án.

3. Sự phù hợp của đề tài nghiên cứu

Tên đề tài phản ánh đúng nội dung và mục tiêu nghiên cứu; phù hợp với mã số chuyên ngành đào tạo Sinh học 9420201.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của phương pháp nghiên cứu

Luận án sử dụng các phương pháp nghiên cứu thường quy phù hợp với nội dung và mục tiêu của đề tài, đảm bảo được độ tin cậy cho các số liệu thực nghiệm. Các phương pháp xử lý thống kê hợp lý.

5. Những đóng góp mới của luận án và ý nghĩa khoa học, độ tin cậy

5.1. Những đóng góp mới của luận án

- Thiết lập được quy trình từ tạo mô sẹo, nuôi cấy huyền phù tế bào đến mở rộng quy mô trong hệ thống bioreactor 12 lít, đạt hiệu suất sinh khối và hàm lượng gypenoside cao bằng cách phối hợp các tiền chất và chất kích kháng (elicitor) như methyl jasmonate và chitosan.
- Đây là nghiên cứu tiên phong trong việc phân tích mức độ biểu hiện của 12 gen đặc hiệu thuộc họ CYP và UGT liên quan đến con đường sinh tổng hợp gypenoside trong tế bào Giảo cổ lam dưới tác động của các yếu tố kích thích môi trường.
- Chứng minh được cao chiết từ tế bào nuôi cấy không chỉ có khả năng kháng các dòng tế bào ung thư (gan, phổi, bạch cầu) mà còn có tác dụng bảo vệ và phục hồi chức năng tinh hoàn chuột thông qua việc cải thiện các chỉ số sinh tinh và nồng độ hormone testosterone.

5.2. Ý nghĩa khoa học

- Cung cấp các bằng chứng thực nghiệm quan trọng về sự tương tác giữa các tác nhân kích kháng và phản ứng của tế bào thực vật trong việc tăng cường tổng hợp hợp chất thứ cấp.
- Làm sáng tỏ mối liên hệ giữa sự biểu hiện gen và sự tích lũy hoạt chất, góp phần hoàn thiện con đường chuyển hóa các hợp chất saponin kiểu dammarane ở thực vật.
- Khẳng định giá trị của sinh khối tế bào nuôi cấy trong ống nghiệm có tác dụng sinh học tương đương hoặc vượt trội so với cây tự nhiên, tạo tiền đề cho các nghiên cứu được lý chuyên sâu hơn.

5.3. Độ tin cậy của luận án

- Các thí nghiệm được thiết kế khoa học, sử dụng các kỹ thuật hiện đại và phổ biến trong công nghệ sinh học như real-time RT-PCR để định lượng sự biểu hiện của gen và HPLC để định lượng hoạt chất.
- Kết quả nghiên cứu dựa trên các lần lặp lại thí nghiệm đảm bảo tính thống kê. Các thông số thu được từ hệ thống bioreactor 12 lít cho thấy tính ổn định và khả năng lặp lại của quy trình.
- Các nội dung cốt lõi của luận án đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành uy tín và báo cáo tại các hội nghị khoa học, trải qua quá trình phản biện khắt khe của các chuyên gia trong cùng lĩnh vực.

6. Ưu và khuyết điểm của bản luận án

6.1. Ưu điểm

- Tính toàn diện và hệ thống: Luận án đi từ những bước cơ bản (tạo mô sẹo, đặc điểm sinh trưởng) đến các nghiên cứu chuyên sâu (biểu hiện gen, tối ưu hóa bioreactor) và cuối cùng là đánh giá hoạt tính sinh học. Đây là một quy trình nghiên cứu logic và hoàn chỉnh.
- Ứng dụng công nghệ hiện đại: Việc sử dụng các kỹ thuật như real-time RT-PCR để định lượng biểu hiện gen và HPLC để phân tích hoạt chất giúp các kết luận có sức nặng về mặt khoa học. Đặc biệt, việc thử nghiệm thành công trên hệ thống bioreactor 12 lít cho thấy tiềm năng ứng dụng thực tiễn cao, vượt xa quy mô phòng thí nghiệm thông thường.
- Giá trị khoa học mới: Luận án không chỉ dừng lại ở việc tăng sinh khối mà còn đi sâu vào cơ chế phân tử, xác định được các gen then chốt (CYP, UGT) phản ứng với elicitor, đóng góp quan trọng vào kho tàng tri thức về sinh tổng hợp saponin kiểu dammarane.
- Đánh giá dược lý đa dạng: Việc thử nghiệm trên cả dòng tế bào ung thư và mô hình động vật (chuột) giúp khẳng định giá trị thực tế của sản phẩm từ tế bào nuôi cấy, tạo niềm tin cho việc phát triển thực phẩm chức năng sau này.

6.2. Khuyết điểm

- Phạm vi elicitor: Mặc dù methyl jasmonate và chitosan là những elicitor phổ biến và hiệu quả, luận án có thể mở rộng thử nghiệm thêm các tác nhân vật lý (như tia UV, ánh sáng LED chuyên dụng) hoặc các elicitor sinh học khác để tìm ra sự phối hợp tối ưu hơn nữa.
- Phân tích sâu về thành phần gypenoside: Gypenoside là một nhóm hợp chất rất phức tạp (hàng trăm loại). Luận án tập trung vào hàm lượng tổng số là chính; nếu có thêm phân tích định lượng chi tiết cho từng loại gypenoside cụ thể (ví dụ gypenoside XLIX hoặc V) vốn có hoạt tính mạnh, kết quả sẽ càng có giá trị hơn.
- Tính kinh tế - kỹ thuật: Dù đã nuôi quy mô bioreactor 12 lít, luận án chưa có một phân tích sơ bộ về giá thành sản xuất sinh khối tế bào so với việc thu hoạch cây tự nhiên hoặc trồng trọt truyền thống để làm nổi bật hơn nữa tính ưu việt về mặt kinh tế.
- Độ ổn định của dòng tế bào: Nuôi cấy huyền phù dài ngày có thể dẫn đến sự biến dị soma hoặc giảm hiệu suất tổng hợp hoạt chất. Luận án nếu bổ sung thêm dữ liệu về độ ổn định của dòng tế bào qua nhiều thế hệ nuôi cấy (subculture) sẽ tăng thêm tính thuyết phục cho việc sản xuất ở quy mô công nghiệp bền vững.

Tóm lại, đây là một bản luận án có chất lượng chuyên môn cao, giải quyết được cả vấn đề học thuật lẫn thực tiễn. Những hạn chế nêu trên chủ yếu mang tính chất gợi mở cho các hướng nghiên cứu chuyên sâu hơn sau tiến sĩ.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí và giá trị của công trình công bố
Luận án có 5 công bố: 3 bài báo ở tạp chí quốc tế (1 Q1, 1 Q3 và 1 Q4), 1 bài ở tạp chí trong nước và 1 bài ở kỷ yếu Hội nghị Sinh lý thực vật toàn quốc. Nhìn chung, các công trình có nội dung phù hợp với luận án.

8. Kết luận chung

Luận án đáp ứng yêu cầu của một luận án tiến sĩ Sinh học. Bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

Đồng ý cho nghiên cứu sinh bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế

Huế, ngày 9 tháng 3 năm 2026

Người nhận xét

(Ký tên, ghi họ tên)

Xác nhận của cơ quan

Xác nhận: Ông Nguyễn Hoàng Lộc
cán bộ của trường và chữ ký bên là đúng

Huế, ngày 12 tháng 3 năm 2026

TRƯỜNG ĐẠI HỌC ĐHKH



TRƯỜNG PHÒNG TC&HC

Nguyễn Thị Thanh Huyền

Nguyễn Hoàng Lộc

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: **Nguyễn Du Sanh**

Học hàm: Phó giáo sư

Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh lý Thực vật

Cơ quan công tác: Trường ĐH Khoa học tự nhiên, ĐHQGTPHCM

Chức trách trong hội đồng: **Phản biện 2**

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Đặng Ngọc Sáng**

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên đề tài: **Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của Gypenoside từ nuôi cấy tế bào cây giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Giáo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) là một loài dược liệu quý thuộc họ Bầu bí (Cucurbitaceae), có nhiều tác dụng dược lý, có chứa nhiều gypenoside có giá trị. Trong tự nhiên, Giáo cổ lam đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm, nó được xếp vào nhóm nguy cấp trong sách đỏ Việt Nam. Nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giáo cổ lam tự nhiên là rất cần thiết. Việc sử dụng kiến thức khoa học, kỹ thuật để tạo ra các sản phẩm có năng suất và giá trị cao là điều rất có ý nghĩa khoa học và thực tiễn trong hoạt động của chúng ta góp phần cải thiện cuộc sống.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Công trình đã xây dựng được quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam trong bình tam giác và ứng dụng vào bioreactor 12 lít với các điều kiện thích hợp để có lượng sinh khối và hàm lượng gypenoside cao (sử dụng elicitor). Đã ghi nhận trong quá trình sinh tổng hợp gypenoside có sự tham gia của 12 gene trong đó có các gene *CYP86A8*, gene *CYP94A1* gene *CYP89A2* tăng nhiều lần, gene *UGT73B4* phiên mã mạnh nhất so với đối chứng. Kết quả cũng ghi nhận cao chiết tế bào cây Giáo cổ lam có khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột do làm tăng khả năng sinh tinh và tăng nồng độ testosterone trong

máu khi xử lý nhiệt. Bản thân chưa thấy có sự trùng lặp về nội dung của công trình và luận án được công bố trước đây.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Nội dung luận án phù hợp với tên của đề tài, thuộc ngành Sinh học. Mã số: 94 20 101.

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Phương pháp nghiên cứu trong luận án là các phương pháp thường được sử dụng trong nghiên cứu về sinh lý, sinh hóa học thực vật như kỹ thuật nuôi cấy mô để tạo vật liệu nuôi cấy dịch huyền phù tế bào, rồi thử nghiệm trên bioreactor 12 lít, bằng cách sử dụng phytohormone, điều kiện môi trường như nguồn carbon, cỡ mẫu, tốc độ lắc, loại chất, nồng độ, thời điểm bổ sung elicitor để xác định đường cong sinh trưởng, thời điểm tích lũy sinh khối và lượng gypenoside tốt nhất. Tiếp theo, sử dụng kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích trình tự gene, dự đoán đặc điểm và chức năng enzyme đại diện cho 2 nhóm gene *CYP* và *UGT* của cây Giảo cổ lam. Chế phẩm cao chiết có chứa gypenoside được chiết tách từ dịch nuôi cấy và đem thử nghiệm hoạt tính trên các dòng tế bào ung thư gan (HepG2, Huh7), ung thư bạch cầu (HL - 60) và ung thư phổi (A549) của người, cũng như khả năng bảo vệ hệ thống sinh sản của chuột đực dưới tác dụng của stress nhiệt. Các kết quả đo đạc đều được ghi nhận qua hình ảnh, bảng, các số liệu thu nhận đều được tính thống kê.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã thực hiện gồm 3 nội dung: Ảnh hưởng của điều kiện nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside trong tế bào huyền phù; Ảnh hưởng của các elicitor trong việc tăng cường khả năng sản xuất gypenoside; Thu nhận và thử nghiệm hoạt tính của gypenoside. Luận án có một số đóng góp mới: 1. Xây dựng được quy trình nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam trong bình tam giác, bioreactor 12 lít. 2. Xác định được thời điểm sử dụng elicitor riêng lẻ hay phối hợp để có hàm lượng gypenoside đạt cao nhất trong quá trình nuôi cấy dịch tế bào Giảo cổ lam. 3. Xác định được khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột của cao chiết từ dịch tế bào cây Giảo cổ lam. Các kết quả này giúp các nhà nghiên cứu có một cái nhìn khái quát hơn về con đường sinh tổng hợp gypenoside của cây Giảo cổ. Từ

đó có thể có khai thác được liệu quý này một cách hiệu quả mà không cần hay giới hạn khai thác từ cây trong tự nhiên.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc...của luận án

Ưu điểm: Luận án có đầy đủ các phần theo qui định. Luận án có 112 trang với phần **Mở đầu** 5 trang; **Chương 1:** TQTL 28 trang; **Chương 2:** VL& PPNC 16 trang; **Chương 3:** KQNC & TL 46 trang; **Kết luận & Kiến nghị** 2 trang; **TLTK** 14 trang với 176 tài liệu bằng tiếng Việt & tiếng Anh. Luận án cũng có phần **Phụ lục** 6 trang liên quan đến nội dung. Luận án trình bày sạch đẹp, rõ ràng.

Mở đầu khá rõ, nêu được lý do và mục tiêu, đối tượng và phạm vi nghiên cứu. Tổng quan tài liệu có liên quan đến nội dung luận án, đầy đủ, và có tính cập nhật. Vật liệu & phương pháp trình bày các thí nghiệm cần thực hiện để đạt được mục tiêu đề ra. Những kết quả thí nghiệm được thảo luận. Kết luận là phần khái quát các kết quả đạt được. Sau đó đưa ra các kiến nghị để làm rõ hơn các vấn đề liên quan.

Ít lỗi in ấn (tr.59,71,...); Có bảng & hình minh họa với các ghi chú nên dễ theo dõi.

Tuy nhiên cần xem lại

Bảng Danh mục các hình ảnh không trùng khớp với số trang trong luận án (tr.viii). Hình ảnh, bảng với phần ghi chú nên sắp xếp trên cùng một trang để dễ theo dõi (nhiều chỗ); Số liệu diễn đạt (tr.60,...); Số liệu diễn đạt và hình mô tả chưa trùng khớp (tr.61.). Hình cắt dán chưa khớp (H.3.13 tr.93). Cách viết gene và protein tương ứng của gene.

Phần tổng quan đôi chỗ cần xem lại để đặt đúng vị trí trong luận án.

Phần VL&PP: Cần chi tiết, cụ thể và rõ hơn, đôi chỗ cần rút gọn (tr.34-37; 39- 42, 48-49,...); Vật liệu nguồn cho cây *in vitro*; Cây tự nhiên để lấy cao chiết cần có nguồn gốc, xuất xứ, điều kiện nuôi trồng rõ hơn. Sơ đồ bố trí thí nghiệm phải đặt ở phần VLPP (tr.22);

Phần Kết quả thảo luận không phải là phần TLTK hay VLPP, nên đặt đúng chỗ (tr.53-54; 63-65;73-75;....) và ở mỗi phần chuyển sang thí nghiệm hay nội dung kế tiếp cần có câu giới thiệu ngắn gọn bên cạnh phần tóm lược kết quả phía trước để dễ theo dõi. Đa phần các kết quả thí nghiệm có thảo luận nhưng đôi chỗ thì không (tr.55). Đôi chỗ diễn đạt chưa rõ, chưa khớp (*chưa thảo luận*) phần VLPP với phần kết quả (tr.35,38;50,60-61).

Câu hỏi:

1) Tác giả theo quan điểm nào khi cho rằng jasmonate là elicitor phi sinh học (tr.73) với các khái niệm về elicitor (tr.15-17).

2. Giải thích cơ sở khoa học khi nuôi cấy lỏng lắc trong bình tam giác và nuôi cấy trong elicitor khác nhau dẫn đến kết quả sai khác? (tr.35,38, 50, 60-61);

3. Giải thích ý nghĩa của lượng Rb1 ghi “-“ trong bảng 3.5 (tr.60).

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Có 05 bài báo liên quan đến nội dung luận án được công bố trên tạp chí chuyên ngành có uy tín ở trong và ngoài nước: năm 2022 = 02 bài, năm 2023 = 01 bài, năm 2025 = 02 bài có liên quan đến nội dung luận án. Trong đó có 2 bài năm 2025 với tên tác giả luận án là người đứng đầu.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không?

Luận án đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một luận án tiến sĩ.

Bản tóm tắt luận án thể hiện đầy đủ và trung thực của nội dung luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

(Ghi rõ đồng ý hay không đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế)

Đồng ý cho NCS bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế để nhận bằng Tiến sĩ Sinh học.

Xác nhận của cơ quan

Tp.Hồ Chí Minh, ngày 22 tháng 02 năm 2026

Người nhận xét ký tên



Nguyễn Du Sanh

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: Đinh Trường Sơn

Học hàm: Phó giáo sư

Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh học phân tử

Cơ quan công tác: Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Chức trách trong hội đồng: Phản biện 3

Họ và tên nghiên cứu sinh: Đặng Ngọc Sáng

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên 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)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Tính cần thiết, thời sự: Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum*) là cây dược liệu có chứa nhóm hợp chất saponin triterpenoid (gypenoside) có cấu trúc và hoạt tính tương đồng với nhân sâm (*Panax ginseng*). Tuy nhiên, nguồn nguyên liệu giảo cổ lam trong tự nhiên đang suy giảm nghiêm trọng (nằm trong Sách Đỏ Việt Nam) do khai thác quá mức và biến đổi khí hậu. Luận án có cách tiếp cận vấn đề đi từ nhu cầu bảo tồn đến giải pháp công nghệ sinh học là logic và phù hợp với xu hướng nghiên cứu hiện đại. Việc thiết lập quy trình nuôi cấy huyền phù tế bào kết hợp với sử dụng chất kích hoạt (elicitor) để tăng cường sinh tổng hợp gypenoside không chỉ có ý nghĩa khoa học trong việc tìm hiểu cơ chế điều hòa trao đổi chất mà còn mang lại giá trị thực tiễn to lớn trong việc chủ động nguồn nguyên liệu dược, phù hợp với xu hướng phát triển công nghiệp dược liệu xanh và bền vững.

Ý nghĩa khoa học: Luận án cung cấp các dẫn liệu mới về động học sinh trưởng, tác động riêng rẽ và hiệp đồng của các loại elicitor (MeJA, SA, YE) và cơ chế điều hòa sinh tổng hợp thứ cấp ở cấp độ phân tử (thông qua phân tích mức độ phiên mã của các gen CYP và UGT).

Ý nghĩa thực tiễn: Quy trình nuôi cấy thiết lập thành công từ quy mô bình tam giác lên bioreactor 12 L là những kết quả bước đầu hứa hẹn mở ra tiềm năng cho việc phát triển các nghiên cứu mở rộng quy mô nhằm sản xuất gypenoside trong tương lai.

2. Sự không trùng lặp của đề tài nghiên cứu so với các công trình, luận văn, luận án đã được công bố trong và ngoài nước của các tác giả khác; tính trung thực, rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Do là cây dược liệu quý nên đã có nhiều nghiên cứu trong nước và quốc tế về nhân giống cũng như thành phần thảo dược của giảo cổ lam. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về nuôi cấy mô sẹo (callus) và rễ tơ (hairy root) cũng như kỹ thuật nuôi cấy huyền phù của các cây dược liệu thuộc chi *Gynostemma*. Mặc dù vậy, chưa có nhiều nghiên cứu làm rõ mối liên hệ định lượng giữa mức độ phiên mã của các gen thuộc họ CYP450 và UGT với năng suất của các phân đoạn gypenoside trong hệ thống nuôi cấy quy mô bioreactor. Ở Việt Nam, các nghiên cứu về nhân sinh khối đa số là trên đối tượng mô sẹo (callus) hoặc rễ tơ. Chưa có công bố nào xây dựng được hệ thống nhân sinh khối bằng nuôi cấy huyền phù cũng như cơ chế biểu hiện gen dưới tác động của tổ hợp elicitor trên giảo cổ lam. Chính vì vậy, đề tài luận án có tính mới, không trùng lặp với các nghiên cứu trước đây.

Luận án đã tham khảo nhiều tài liệu, được trích dẫn đầy đủ, trung thực và có tính cập nhật cao.

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Về tổng thể, tên đề tài phản ánh khá rõ định hướng nghiên cứu chính của luận án, bao gồm hai nội dung trọng tâm: (1) Thu nhận gypenoside từ hệ nuôi cấy tế bào huyền phù của *Gynostemma pentaphyllum* và (2) Đánh giá hoạt tính sinh học của gypenoside hoặc cao chiết thu được.

Các nội dung nghiên cứu chính của luận án bao gồm: nuôi cấy tế bào thực vật *in vitro*, ảnh hưởng của elicitor đến sinh trưởng và chuyển hóa thứ cấp, phân tích tích lũy hợp chất thứ cấp (gypenoside), nghiên cứu biểu hiện gene liên quan đến sinh tổng hợp triterpenoid, dự đoán cấu trúc và chức năng của protein CYP và UGT, đánh giá một số hoạt tính sinh học của cao chiết. Các nội dung trên thuộc các lĩnh vực: sinh học tế bào thực vật, công nghệ sinh học thực vật, sinh học phân tử, sinh học chuyển hóa (metabolic biology) và do vậy hoàn toàn phù hợp với chuyên ngành Sinh học (Mã số: 9420101).

4. Độ tin cậy, tính hiện đại của các phương pháp đã sử dụng để nghiên cứu

Luận án sử dụng nhiều phương pháp nghiên cứu thuộc các lĩnh vực sinh học thực vật, sinh học phân tử, hóa sinh và tin sinh học như nuôi cấy tế bào huyền phù, xử lý elicitor để kích thích tích lũy hợp chất thứ cấp; phân tích hàm lượng gypenoside bằng HPLC-PDA, phân tích biểu hiện gene bằng real-time PCR và dự đoán cấu trúc protein bằng các công cụ tin sinh học. Đây là những phương pháp hiện đại, được sử dụng phổ biến trong các nghiên cứu về sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp ở thực vật và nhìn chung phù hợp với mục tiêu nghiên cứu của đề tài. Tuy nhiên, luận án cần trình bày rõ hơn một số thông tin liên quan đến độ tin cậy của phương pháp, chẳng hạn như các thông số kiểm chứng của phương pháp phân tích HPLC.

5. Đánh giá các kết quả nghiên cứu mới đạt được; những đóng góp mới cho sự phát triển khoa học của chuyên ngành; đóng góp mới cho phục vụ sản xuất, kinh tế, xã hội và đời sống. Ý nghĩa khoa học, giá trị độ tin cậy của những kết quả đó

Luận án đã tiến hành nghiên cứu hệ thống nuôi cấy tế bào huyền phù của loài *Gynostemma pentaphyllum* nhằm tăng cường tích lũy gypenoside và đánh giá một số hoạt tính sinh học của hợp chất này. Một số kết quả chính của luận án có thể được ghi nhận như sau:

- Xây dựng và duy trì được hệ nuôi cấy tế bào huyền phù của loài *Gynostemma pentaphyllum*, tạo cơ sở cho việc nghiên cứu sinh tổng hợp gypenoside trong điều kiện nuôi cấy *in vitro*.
- Khảo sát ảnh hưởng riêng rẽ và hiệp đồng của một số elicitor đến sinh trưởng của tế bào và khả năng tích lũy gypenoside, qua đó bước đầu xác định được điều kiện xử lý có thể làm tăng hàm lượng gypenoside trong sinh khối tế bào nuôi cấy.
- Phân tích mức độ biểu hiện của một số gene liên quan đến con đường sinh tổng hợp triterpenoid thuộc hai họ CYP và UGT trong tế bào huyền phù, góp phần cung cấp thêm thông tin về cơ chế sinh học phân tử liên quan đến sự tích lũy gypenoside trong tế bào nuôi cấy.
- Bước đầu đánh giá một số hoạt tính sinh học của gypenoside và cao chiết thu được từ tế bào nuôi cấy, cho thấy các mẫu thử có khả năng ức chế sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư gan HepG2 ở mức độ nhất định.

Các kết quả trên có ý nghĩa nhất định về mặt khoa học, đặc biệt trong lĩnh vực nghiên cứu sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp trong hệ nuôi cấy tế bào thực vật. Đồng thời, việc nghiên cứu sản xuất gypenoside từ nguồn sinh khối nuôi cấy *in vitro* cũng có ý nghĩa tiềm năng trong việc khai thác và phát triển nguồn dược liệu từ loài giảo cổ lam mà không phụ thuộc hoàn toàn vào nguồn nguyên liệu tự nhiên.

Tuy nhiên, một số kết quả của luận án vẫn mang tính khảo sát và định hướng, đặc biệt là các kết quả liên quan đến hoạt tính sinh học của gypenoside. Các thí nghiệm đánh giá hoạt tính sinh học mới dừng lại ở mức thử nghiệm bước đầu trên một số hệ thử nghiệm *in vitro*, do đó cần có thêm các nghiên cứu sâu hơn để khẳng định rõ hơn giá trị dược lý của hợp chất này.

Nhìn chung, các kết quả nghiên cứu của luận án có giá trị khoa học nhất định và đóng góp thêm dữ liệu cho lĩnh vực nghiên cứu sinh học thực vật và công nghệ sinh học thực vật, đồng thời mở ra một số hướng nghiên cứu tiếp theo liên quan đến khai thác hợp chất thứ cấp từ hệ nuôi cấy tế bào thực vật.

6. Những ưu điểm và nhược điểm về nội dung, kết cấu và hình thức của luận án. Những góp ý chỉnh sửa về hình thức, nội dung, phương pháp nghiên cứu, cấu trúc... của luận án

Luận án có ưu điểm là lựa chọn hướng nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, tập trung vào việc khai thác hợp chất gypenoside từ hệ nuôi cấy tế bào huyền phù

Gynostemma pentaphyllum. Tác giả đã sử dụng nhiều phương pháp nghiên cứu khác nhau thuộc các lĩnh vực sinh học thực vật, hóa sinh, sinh học phân tử và tin sinh học, qua đó xây dựng được hệ thống dữ liệu tương đối đầy đủ về sinh trưởng tế bào, sự tích lũy gypenoside và biểu hiện một số gene liên quan đến con đường sinh tổng hợp triterpenoid. Mặc dù vậy, luận án cũng còn một số điểm cần chỉnh sửa nhằm hoàn thiện hơn, cụ thể:

- Các mục tiêu nghiên cứu của luận án nhìn chung phù hợp với hướng tiếp cận của đề tài. Tuy nhiên, có sự chưa hoàn toàn thống nhất giữa mục tiêu và nội dung kết quả của luận án. Cụ thể, luận án có trình bày kết quả giải trình tự và phân tích mức độ biểu hiện của một số gen *CYP* và *UGT* liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside, nhưng nội dung này chưa được đề cập trong các mục tiêu nghiên cứu. Tác giả cần làm rõ hơn mối liên hệ giữa nội dung nghiên cứu này với mục tiêu của đề tài để tăng tính logic và nhất quán của luận án.
- Giáo cổ lam là tên gọi thông thường, không phải danh pháp phân loại sinh học nên không bắt buộc viết hoa. Trong thực tế, thuật ngữ này có thể được sử dụng để chỉ các loài thuộc chi *Gynostemma*. Do đó, trong phạm vi luận án, cần xác định rõ thuật ngữ “giáo cổ lam” là để chỉ loài *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino mà tác giả nghiên cứu hay nói chung.
- Luận án còn lỗi chính tả, lỗi in ấn, ví dụ Hình 3.10: TMHMM là công cụ dự đoán topo xuyên màng (2D), nhưng NCS ghi nhầm tên hình là "Mô hình cấu trúc không gian". Cần chuẩn hóa một số thuật ngữ khoa học như đổi "cây di truyền" thành "cây phát sinh loài". Đổi "cỡ mẫu" trong nuôi cấy thành "mật độ tiếp giống". Đổi "bắt giữ chu kỳ tế bào" nếu dịch từ cụm từ “cell cycle arrest” thì cần chuyển thành "ngừng chu kỳ tế bào", “sợi cDNA thứ nhất” thành “cDNA mạch đơn”, “giải trình tự lai” thành “giải trình tự kết hợp”... Đánh số lại Bảng biểu (hiện đang thiếu Bảng 3.16 trong danh mục). Phân tích HPLC cho ra "sắc ký đồ" (chromatogram), chứ không phải là "phổ" (phổ chỉ dành cho MS, NMR, UV-Vis) (Hình 3.6)... Một số câu văn diễn đạt chưa thật rõ nghĩa và chưa chuẩn về cách diễn đạt khoa học, ví dụ “Nghiên cứu công nghệ giải trình tự RNA tế bào đơn cho thấy quá trình sinh tổng hợp gypenoside...”.
- Phần tổng quan tài liệu của luận án đã trình bày khá đầy đủ các nghiên cứu về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của gypenoside. Tuy nhiên, để làm rõ hơn cơ sở khoa học của hướng nghiên cứu, tác giả nên bổ sung thêm các nội dung liên quan đến vai trò sinh thái của gypenoside trong cơ chế phòng vệ của thực vật, cơ chế kích hoạt sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp bởi elicitor (JA/SA signaling). Việc bổ sung các nội dung này sẽ giúp tạo mối liên hệ logic rõ ràng, xuyên suốt: Từ lý thuyết sinh thái học/tin sinh học → Xây dựng giả thuyết → Thiết kế thí nghiệm → Và cuối cùng là giải thích được những hiện tượng bất thường của số liệu.
- Tác giả cần rà soát và chỉnh sửa lại tên tiêu mục, bảng biểu và viết lại cho phù hợp với nội dung. Ví dụ “Bảng 3.11. Thành phần hợp chất có trong cao chiết methanol từ tế bào huyền phù giáo cổ lam dựa trên phân tích HPLC” là không phù hợp. HPLC

thông thường với đầu dò UV (như luận án làm) chỉ xác định được thời gian lưu và diện tích peak, không thể định danh chắc chắn các thành phần hợp chất nếu không có chuẩn đối chiếu hoặc phân tích LC-MS cho tất cả 24 peak. Tiểu mục “3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết” nên đổi thành “3.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ mô tinh hoàn chuột *in vivo* của chế phẩm cao chiết”.

- Phân phương pháp nghiên cứu nhìn chung được trình bày khá đầy đủ và sử dụng các kỹ thuật phổ biến trong nghiên cứu sinh học thực vật và sinh học phân tử. Tuy nhiên, để đảm bảo tính tái lập của thí nghiệm, một số phương pháp cần được mô tả chi tiết hơn, đặc biệt là các thông số nuôi cấy tế bào huyền phù, điều kiện xử lý elicitor, các thông số thẩm định phương pháp của hệ thống HPLC (giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), sắc ký đồ của chất chuẩn Rb1 và quy trình phân tích qPCR. Ngoài ra, phần xử lý thống kê dữ liệu cũng nên được trình bày rõ hơn, bao gồm số lần lặp sinh học và các phép kiểm định thống kê được sử dụng.
- Cần bổ sung nhiệt độ gắn môi vào Bảng 2.1. Trình tự môi trong nhận diện các gene.
- NCS liệt kê peak số 1 có thời gian lưu (RT) khoảng 1,04 phút và chiếm tới 94–96% diện tích (Bảng 3.11, trang 72). Tuy nhiên, trong sắc ký pha đảo C18, các peak xuất hiện ở thời gian lưu rất sớm (khoảng ~1 phút) thường là peak dung môi hoặc các tạp chất có độ phân cực cao, do đó ít có khả năng là các saponin triterpenoid như gypenoside. Bên cạnh đó, việc gán peak Rb1 ở khoảng phút thứ 5 cũng cần được xem xét thêm, vì thời gian lưu này tương đối sớm đối với một saponin có bốn đơn vị glucose như Rb1 trong điều kiện sắc ký pha đảo thông thường. Do đó, đề nghị NCS làm rõ cơ sở định danh các peak này, ví dụ thông qua so sánh với chromatogram của chuẩn Rb1 hoặc phổ hấp thụ UV đặc trưng. Nếu cần thiết, tác giả nên rà soát lại cách gán peak và cập nhật lại số liệu trong Bảng 3.11 để đảm bảo độ tin cậy của kết quả phân tích.
- NCS lựa chọn hai gene *CYP89A2* và *UGT91A1* để nghiên cứu chuyên sâu dựa trên một số tiêu chí sinh học phân tử và bằng chứng thực nghiệm (trang 75) nhưng kết quả thực nghiệm lại thấy gen *UGT91A1* không biểu hiện (Bảng 3.14, trang 84). Tác giả nên giới thiệu gen *UGT91A1* đóng vai trò quan trọng trong việc glycosyl hóa các hợp chất thứ cấp (như saponin, anthocyanin) để phản ứng lại với các stress phi sinh học (abiotic stress) như khô hạn, độ mặn, hoặc nhiệt độ lạnh (bổ sung vào phần tổng quan tài liệu). UGT thường là enzyme ở bước glycosyl hóa cuối của pathway nên thường mang tính mô chuyên hóa cao. Đó là những thông tin để tác giả thảo luận cho kết quả của mình, ví dụ mình có thể đưa ra giả thuyết là UGT91A1 có thể không phản ứng/phản ứng yếu với MeJA/SA (vốn là tín hiệu của stress sinh học/tổn thương) trong tế bào huyền phù vì tế bào huyền phù đã mất tổ chức mô...
- Các thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của elicitor được thực hiện với nhiều thời điểm xử lý khác nhau, tạo ra bộ dữ liệu khá đầy đủ về sinh trưởng tế bào và hàm lượng gypenoside. Tuy nhiên, dữ liệu này mới được phân tích theo từng nghiệm thức riêng lẻ, trong khi thiết kế thí nghiệm thực chất là thí nghiệm hai nhân tố (loại elicitor và thời điểm xử lý). Do đó, nếu được phân tích theo mô hình ANOVA hai nhân tố để

đánh giá đồng thời ảnh hưởng của từng nhân tố và tương tác giữa chúng thì kết quả sẽ có giá trị khoa học cao hơn và giúp khai thác tốt hơn ý nghĩa của bộ dữ liệu thu được.

- Một số kết luận cần viết lại cho phù hợp với số liệu. Cụ thể phần kết luận thứ 4 về việc “thiết lập quy trình làm giàu gypenoside” và “tạo cơ sở cho chuẩn hóa, phát triển chế phẩm” chưa được chứng minh đầy đủ bằng dữ liệu thực nghiệm. Nội dung trình bày trong mục 3.3.1.2 chủ yếu mô tả quá trình chiết và thu được một phân đoạn cao chiết sử dụng cho thử nghiệm sinh học, nhưng chưa có các số liệu định lượng chứng minh hiệu quả làm giàu gypenoside (ví dụ: hàm lượng trước-sau, hệ số làm giàu, hiệu suất thu hồi). Đối với kết luận “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)” (trang 97). Giá trị IC₅₀ này thực chất chỉ phản ánh mức hoạt tính trung bình yếu trong các thang đánh giá cytotoxicity thông thường. Tác giả cần điều chỉnh lại các kết luận này theo hướng phản ánh đúng phạm vi thí nghiệm và kết quả thu được.
- Các kiến nghị của luận án về việc tiếp tục nghiên cứu tối ưu hóa nuôi cấy và mở rộng quy mô sản xuất gypenoside là hợp lý ở mức định hướng nghiên cứu tiếp theo. Tuy nhiên, cần diễn đạt thận trọng hơn khi đề cập đến khả năng cung cấp nguồn nguyên liệu quy mô lớn cho ngành dược vì các thí nghiệm trong luận án mới dừng ở quy mô phòng thí nghiệm. Kiến nghị về việc nghiên cứu sinh tổng hợp flavonoid chưa thực sự gắn chặt với các kết quả chính của luận án, do nghiên cứu hiện tại chủ yếu tập trung vào nhóm hợp chất gypenoside.

7. Nội dung luận án đã được công bố trên tạp chí, kỷ yếu hội nghị khoa học nào và giá trị khoa học của các công trình đã công bố

Nội dung luận án đã được công bố trên các tạp chí khoa học quốc tế uy tín thuộc danh mục WoS/Scopus (như Research Journal of Biotechnology, Molecules, Avicenna Journal of Medical Biotechnology) và các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước (Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, Bài toàn văn đăng tại kỷ yếu Hội nghị Sinh lý thực vật Toàn quốc lần thứ 3 – 2025). Các công bố này là minh chứng cho giá trị và sự công nhận của cộng đồng khoa học đối với một phần kết quả của đề tài. Số lượng và chất lượng bài báo đáp ứng vượt mức yêu cầu của quy chế đào tạo Tiến sĩ.

8. Kết luận chung cần khẳng định mức độ đáp ứng các yêu cầu đối với một luận án tiến sĩ; bản tóm tắt luận án phản ánh trung thành nội dung cơ bản của luận án hay không

Nhìn chung, luận án đã lựa chọn được hướng nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn, sử dụng nhiều phương pháp nghiên cứu thuộc các lĩnh vực sinh học thực vật, hóa sinh và sinh học phân tử để khảo sát khả năng tích lũy gypenoside trong hệ nuôi cấy tế bào huyền phù *Gynostemma pentaphyllum*. Tuy nhiên, một số nội dung trong luận án còn cần được chỉnh sửa và làm rõ thêm, đặc biệt là cách diễn giải kết quả, cơ sở định

danh các hợp chất trong phân tích HPLC, cũng như phương pháp xử lý và trình bày dữ liệu hoạt tính sinh học. Những góp ý trên chủ yếu nhằm giúp tác giả hoàn thiện hơn luận án về mặt khoa học và hình thức trình bày, đồng thời không làm thay đổi những đóng góp chính của luận án đối với lĩnh vực nghiên cứu.

Bản tóm tắt luận án trình bày khá đầy đủ các nội dung chính của công trình nghiên cứu, bao gồm mục tiêu, phương pháp, kết quả và những đóng góp của luận án. Tuy nhiên, một số nội dung cần được chỉnh sửa để tăng tính logic và tính chuẩn mực khoa học, chẳng hạn làm rõ mối liên hệ giữa mục tiêu nghiên cứu và các nội dung thực hiện, diễn đạt thận trọng hơn đối với một số kết luận, chuẩn hóa một số thuật ngữ chuyên môn và rà soát lại lỗi trình bày. Những điều chỉnh này sẽ giúp bản tóm tắt phản ánh rõ ràng và chính xác hơn các kết quả của luận án.

Sau khi NCS xem xét chỉnh sửa chỉnh theo một số góp ý về chuyên môn trên, luận án hoàn toàn đáp ứng đầy đủ các yêu cầu của một Luận án Tiến sĩ chuyên ngành Sinh học theo quy chế của Bộ GD&ĐT và Đại học Huế.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

Đồng ý cho Nghiên cứu sinh Đặng Ngọc Sáng được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Đại học Huế (sau khi đã tiến hành rà soát và chỉnh sửa các góp ý về chuyên môn trên).

Hà Nội, ngày 3 tháng 3 năm 2026

Xác nhận của cơ quan

Nguyễn Thị Thủy Hằng

Người nhận xét ký tên



Đinh Trường Sơn

TRƯỞNG

BẢN NHẬN XÉT LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

Họ và tên người nhận xét: **Hoàng Thanh Tùng**

Học hàm: Phó Giáo sư;

Học vị: Tiến sĩ

Chuyên ngành: Sinh lý thực vật

Cơ quan công tác: Trường Đại học Đà Lạt

Chức trách trong hội đồng: Ủy viên

Họ và tên nghiên cứu sinh: **Đặng Ngọc Sáng**

Chuyên ngành: Sinh học

Mã số: 9420101

Tên luận án: **Nghiên cứu thu nhận và xác định hoạt tính của gypenoside từ nuôi cấy tế bào Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Maikino)**

Ý KIẾN NHẬN XÉT

1. Tính cần thiết, thời sự, ý nghĩa khoa học của luận án

Giảo cổ lam là loài dược liệu quý, có nhiều tác dụng dược lý và được sử dụng trong bảo vệ sức khỏe. Ngoài ra, chúng có chứa các hoạt chất triterpen saponin cao gấp nhiều lần so với nhân sâm; do đó, có thể thay thế nguồn sinh khối sản xuất ginsenosid.

Nghiên cứu để tạo ra nguồn sinh khối *in vitro* để thay thế cây Giảo cổ lam ở tự nhiên là điều cần thiết. Trong đó, nuôi cấy huyền phù tế bào là một trong những giải pháp hiệu quả đã được ứng dụng trên nhiều cây dược liệu khác. Kết quả của luận án đã cung cấp những cơ sở dữ liệu quan trọng và khả năng sản xuất sinh khối, gypenoside thông qua nuôi cấy huyền phù cây Giảo cổ lam có xử lý với một số elicitor.

Luận án cung cấp được cơ sở dữ liệu về mức độ phiên mã của các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside trong nuôi cấy huyền phù tế bào. Ngoài ra, các thử nghiệm trên các tế bào ung thư và bảo vệ tinh hoàn chuột của cao chiết tổng số và chế phẩm gypenoside là đáng ghi nhận

2. Sự trùng lặp của đề tài, số liệu, kết quả nghiên cứu, kết luận của luận án so với các luận án, công trình khoa học đã công bố ở trong và ngoài nước, tính trung thực rõ ràng, đầy đủ trong trích dẫn tài liệu tham khảo

Luận án không có sự trùng lặp về kết quả nghiên cứu với các luận án và đề tài khác.

Các số liệu trung thực và được phân tích thống kê rõ ràng.

Kết quả nghiên cứu được trình bày rõ ràng, phù hợp với nội dung và mục tiêu của nghiên cứu

Kết luận của luận án phản ánh đúng các nội dung nghiên cứu

3. Sự phù hợp giữa tên đề tài với nội dung, giữa nội dung với chuyên ngành và mã số chuyên ngành

Các nội dung nghiên cứu của luận án phù hợp với tên đề tài.

Nội dung đáp ứng được yêu cầu của luận án tiến sĩ và phù hợp với chuyên ngành Sinh học, Mã số: 9420101.

4. Độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng

Phương pháp nghiên cứu sử dụng kết hợp các kỹ thuật, phương pháp phổ biến hiện nay trong nghiên cứu thu nhận sinh khối huyền phù tế bào và cải thiện tích lũy hợp chất thứ cấp thông qua xử lý với các elicitor ở thời điểm thích hợp.

Ngoài ra, trong nghiên cứu thử nghiệm các chất có hoạt tính sinh học trên mô hình động vật như: phân lập, tách chiết, thử nghiệm trên mô hình động vật (chuột nhắt), các kỹ thuật làm tiêu bản, nghiên cứu cơ chế *in vivo*,... Những phương pháp này có độ tin cậy cao và có tính cập nhật, đáp ứng được yêu cầu đặt ra của luận án.

Các phương pháp xác định cấu trúc hóa học, xử lý số liệu là phù hợp.

Những kết quả của luận án có ý nghĩa khoa học và độ tin cậy cao.

5. Kết quả nghiên cứu, đóng góp mới, độ tin cậy và tính hiện đại của phương pháp đã sử dụng

Kết quả nghiên cứu:

Luận án đã trình bày kết quả của 3 nội dung nghiên cứu với các thí nghiệm liên quan và các kết quả phản ánh trung thực và chính xác.

Đóng góp mới của luận án:

Luận án trình bày 4 đóng góp mới của luận án. Những đóng góp này là trình bày trung thực kết quả của luận án và có những công bố trên các tạp chí chuyên

ngành. Tuy nhiên, những đóng góp này còn viết dài dòng, chưa xúc tích, tác giả cần hoàn thiện lại những đóng góp mới này. Đóng góp mới cần dễ hiểu và nêu bật được những nét chính, không trình bày quá chi tiết kết quả.

6. Nhận xét góp ý

6.1. Ưu điểm

Bố cục luận án gồm 112 trang, được phân chia thành các chương, mục rõ ràng. Nội dung giữa các phần được phân chia hợp lý và giải quyết được mục tiêu đặt ra của đề tài.

Luận án đáp ứng đầy đủ tất cả các nội dung của 1 luận án tiến sĩ ngành sinh học.

Tài liệu tham khảo cập nhật trong 5 năm gần nhất khoảng 34% (59/176) từ 2021 – 2025).

6.2. Nhược điểm

Về hình thức:

Rà soát các lỗi khoảng cách, chính tả, format dấu chấm (.) phẩy (,) ở phần số trong toàn bộ luận án.

Bổ sung thanh bar (thước đo) ở các hình còn thiếu.

Tác giả cần nhắc một số “Hình” là biểu đồ nên bổ sung thêm phân hạng và số liệu.

Xem xét lại việc đặt tên cho các “Tiêu đề” của phần “Kết quả”.

Về nội dung:

Mục lục:

Format lại mục lục theo góp ý đính kèm.

Danh mục hình và Bảng

Format lại, bỏ một số ghi chú.

Mở đầu:

Bổ sung một số tài liệu tham khảo còn thiếu, một số câu còn lủng củng, nêu một số hạn chế của nuôi cấy huyền phù tế bào.

Mục tiêu chung cần viết tổng quát hơn (xem đính kèm cuốn luận án). (quy trình nuôi cấy ???)

Mục tiêu cụ thể cần bám sát các nội dung nghiên cứu để xây dựng mục tiêu chi tiết.

Ý nghĩa thực tiễn viết ngắn gọn hơn.

Đóng góp mới cần viết ngắn gọn, súc tích, trình bày những đóng góp chính không đi sâu vào liệt kê kết quả, đóng góp này còn dịch ra tiếng anh và đưa lên website nên cần dễ hiểu.

Chương 1. Tổng quan:

Một số nội dung của tổng quan *không cần* mô tả quá chi tiết như đặc điểm thực vật học, điều kiện sinh thái, đây là kiến thức chung.

Một số hình ảnh không được chú thích và đưa vào nội dung bài (ví dụ 1.2,...).
Hình 1.3 chuyển sang phần vật liệu và phương pháp.

Nhiều đoạn viết câu đơn và thiếu nguồn trích dẫn, câu văn lủng củng.

Cần viết hóa các tên loài trong toàn bộ nội dung.

Chương 2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu:

Không gạch đầu hàng các đoạn, viết thành đoạn văn hoàn chỉnh

Xem lại format số

Mô tả thêm Chỉ tiêu theo dõi.

Chương 3. Kết quả và thảo luận:

Một số hình, bảng biểu cần viết hóa số liệu, bổ sung chú thích.

Hình 3.4, 3.5 chất lượng kém.

Bảng 3.6 chỉ lặp lại 1 lần, chưa đủ độ tin cậy để đưa vào luận án (tương tự là bảng 3.11)

Bảng 3.7, 3.8, 3.9 nên bổ sung phân tích thống kê 2 yếu tố.

Hình 3.10 gom thành 1 trang và chú thích (a), (b)

Bảng 3.15 bổ sung LSD

Nên bổ sung quy trình nuôi cấy và thu nhận sinh khối tế bào cây Giảo cổ lam.

Kết luận và kiến nghị:

Kết luận cần ngắn gọn và súc tích hơn và bám sát nội dung và mục tiêu nghiên cứu cũng như tiêu đề của luận án.

Tài liệu tham khảo:

Thống nhất format.

Tóm tắt luận án

Sau khi chỉnh sửa luận án, cần rà soát và viết lại đúng như luận án đã chỉnh sửa.

Chú ý các lỗi format, chính tả, khoảng cách,....

7. Kết quả công bố khoa học khoa học:

Luận án đã công bố được 5 bài báo trên các tạp chí khoa học trong và ngoài nước, hội nghị chuyên ngành sinh lý học thực vật có hàm lượng khoa học cao, đây là nguồn tư liệu quý giá cho các nghiên cứu tiếp theo.

Đánh giá theo mức độ đóng góp và sự phù hợp:

Bài thứ nhất đăng trên tạp chí *Molecules* phản ánh nội dung liên quan đến các elicitor thực vật và sinh tổng hợp gypenpside trong nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam phản ánh đúng nội dung của luận án. Nghiên cứu sinh đóng vai trò là đồng tác giả.

Bài thứ hai đăng trên tạp chí *Research Journal Biotechnology* liên quan đến tích lũy sinh khối của cây Giảo cổ lam trong nuôi cấy huyền phù tế bào lên ức chế tế bào ung thư có nội dung phù hợp với luận án. Nghiên cứu sinh đóng vai trò là đồng tác giả.

Bài thứ ba đăng trên tạp chí *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* liên quan đến sản xuất gypenpside và quá trình sinh tinh tạo tinh trùng của dịch chiết huyền phù tế bào có nội dung phù hợp với luận án. Nghiên cứu sinh đóng vai trò là đồng tác giả.

Bài thứ tư đăng trên *Hội nghị Sinh lý thực vật* có nội dung liên quan phân lập gen, dự đoán và phân tích độ phiên mã gen CYP89A2 có nội dung phù hợp với luận án. Nghiên cứu sinh đóng vai trò là tác giả.

Bài thứ năm đăng trên *Tạp chí Khoa học học Đại học Huế* liên quan đến sản xuất sinh khối và gypenpside cây Giảo cổ lam có nội dung phù hợp với luận án. Nghiên cứu sinh đóng vai trò là tác giả.

Số lượng công bố của luận án bao gồm 05 bài là đáp ứng yêu cầu; tuy nhiên, nếu dựa trên mức độ đóng góp cho nghiên cứu thì nghiên cứu sinh mới chỉ dừng lại ở các công bố trong nước là tác giả chính.

8. Kết luận

Luận đã hoàn thành tốt các mục tiêu đặt ra và đáp ứng được yêu cầu của 1 luận án tiến sĩ ngành sinh học. Luận án cần chỉnh sửa và bổ sung những phần góp ý của Phản biện.

Tóm tắt luận án phản ánh trung thực kết quả luận án.

Ý KIẾN ĐỀ NGHỊ

**Đồng ý cho nghiên cứu sinh bảo vệ trước hội đồng đánh giá luận án cấp
Đại học Huế.**

Lâm Đồng, ngày 02 tháng 03 năm 2026

Xác nhận của cơ quan quản lý



Người viết nhận xét

A blue ink signature, likely belonging to PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng.

PGS.TS. Hoàng Thanh Tùng

Phan Tuấn Anh

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

**Tên luận án: 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

Huế, 2026

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO, CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

- [1]. 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.
- [2]. 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.
- [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, 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 giáo cỏ 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
- [5]. 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 giáo cỏ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino). *Kỷ yếu Hội nghị Sinh lý thực vật Toàn quốc lần thứ 3 - 2025*: 79-86.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/359587849>

Biomass Accumulation of *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino in Cell Suspension Cultures inhibiting Human Cancer Cell Growth

Article in *Research Journal of Biotechnology* · February 2022

DOI: 10.25303/1703rjbt6168

CITATIONS

4

READS

157

5 authors, including:



Tung Nguyen Thanh
Hue University

55 PUBLICATIONS 687 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Pham Thi Diem Thi
Hue University

20 PUBLICATIONS 19 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Thao Do
Vietnam Academy of Science and Technology

197 PUBLICATIONS 1,435 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Biomass Accumulation of *Gynostemma Pentaphyllum* (Thunb.) Makino in Cell Suspension Cultures inhibiting Human Cancer Cell Growth

Tung Nguyen Thanh^{1,2}, Diem Thi Pham Thi³, Sang Dang Ngoc^{3,4}, Thao Do Thi⁵ and Quang Hoang Tan^{3*}

1. Faculty of Basic Science, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue, 49000, VIETNAM

2. Institute of Biomedicine, Hue University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue, 49000, VIETNAM

3. Institute of Biotechnology, Hue University, Hue, 49000, VIETNAM

4. Vo Nguyen Giap gifted High school, Quang Binh, 47000, VIETNAM

5. Institute of Biotechnology, VAST, Hanoi, 10000, VIETNAM

*htquang@hueuni.edu.vn

Abstract

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (GpM) is a medicinal plant in traditional medicine throughout Asia for the treatment of several diseases including cancer. GpM plant cell suspension cultures provide a time and cost effective well-controlled means promising a high-yielding biomass production of pharmaceutical compounds. The purpose of the current work is to investigate the effect of GpM cell suspension cultures on human cancer cell lines growth. The biomass was produced by cell suspension culture of GpM callus into 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of liquid medium culture. Gypenosides in GpM were confirmed by HPLC. Pharmacological activities of GpM extract were tested on human cancer cell line (HepG2, Huh7, A549 and HL-60) using Sulforhodamine B (SRB) cytotoxicity assay and Tetrazolium (MTT) assay.

We successfully produced 5.485 ± 0.223 g GpM fresh biomass per 250 mL Erlenmeyer flask after 18 days culture. Total gypenosides and Rb1 in dry cell suspension were 48.844 ± 3.933 mg/g and 0.041 ± 0.004 mg/g. The crude extract from GpM cell suspension cultures exhibited significant cancerous cell growth inhibition in a dose dependent manner. From the MTT assay and SRB cytotoxicity assay, it is obvious that GpM cell suspension culture extract at 200 μ g/mL significantly inhibited the growth of multiple human cancer cells including hepatoma cell lines (HepG2, Huh7), lung carcinoma cell line (A549) and leukemia cell line (HL-60). Anti-cancer cell proliferation properties of GpM cell suspension culture were significantly higher than those of natural plants' extracts. In this framework, GpM in cell suspension cultures was found to inhibit the proliferation of several human cancer cells. Biomass accumulation of GpM in cell suspension cultures may contribute to the development of efficient strategies for plant-derived anticancer compound production.

Keywords: Plant biomass production, cell suspension cultures, *Gynostemma pentaphyllum*, cancer cell, proliferation, inhibition.

Introduction

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (GpM) has been widely used in traditional medicine throughout Asia (China, Japan, Korea, Vietnam etc.) for the treatment of several diseases including hepatitis, diabetes and cardiovascular disease and cancer¹³. Recent reports have shown that GpM exhibits a variety of biological effects such as anti-inflammatory, antioxidative, lipid metabolism regulatory, antiproliferative, immunopotentiating, neuroprotective and anxiolytic activities⁸. In Vietnam, GpM has been used as a folk medicine to treat cough and chronic bronchitis and is distributed from the plains to mountainous areas at altitudes up to 2000 m¹¹.

The most pharmacologically active components in GpM is gypenosides, molecular formula $C_{55}H_{92}O_{24}$, which are well-known pharmacologically active components in *Panax ginseng*³. Gypenosides primarily exist as dammarane type-triterpene saponins or glycosides, responsible for the herbal pharmacological activities⁸. Gypenosides from GpM are same as ginsenoside Rb1 (Gypenoside III), Rc, Rb3, Rd (Gypenoside VIII), F2, Rg3, malonyl-Rb1 and malonyl-Rd from ginseng (*Panax spp.*)¹⁹.

Cancer is among the leading cause of death globally. In 2018, the estimated number of new cases was 18.1 million and 9.6 million deaths were linked to cancer. In Vietnam, there were 164671 new cancer cases and 114 871 deaths in 2018^{6,18}. Currently, herbal medicine-based therapies have unraveled anticancer effects without significant side effects²².

GpM has recently been shown as a strong anticancer potential. Gypenosides in GpM played an important role in lung cancer cell cytotoxicity and could be used as potential cancer-preventive chemopreventive agents^{23,29}. GpM water extraction and ethanol precipitation are effective supplementary agents for the treatment of hepatocellular carcinoma via improving immune responses of host organism¹⁵. GpM also has potential for oral cancer therapy. Gypenosides isolated from GpM induce oral cancer cell death, cell cycle arrest and apoptosis¹⁶. In colorectal cancer cells, GpM induced the changes of intracellular reactive oxygen species leading to apoptosis³¹. Anti-cancer activities of GpM have been proposed regarding multiple mechanisms including immunomodulating activities, inhibition of metastasis or glycolysis, cell cycle arrest and apoptosis¹².

Medicinal plant cell suspension cultures offer promise for high-yielding production of valuable secondary metabolites and could be a promising alternative "chemical factory"³². Plant cell culture in bioreactors provides a time and cost effective well-controlled means for large quantities of biomass production of pharmaceutical agents of industrial importance²⁵. Up to date, numerous anticancer compounds in medicinal plant are produced through application of plant cell and tissue culture such as *Catharanthus roseus*, *Dioscorea doryphora*, *Ginkgo biloba*, *Arnebia euchroma* and *Coleus blumei*².

GpM suspension cells cultures are potential sources of biomass production of anti-cancer and other pharmacological agents. Biological activities of GpM suspension cells culture are not well studied. The purpose of this study is to investigate the human cancer cell lines growth inhibition of GpM cell suspension cultures.

Material and Methods

Plant biomass production: Cells suspension culture was conducted by transfer of 3 g of 30-day-old callus into 250 mL Erlenmeyer flask containing 50 mL of liquid medium culture. The medium consists of basic MS components¹⁷ supplemented with 3% sucrose, 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA. Culture flasks were then incubated at 25±2°C, shaking speed of 120 rpm¹. The cell biomass was harvested after 18 days of culture for determination of the fresh and dry weights and gypenosides content.

Extraction preparation: Fresh cells biomass was filtered, washed with distilled water and weighed. The dry weight was determined by drying the fresh biomass at 50°C until a constant weight was obtained. 10 g dried samples (cells biomass or natural leaf and stem of GpM) were extracted with 10 mL of 80% methanol assisted with ultrasonication for 30 mins, repeated for 3 times and evaporated at room temperature²⁸. The residues were used for human cancer cytotoxicity assay.

Total gypenosides quantification: Total gypenosides concentration was estimated by colorimetric methods^{7,9}. Ten milligram of gypenosides residue were dissolved in 5 mL of 80% methanol. Fifty ml of solution was transferred to another test tube and 0.25 mL of vanillin reagent (8% w/v) was added. The reaction solution was placed on ice and 2.5 mL of 72% (v/v) sulphuric acid was added, mixed and left for 3 min. The test tube was warmed to 60°C for 10 min and then cooled in ice. Absorbance was measured at 544 nm using UV-Vis scanning spectrophotometer (Spectro UV-2650, Labomed, Inc.). Gypenosides content was calculated based on the ginsenoside Rb1 (Y0001347, CRS) standard curves.

Rb1 quantification: The residues were re-suspended in methanol to final concentration of approximately 5 mg/mL and filtered (0.22 µm). Rb1 content was qualified by HPLC with Alliance E2695 system with C18 column (4.6 mm ×

250 mm × 5 mm). The mobile phase consists of acetonitrile (34%) and distiller water (56%). HPLC procedure was conducted for 20 minutes with flow rate at 0.8 mL/min, injected volume of 20 µL and column temperature of 30°C. The signal was measured by PDA2998 detector at a wavelength of 203 nm¹⁴. Rb1 content was calculated based on the peak area of HPLC dendrogram compared with the standard Rb1.

Human cancer cell culture: Human cell line was a kind gift of Prof. Pezzuto J. M. (Long-Island University, New York, USA) and Prof. Maier J. (Milan University, Milan, Italy). The hepatocarcinoma cell lines (HepG2, Huh7) and lung carcinoma cell line (A549) were adherent cultured on T75 culture flasks (Nunc, Denmark) while human leukemia cell line (HL-60) was cultured in suspension. Cells were incubated in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) or MEME (Minimum Essential Medium with Eagle salt) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all from Invitrogen Gibco) at 37°C under 5% CO₂. The cells were sub-cultured upon reaching 80% confluence.

The cell viability was determined by trypan blue exclusion using a hemocytometer. Six thousand cells were seeded in 200 µL of medium per well of 96-well flat-bottom culture plates (Nunc, Denmark) and incubated for 24 h. Then, old medium was removed before treating cells with GpM extract at the concentration of 4, 20, 100 and 200 µg/mL for 72 hours. Another plate without sample treatment will be incubated for 30 minutes and served as day 0.

Sulforhodamine B (SRB) cytotoxicity assay: The sulforhodamine B (SRB) assay was performed as previously described²⁴. After an incubation with GpM extract, cell monolayers of HepG2, Huh7 and A549 were fixed with trichloroacetic acid (10% wt/vol). The fixed cells were stained with sulforhodamine B for 30 min, then wash the cells repeatedly with acetic acid (1% vol/vol) to remove the unbound dye. The cell growth was assessed by dissolving the protein-bound dye in 10 mM Tris base solution and optical density specifically determination at 540 nm wavelength.

Tetrazolium (MTT) assay: Human leukemia HL-60 cells cytotoxicity and proliferation were assessed using the MTT chromophore²⁰. Briefly, HL-60 cells suspension were seeded at a density of 4×10⁴ cells/mL in 96 well tissue culture plates. Cells were treated with various concentrations of GpM for 24 h in culture medium. The tetrazolium salt MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and incubated for 4 hours at 37°C in humidified 5% CO₂ incubator. Cell culture plates were centrifuged and carefully aspirated in supernatant culture medium.

The formazan crystals produced by cell metabolism were dissolved in DMSO and the absorbance (OD) values were determined at 570 nm using a microplate reader.

$$\% \text{ Inhibition} = 100\% - \frac{OD(\text{treated cells}) - OD(\text{Day 0})}{OD(\text{DMSO}) - OD(\text{Day 0})}$$

Statistical analysis: All experiments were repeated three times. Data were reported as mean $\pm$ standard deviation. To evaluate significant differences, the means were compared using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. Differences were considered to be statistically significant if $P < 0.05$.

Results

Plant biomass production by cell suspension culture:

GpM biomass was produced by cell suspension culture. 3 g of callus were cultured in 50 mL of liquid medium at shaking speed of 120 rpm for 18 days¹. Biomass accumulation in the same condition was shown in table 1. In the suspension cells culture, the cells biomass reached 5.485 ± 0.223 g/flask corresponding of 0.155 ± 0.034 g dry biomass (Table 1 and fig. 1).

Bioactive compounds in cell suspension culture: In 50 mL GpM cells suspension culture, the accumulation of total gypenosides and Rb1 was 48.844 ± 3.933 mg/g and 0.041 ± 0.004 mg/g dry cells weight respectively. In methanol extraction, total gypenosides was 472.159 ± 59.098 mg/g dry weight, Rb1 content was 0.394 ± 0.021 mg/g dry weight and gypenosides occupied approximate 47% of methanol extraction.

In natural product of GpM including 50% of dry leaf and 50% of dry stem, the accumulation of total gypenosides was 37.270 ± 4.710 mg/g dry weight while Rb1 content was 0.072 ± 0.021 mg Rb1/g dry weight.

In methanol extraction, total gypenosides and Rb1 were 369.489 ± 25.317 mg/g and 0.697 ± 0.081 mg/g dry weight respectively. Gypenosides occupied approximate 37% of methanol extraction.

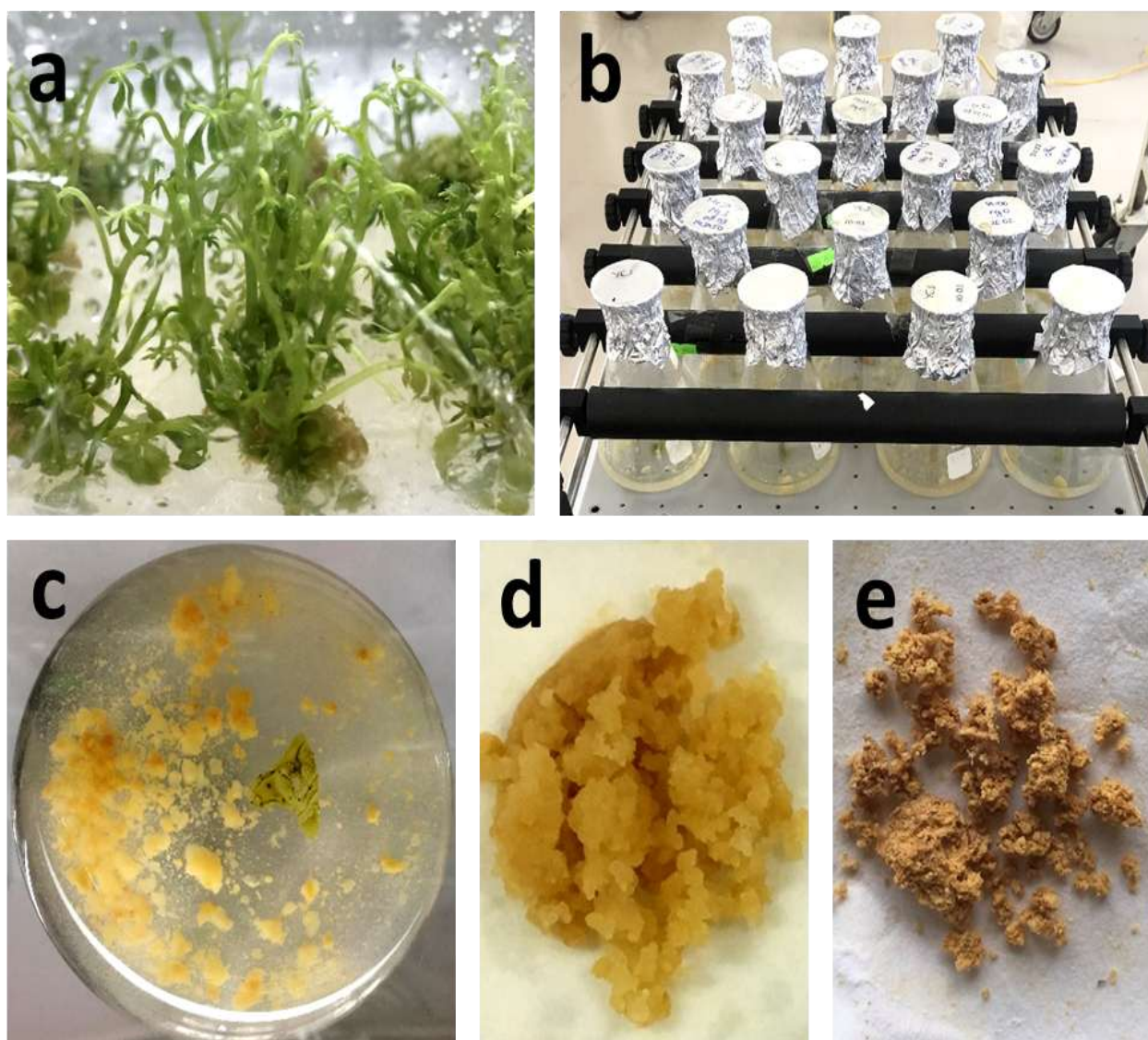


Figure 1: GpM biomass production by cell suspension culture.

a. *In vitro* propagation of GpM, b. cell suspension culture in shake flasks c. suspension cells, d. fresh cell suspension culture biomass, e. dry cell suspension culture biomass.

Total gypenosides in dry biomass in extract of cell suspension culture were significantly higher than those in natural plant biomass ($P < 0.05$) (Figure 2c and e). Meanwhile, RB1 in dry biomass in extract of cell suspension culture was significantly lower than those in natural plant biomass ($P < 0.005$) (Figure 2d and f). HPLC analysis showed that more compounds were detected in natural sample than in suspension cells such as retention times were 3.58 min, 6.11 min (Fig. 2). However, some compounds in cell had higher content than in natural sample, such as the retention time was 2.41 min.

The effect of GpM Extract on Cell Proliferation of Human lung carcinoma cell line (A549): To examine the cancer cell inhibitory effect of the GpM extract, we did SRB assay using human lung carcinoma cell line (A549). The GpM extracts presented concentration-dependent inhibition of A549 cell proliferation (Figure 3a). The inhibition effect of the highest concentration of extracts (200 $\mu\text{g/mL}$) was 25.15 ± 2.03 and $37.68 \pm 1.26\%$ for the natural GpM and plant cell suspension culture extracts. There was a significant

difference of the inhibition of cell proliferation in the GpM extracts between natural and plant cell suspension culture for A549 cells.

The effect of GpM Extract on Cell Proliferation of Human hepatoma cell lines (HepG2 and Huh7): In human hepatoma cell lines, GpM extracts from natural and plant cell suspension culture inhibited proliferation of both HepG2 and Huh7 cells (Figure 3b and c). Growth inhibition of HepG2 and Huh7 cells was increased dramatically at higher concentrations (100-200 $\mu\text{g/mL}$). The extract in concentrations of 200 $\mu\text{g/mL}$ showed the highest inhibiting activity in natural extract (34.36 ± 1.12 in HepG2 and 36.07 ± 1.89 in Huh7) as well as in cell suspension culture (41.16 ± 2.28 in HepG2 and 44.43 ± 1.65 in Huh7).

The Effect of GpM Extract on Cell Proliferation of Human leukemia cell line (HL-60): The extracts from natural and plant cell suspension culture inhibited human leukemia cell proliferation at the two highest concentrations 100 and 200 $\mu\text{g/mL}$.

Table 1
Total gypenosides accumulation in GpM samples ($M \pm SD$)

Samples	Natural plant	Cell suspension culture
Fresh weight (g)	-	5.485 ± 0.223
Dry weight (g)	-	0.155 ± 0.034
Total gypenosides in dry cells (mg/g)	37.270 ± 4.710	48.844 ± 3.933
RB1 in dry cells (mg/g dry weight)	0.072 ± 0.021	0.041 ± 0.004
Total gypenosides in extraction (mg/g)	369.489 ± 25.317	472.159 ± 59.098
RB1 in extraction (mg/g dry weight)	0.697 ± 0.081	0.394 ± 0.021

Table 2
Comparison the cancer cell growth inhibitory potential of natural GpM and plant cell suspension culture

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)		
	Natural plant	Cell suspension culture	Significant
Human lung carcinoma cell line (A549)			
4	0.72 ± 0.79	0.9 ± 0.39	NS
20	6.98 ± 1.18	6.03 ± 0.62	NS
100	23.56 ± 1.52	13.88 ± 0.28	$P < 0.05$
200	25.15 ± 2.03	37.68 ± 1.26	$P < 0.05$
Human hepatoma cell line (HepG2)			
4	0.63 ± 0.38	0.69 ± 0.13	NS
20	8.93 ± 0.6	8.81 ± 0.93	NS
100	22.51 ± 0.58	32.89 ± 1.43	$P < 0.05$
200	34.36 ± 1.12	41.16 ± 2.18	$P < 0.05$
Human hepatoma cell line (Huh7)			
4	2.44 ± 0.13	1.72 ± 0.47	NS
20	7.24 ± 1.06	7.42 ± 0.57	NS
100	34.84 ± 1.72	15.19 ± 0.63	$P < 0.05$
200	36.07 ± 1.89	44.43 ± 1.65	$P < 0.05$
Human leukemia cell line (HL-60)			
4	3.57 ± 0.62	5.88 ± 0.93	NS
20	6.42 ± 0.93	11.23 ± 1.41	NS
100	33.51 ± 2.02	39.04 ± 1.07	NS
200	42.17 ± 2.48	48.76 ± 1.94	$P < 0.05$

In principle, there was a statistically significant difference in the inhibition of the proliferation between the extracts from natural and plant cell suspension culture. Human leukemia cell proliferation was significantly inhibited by the GpM extract in concentrations of 200 $\mu\text{g/ml}$ in both GpM from natural (42.17 ± 2.48) and cell biomass (48.76 ± 1.94)

Discussion

Medicinal plants have been used worldwide since ancient time. The pharmacological properties of medicinal plants are based on their phytochemical components especially the secondary metabolites which are outstanding sources of value added bioactive compounds. Extended use of these

metabolites in pharmaceutical industry has initiated a need to focus research on increasing the production by employing plant tissue culture techniques. Plant tissue culture techniques being independent of climatic and geographical conditions will provide an incessant, sustainable, economical and viable production of secondary metabolites².

In this study, gypenosides had good accumulation in the suspension cells, total gypenosides were 48.844 ± 3.933 mg/g dry weight, higher than that of natural product (37.270 ± 4.710 mg/g dry weight). However, biosynthesis of Rb1 in cells was lower than natural plant (0.041 ± 0.004 mg Rb1/g dry cells weight against 0.072 ± 0.021 mg/g dry weight).

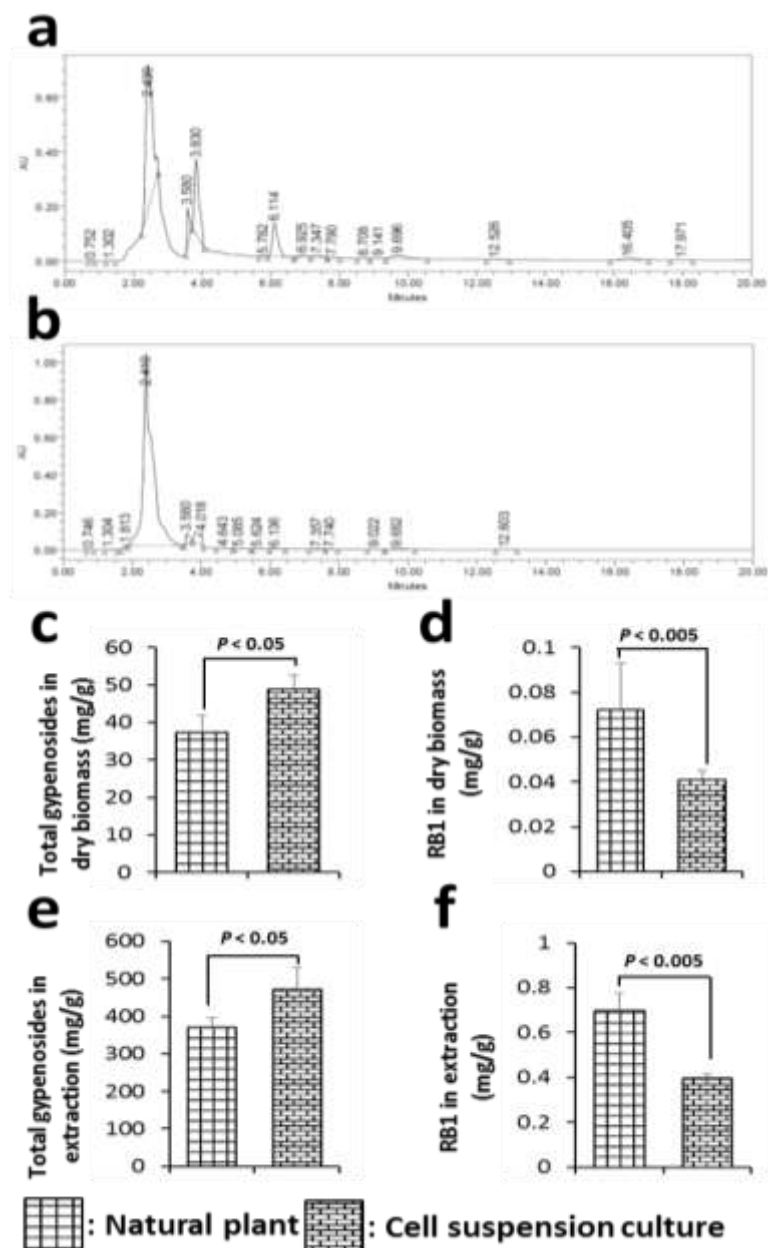


Figure 2: Bioactive compounds analysis of GpM biomass.

a. HPLC profile of GpM extract from natural plant biomass, b. HPLC profile of GpM extract from cells suspension culture, c. Comparison of total gypenosides in dry biomass of natural and plant cell culture, d. Comparison of Rb1 in dry biomass of natural and plant cell culture, e. Comparison of total gypenosides in extract of natural and plant cell culture, f. Comparison of Rb1 in extract of natural and plant cell culture

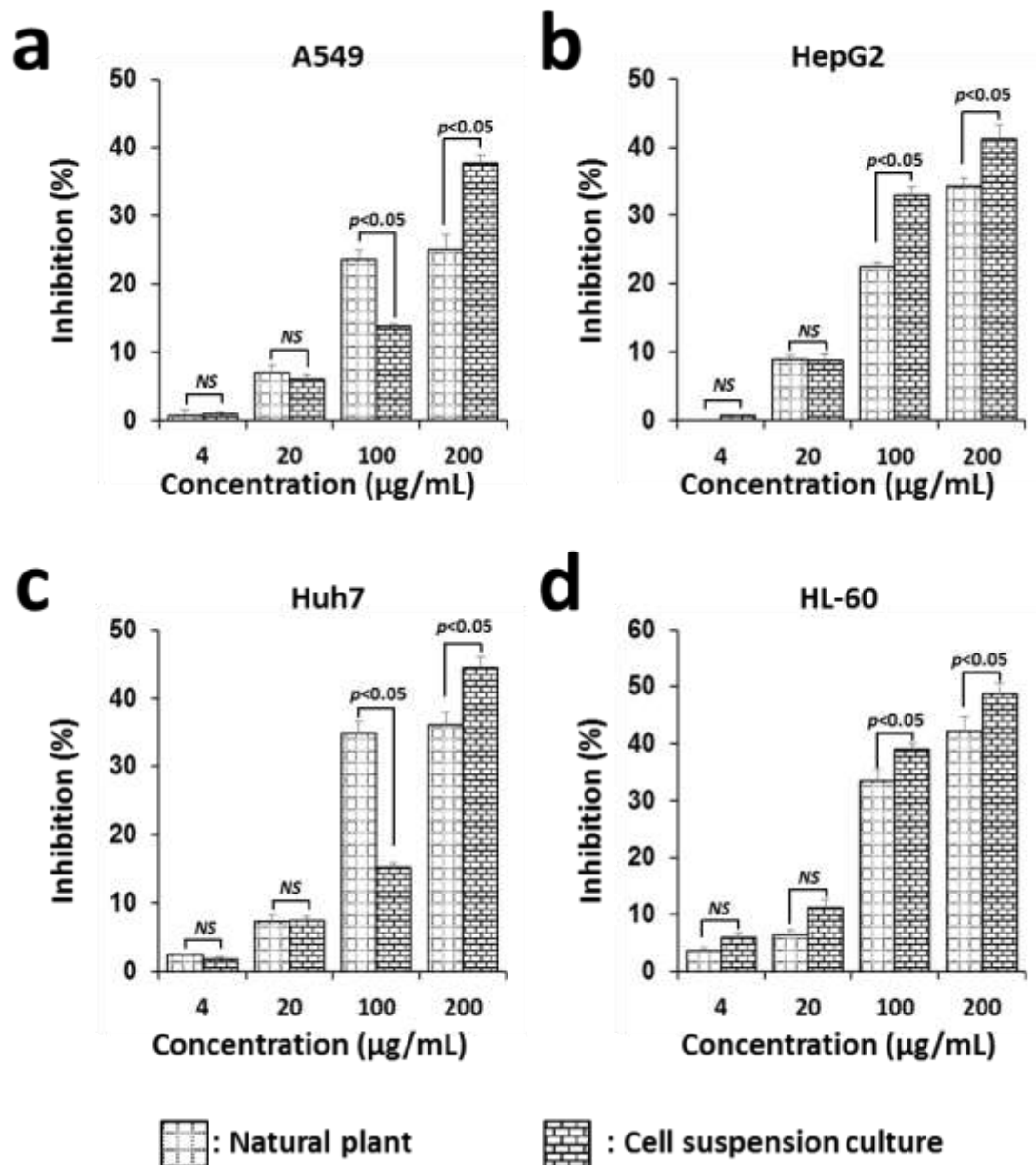


Figure 3: The effects of natural GpM and plant cell suspension culture on proliferation of human cancer cell lines. a. Human lung carcinoma cell line (A549). b. Human hepatoma cell line (HepG2). c. Human hepatoma cell line (Huh7). d. Human leukemia cell line (HL-60). $p<0.05$: Significant; NS: Non-significant

Biosynthesis of valuable secondary compounds in suspension cells higher than that of natural plants was previously reported for example production of rosmarinic acid from *Lavandula officinalis*²⁷, phenylethylamines dopamine and tyramine in *Piper cernuum*⁵ cell culture. Secondary metabolites have complex chemical composition and are produced in response to various forms of stress to perform different physiological tasks in plants². The different stress in cell culture system and natural condition may lead to the different accumulation of gypenosides in GpM cell and natural biomass.

Natural extract of GpM has been investigated as a potent anti-cancer agent against several types of cancers cell *in*

vitro proliferation including breast cancer, lung cancer, colorectal cancer cells, prostate cancer and liver cancer cell^{4,10,13,26,30,31}.

Li et al¹² isolated a nonpolar fraction EA1.3A from GpM (including alkaloids, organic esters, terpenes and catechol substance) and showed potent cancer suppression activities against four cancer cell lines (Human breast adenocarcinoma cell lines MDA-MB-453 and MCF7, human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP and human colorectal carcinoma cell line HCT116). The nonpolar fraction EA1.3A from GpM suppresses cancer cell proliferation through signaling pathways mediating apoptosis and cell cycle arrest.

Wang et al²⁶ showed that four compounds (including 3,4-dihydroxy phenyl-O- β -D-glucoside, gypenoside XLVI, gypenoside L and ginsenoside Rd) were isolated from the ethyl acetate and n-butanol fractions of GpM. Gypenoside L and ginsenoside Rd displayed a strong interference effect on the proliferation of breast cancer (MCF-7) and lung cancer (A549) cell line.

Cheng et al⁴ isolated both flavonoid and saponin fractions from GpM, both fractions induced cell cycle arrest of prostate cancer cell PC-3 at both S and G2/M phases. GpM induced an increase both early and late apoptotic cell populations in dose-dependent. Xing et al³⁰ reported that Damulin B, a dammarane-type saponin isolated from GpM, showed the strong potent growth inhibitory activities against human lung carcinoma A549 cells. Damulin B exhibited an anti-cancer effect by inducing apoptosis, suppressing migration and cell cycle arrest at early G0/G1 phase³⁰.

Mechanisms of effect of gypenosides from GpM on human colorectal cancer SW-480 cells were investigated by Yan et al.³¹ Gypenosides from GpM may imply mitochondria damage, ROS generation and induce apoptosis on human colorectal cancer cells.

In 2020, Hussain et al¹⁰ reported the anticancer activity potential of GpM extract on liver cancer cell (HepG2) cycle arrest and apoptotic induction. GpM extract inhibited the growth of HepG2 cells by arrested G0/G1 phase cell cycle via regulating the gene expression. In addition, GpM extract induced apoptosis of HepG2 cells via generation of intracellular reactive oxygen species, mitochondrial pathway and death receptor.

Conclusion

First evidence of GpM saponins as an effective anti-cancer agent for the treatment the Apc^{Min/+} colorectal cancer mouse model was reported by Tai et al²¹. Results show that GpM saponins treatment could significantly inhibit polyp formation in colorectal cancer mice. The anti-cancer effect of GpM saponins was mediated through modulation of JNK/p38 MAPK signaling, upregulation of Prdx1 and Prdx2 and suppression of Ras, RAF/MEK/ERK/STAT, PI3K/AKT/mTOR signaling. Moreover, GpM saponins could enhance the anti-cancer efficacy of 5-FU as an adjuvant in the treatment of colorectal cancer²¹.

Although many report show the anti-cancer effect of natural GpM extract on both *in vitro* and *in vivo*, there is no evidence to explain whether GpM cell suspension can inhibit cancer. Our results provide the evidence that biomass accumulation of GpM in cell suspension cultures inhibits human cancer cell growth *in vitro*.

Acknowledgement

This study was financial supported from Vietnam Ministry of Education and Training (Project No. B2019-DHH-562-09). The authors also acknowledge the partial support of Hue

University under the Core Research Program, Grant No. NCM.DHH.2020.12”).

References

1. Anh T.T.N., Thi P.T.D., Lan T.T., Dung T.Q., Vu N.Q.H., Phuong T.T.B. and Quang H.T., Affect of culture conditions on growth and accumulation of saponin Rb1 in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino suspension cells, Proceedings of 2020 Vietnam national conference on biotechnology, 885-890 (in Vietnamese) (2020)
2. Chandran H., Meena M., Barupal T. and Sharma K., Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds, *Biotechnology Reports*, **26**, e00450-e00450 (2020)
3. Chen P.Y. et al, New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *Molecules*, **24**(7), 1375 (2019)
4. Cheng T.C., Lu J.F., Wang J.S., Lin L.J., Kuo H.I. and Chen B.H., 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 (2011)
5. Danelutte A.P., Costantin M.B., Delgado G.E., Braz-Filho R. and Kato M.J., Divergence of secondary metabolism in cell suspension cultures and differentiated plants of *Piper cernuum* and *P. crassinervium*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **16**, 1425-1430 (2005)
6. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Mathers C., Parkin D.M., Pineros M., Znaor A. and Bray F., Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods, *Int J Cancer*, **144**(8), 1941-1953 (2019)
7. Goel N.G., Sirohi S.K. and Dwivedi J., Estimation of total saponins and evaluate their effect on *in vitro* methanogenesis and rumen fermentation pattern in wheat straw based diet, *J. Adv. Vet. Res.*, **2**, 120-126 (2012)
8. He Q., Li J.K., Li F., Li R.G., Zhan G.Q., Li G., Du W.X. and Tan H.B., Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats, *World J Gastroenterol*, **21**(7), 2058-2066 (2015)
9. Hiai S., Oura H. and Nakajima T., Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid, *Planta Med*, **29**(2), 116-122 (1976)
10. Hussain S.S., Zhang F., Zhang Y., Thakur K., Naudhani M., Cespedes-Acuña C.L. and Wei Z., 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 (2020)
11. Ky P.T. et al, Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *Phytochemistry*, **71**(8-9), 994-1001 (2010)
12. Li Y., Huang J., Lin W., Yuan Z., Feng S., Xie Y. and Ma W., *In vitro* Anticancer Activity of a Nonpolar Fraction from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2016**, 6308649 (2016)

13. Li Y., Lin W., Huang J., Xie Y. and Ma W., Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino (Jiaogulan), *Chin Med*, **11**, 43 (2016)
14. Liu F., Ren D., Guo D.A., Pan Y., Zhang H. and Hu P., Method Development for Gypenosides Fingerprint by High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and the Addition of Internal Standard, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **56**(3), 389-393 (2008)
15. Liu J., Zhang L., Ren Y., Gao Y., Kang L. and Qiao Q., Anticancer and immunoregulatory activity of *Gynostemma pentaphyllum* polysaccharides in H22 tumor-bearing mice, *Int J Biol Macromol*, **69**, 1-4 (2014)
16. Lu K.W., Ma Y.S., Yu F.S., Huang Y.P., Chu Y.L., Wu R.S., Liao C.L., Chueh F.S. and Chung J.G., Gypenosides induce cell death and alter gene expression in human oral cancer HSC-3 cells, *Exp Ther Med*, **14**(3), 2469-2476 (2017)
17. Murashige T. and Skoog F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**(3), 473-497 (1962)
18. Pham T., Bui L., Kim G., Hoang D., Tran T. and Hoang M., Cancers in Vietnam-Burden and Control Efforts: A Narrative Scoping Review, *Cancer Control*, **26**(1), 1073274819863802 (2019)
19. Razmovski-Naumovski V., Huang T.H.W., Tran V.H., Li G.Q., Duke C.C. and Roufogalis B.D., Chemistry and Pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*, *Phytochemistry Reviews*, **4**(2), 197-219 (2005)
20. Shahneh F.Z., Valiyari S., Azadmehr A., Hajiaghaee R., Yaripour S., Bandehagh A. and Baradaran B., Inhibition of Growth and Induction of Apoptosis in Fibrosarcoma Cell Lines by *Echinophora platyloba* DC: In Vitro Analysis, *Adv Pharmacol Sci*, **2013**, 512931 (2013)
21. Tai W.C., Wong W.Y., Lee M.M., Chan B.D., Lu C. and Hsiao W.L. Mechanistic study of the anti-cancer effect of *Gynostemma pentaphyllum* saponins in the Apc(Min/+) mouse model, *Proteomics*, **16**(10), 1557-1569 (2016)
22. Tavakoli J., Miar S., Majid Zadehzare M. and Akbari H., Evaluation of effectiveness of herbal medication in cancer care: a review study, *Iran J Cancer Prev*, **5**(3), 144-156 (2012)
23. Tsui K.C., Chiang T.H., Wang J.S., Lin L.J., Chao W.C., Chen B.H. and Lu J.F., Flavonoids from *Gynostemma pentaphyllum* exhibit differential induction of cell cycle arrest in H460 and A549 cancer cells, *Molecules*, **19**(11), 17663-17681 (2014)
24. Vajrabhaya L.O. and Korsuwannawong S., Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays, *Journal of Analytical Science and Technology*, **9**(1), 15 (2018)
25. Valdiani A., Hansen O.K., Nielsen U.B., Johannsen V.K., Shariat M., Georgiev M.I., Omidvar V., Ebrahimi M., Tavakoli Dinanai E. and Abiri R., Bioreactor-based advances in plant tissue and cell culture: challenges and prospects, *Crit Rev Biotechnol*, **39**(1), 20-34 (2018)
26. Wang T.X., Shi M.M. and Jiang J.G., Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and antioxidant compounds from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, *RSC Advances*, **8**(41), 23181-23190 (2018)
27. Wilken D., Jiménez González E., Hohe A., Jordan M., Gomez Kosky R., Schmeda Hirschmann G. and Gerth A., Comparison of secondary plant metabolite production in cell suspension, callus culture and temporary immersion system, Pages 525-537 in Hvoslef-Eide A.K. and Preil W., eds., *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Dordrecht: Springer Netherlands (2005)
28. Wu Q., Jang M. and Piao X.L., Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **78**(2), 311-316 (2014)
29. Xing S.F., Liu L.H., Zu M.L., Ding X.F., Cui W.Y., Chang T. and Piao X.L., The inhibitory effect of gypenoside stereoisomers, gypenoside L and gypenoside LI, isolated from *Gynostemma pentaphyllum* on the growth of human lung cancer A549 cells, *J Ethnopharmacol*, **219**, 161-172 (2018)
30. Xing S.F., Liu L.H., Zu M.L., Lin M., Zhai X.F. and Piao X.L., Inhibitory Effect of Damulin B from *Gynostemma pentaphyllum* on Human Lung Cancer Cells, *Planta Med*, **85**(5), 394-405 (2019)
31. Yan H., Wang X., Niu J., Wang Y., Wang P. and Liu Q., Anti-cancer effect and the underlying mechanisms of gypenosides on human colorectal cancer SW-480 cells, *PLoS One*, **9**(4), e95609 (2014)
32. Yue W., Ming Q.L., Lin B., Rahman K., Cheng Z., Han T. and Qin L.P., Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, **36**, 1-18 (2014).

(Received 16th June 2021, accepted 19th August 2021)

Article

Effects of Plant Elicitors on Growth and Gypenosides Biosynthesis in Cell Culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*)

Hoang Tan Quang ^{1,*} , Pham Thi Diem Thi ¹, Dang Ngoc Sang ^{1,2}, Tran Thi Ngoc Tram ¹, Nguyen Duc Huy ¹, Tran Quoc Dung ³ and Quach Thi Thu The ⁴

- ¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Hue 49000, Vietnam; ptdiemthi@hueuni.edu.vn (P.T.D.T.); dangngocsang@chuyen-qb.com (D.N.S.); 98ngoctram@gmail.com (T.T.N.T.); ndhuy@hueuni.edu.vn (N.D.H.)
² Vo Nguyen Giap Gifted High School, Quang Binh 47000, Vietnam
³ University of Education, Hue University, Hue 49000, Vietnam; tranquocdung@hueuni.edu.vn
⁴ University of Science and Education, The University of Danang, Danang 50000, Vietnam; thuthe1411999@gmail.com
* Correspondence: htquang@hueuni.edu.vn; Tel.: +84-983735509

Abstract: *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) is used in Northeast and Southeast Asia countries for the treatment of various diseases, including hepatitis, diabetes, and cardiovascular disease. *G. pentaphyllum* saponins (gypenosides) are the major components responsible for the pharmacological activities. In this study, different concentrations of abiotic (25–200 μ M methyl jasmonate-MeJA and salicylic acid-SA) or biotic elicitors (1–5 g/L yeast extract-YE and *Fusarium* biomass) were used as plant elicitors, in order to investigate their influences on cell growth and gypenosides accumulation in *G. pentaphyllum* suspension cells. Suspension cells were grown on a MS medium containing 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA, with initial inoculum sizes of 3 g and shaking speeds of 120 rpm for 18 days. Gypenoside and Rb1 contents were measured by colorimetric and HPLC methods. Among three elicitors, SA was suitable for gypenosides accumulation in individual treatment. The cell biomass had the same values in elicited and control suspension cells. Gypenosides content in cells treated with 100 μ M salicylic acid after 6 days of culture reached a maximum value of 79.721 mg gypenoside/g dry biomass (including 0.093 mg ginsenoside Rb1/mg dry weight), which was 2.18-folds higher than that of the natural product. The elicitation promises an efficiency strategy for the production gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells.

Keywords: elicitation; gypenosides; methyl jasmonate; salicylic acid; suspension cells culture



Citation: Quang, H.T.; Thi, P.T.D.; Sang, D.N.; Tram, T.T.N.; Huy, N.D.; Dung, T.Q.; The, Q.T.T. Effects of Plant Elicitors on Growth and Gypenosides Biosynthesis in Cell Culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*). *Molecules* **2022**, *27*, 2972. <https://doi.org/10.3390/molecules27092972>

Academic Editors: Alexandra Christine Helena F. Sawaya and Maria Cristina Marcucci

Received: 12 April 2022

Accepted: 4 May 2022

Published: 6 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Gynostemma pentaphyllum, belonging to *Cucurbitaceae*, is a perennial creeping medicinal plant, widely distributed in China, as well as Japan, Korea, and other Southeast Asian countries. *G. pentaphyllum* exhibits a wide range of biological activities, consisting of antioxidant, anticancer, anti-hyperlipidemic, hypoglycemic, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities, as well as atherosclerotic effects [1]. Dammarane-type triterpene saponins (called gypenosides) are the major components responsible for the pharmacological activities. Over 180 gypenosides from *G. pentaphyllum* have been isolated and characterized [2].

Gypenosides are structurally similar as the ginsenosides, which are well-known pharmacologically active components of ginseng root (*Panax ginseng*) [2]. The content of triterpene saponins in *G. pentaphyllum* is almost five times higher than that of *Panax ginseng*. In addition, *G. pentaphyllum* is much easier for cultivation, and its growth is faster than *p. ginseng*. Therefore, *G. pentaphyllum* is a good alternative resource for gypenoside production and has attracted great interest worldwide [3]. Ginsenoside Rb1 belongs to

protopanaxadiol ginsenosides (PPD), in which sugar residues attached to the β -OH at position C3 and/or C20 [4]. Rb1 is one of the most important 20(S)-protopanaxadiol-type ginsenosides that exhibits the importance pharmacological activities, including antitumor, neuroprotective, cardiovascular-protective, anti-aging effects, anti-apoptosis, and anti-oxidative stress, etc. [5–7].

Plant tissue culture is considering a methodology for the large scale production of plant secondary metabolites (PSMs), with less time consumption and being more cost-effective than parent wide-type cultivation [8]. Biotechnological approaches, such as plant and suspension cell cultures, have been extensively applied for enhancing the production of PSMs [9]. Among of factors affecting on PSMs production, elicitors have been reported as common effectiveness factor [8]. In particular, elicitors act as stress agents that further induce the secondary metabolites accumulation in parent plants, as well as plant cell cultures. The production of secondary products is regarded as a part of the defense system of the intact plant [10]. Meanwhile, methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA) are two key signaling molecules that trigger cell defense mechanisms in planta during herbivore predation, thus activating secondary metabolites production [11].

Elicitors have also been shown to induce a range of other plant secondary metabolites. For example, MeJA can increase the eurycomanone production in *Eurycoma longifolia* cells [12]. Yeast extract (YE) enhances the solasodine biosynthesis in *Solanum hainanense* cells [13] or ginsenosides production in *Panax quinquefolium* hairy roots [14]. Salicylic acid stimulates the accumulation of phenolic compounds in *Phoenix dactylifera* [15] or madecassoside in *Centella asiatica* cells [16]. Pathogen fungi *Fusarium oxysporum* was also used as a plant elicitor, such as for increasing the rutin, hypersoid, and quercitin production in the tissue cultures of *Hypericum triquetrifolium* [17] or enhancing the expression of pathogenesis-related genes 1 (NPR1)-liked gene in bananas [18].

However, there are limited information on gypenosides production in *Giao co lam* cell cultures. To our knowledge, gypenosides production in elicited-suspension cell cultures are not well-studied. The aims of this study were to establish a *G. pentaphyllum* suspension cells culture system, in integration with elicitors treatment for gypenosides production, as well as the analysis of the gypenosides accumulated in the cells.

2. Results

2.1. Determination of Rb1 in Suspension Cell

G. pentaphyllum suspension cells were reported to reach maximal accumulated gypenosides after an 18 day culture [19]; thus, in this work, the gypenosides biosynthesis from in vitro cultures were evaluated at day 18 of culture.

HPLC analysis of non-elicited cell (control) and Rb1 standard showed a corresponding peak, with a retention time of 6.8 min (Figure 1). Thus, Rb1 are accumulating in *Giao co lam* cells, and Rb1 was further used for gypenosides quantification.

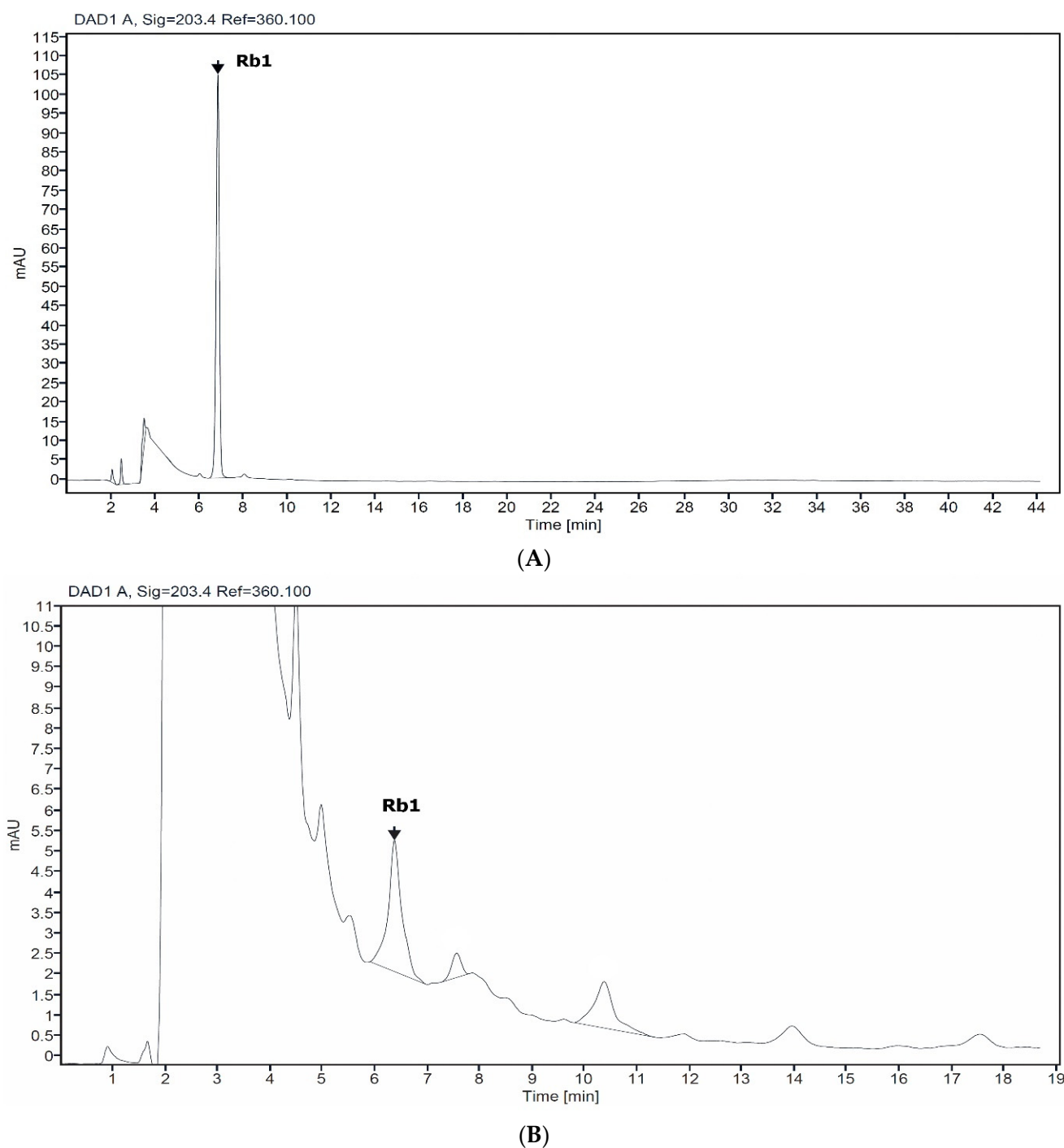


Figure 1. HPLC chromatogram profile of standard Rb1 (A) and suspension cell of *Giao co lam* (B).

2.2. Effect of Elicitor Concentrations

Different concentrations of abiotic (MeJA and SA) or biotic elicitors (g/L YE and *Fusarium* biomass-Fox) were used to investigate their influences on cell growth and gypenosides accumulation. Data in Table 1 show that MeJA, in all concentrations, inhibited the cell growth, with dry weight ranges between 0.063 and 0.165 g/flask (non-elicited control: 0.190 g/flask). The total gypenosides level increased, with a maximum value of 58.116 mg/g dry weight at 50 μ M (Rb1 concentration was 0.053 mg/g dry weight), slightly higher than that of the control (50.545 and 0.048 mg/g dry weight). Similar results occurred when YE (3 g/L) was added to the medium, at which, the highest gypenosides content was 73.767 mg/g dry weight (0.066 mg Rb1/g dry weight) (Table 2).

Table 1. Effects of concentrations of MeJA and SA on the cell growth and gypenosides accumulation.

Concentrations (mM)	Elicitors	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)	Gypenosides (mg/g Dry Weight)	Rb1 (mg/g Dry Weight)
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 ^{bcde}	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 ^{bcde}	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}

Different letters (a, b, c, ...) in each column indicate significantly different means (Duncan's test, $p < 0.05$).

Table 2. Effects of concentrations of YE and Fox on the cell growth and gypenosides accumulation.

Concentrations (g/L)	Elicitors	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)	Gypenosides (mg/g Dry Weight)	Rb1 (mg/g Dry Weight)
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

Different letters (a, b, c, ...) in each column indicate significantly different means (Duncan's test, $p < 0.05$).

Among the four elicitors, SA is the best one for cell growth and gypenosides accumulation. Gypenosides concentration reached the highest value of 76.809 mg/g dry weight (0.075 mg Rb1/g dry weight) when 100 μ M SA was added, which is about 1.52-time higher than the control (Table 1). In contrast, supplementation *Fusarium* biomass decreased on both cell cultures dry weight and gypenoside concentration of *Giao co lam* cell. The cell growth dramatically decreased when the Fox concentration increased from 1–5 g/L, while the gypenosides content in all Fox treatments was lower (23.066–36.790 mg/g dry weight).

The results in Tables 1 and 2 indicate that Rb1 biosynthesis had the same profiles, with gypenosides accumulation in elicited *G. pentaphyllum* suspension cells. The optimum elicitor concentrations for gypenosides biosynthesis (100 μ M SA, 50 μ M MeJA, or 3 g/L YE) were also the best treatment of each elicitor for Rb1 accumulation.

2.3. Effect of Elicitation Time

The timing of elicitor addition is a critical factor that affect the response of in vitro cultured plant cells [12]. The optimal concentrations of elicitors, from the above investigations, were applied to determine suitable elicitation period for improvement of gypenosides productivity. *Fusarium* biomass was not good for cell growth and gypenosides accumulation, so it was eliminated in this investigation.

The results showed that the gypenosides content in treated cells with 100 μ M SA reached maximum value of 79.721 mg/g dry weight (0.093 mg Rb1/mg dry weight) after 6 days of culture (Table 3, Figure 2), resulting in 1.58-, 1.53-, and 2.18-times higher results than that of non-elicited cells (Table 1) and the leaves and stems of natural product, respectively [20].

Table 3. Effect of elicitation times on the cell growth and gypenosides accumulation.

Treatment Days	Elicitors	Fresh Weight (g)	Dry Weight (g)	Total Gypenosides (mg/g Dry Weight)	Rb1 (mg/g Dry Weight)
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

Different letters (a, b, c, . . .) in each column indicate significantly different means (Duncan's test, $p < 0.05$).

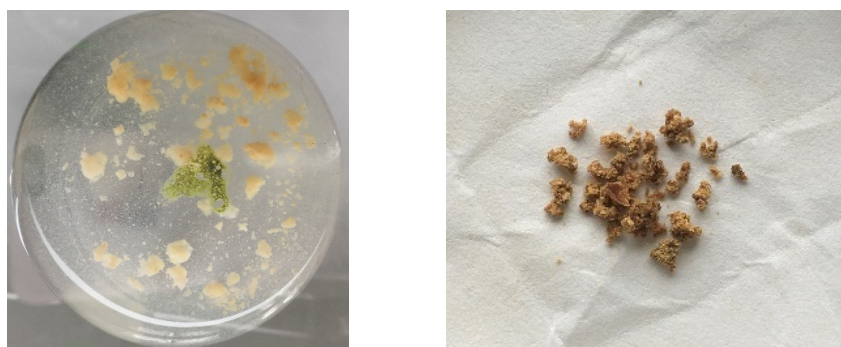


Figure 2. Suspension cells and dry biomass of *Giao co lam*, elicited with 100 μ M SA after 6 days of culture.

In other treatments, gypenosides content in cells reached highest values of 73.901 mg/g and 74.579 mg/g dry weight when 50 μ M MeJA and 3 g/L YE were treated to the cells after 9 and 0 days of culture, respectively (Table 3, Figure 2). Generally, elicitors stimulated the biosynthesis of gypenosides in different elicitation times.

3. Discussion

Elicitation is one of the strategies employed in plant cell culture to improve the productivity of bioactive compounds [21]. Various parameters, such as the elicitor types (biotic or abiotic, exogenous or endogenous elicitor, etc.), elicitor concentrations, and duration of elicitor exposure, are important factors to induce the optimum level of bioactive compounds [22,23]. Studies, related to elicitors, on the synthesis of secondary metabolite in medicinal plants have been conducted, in order to increase the economic value of these species [12]. According to Al-Khayri et al. (2020), who used 50–200 mg/L elicitors, such as pectin, YE, SA, cadmium chloride (CdCl_2), and silver nitrate (AgNO_3), to increase the production of phenolic compounds from *Phoenix dactylifera* cells. The accumulation of optimum catechin (26.6 μ g/g dry weight), caffeic acid (31.4 μ g/g dry weight), and kaempferol (13.6 μ g/g dry weight) were found in the 50 mg/L SA-treated culture, when compared to the control [15]. MeJA and SA (100 μ M), alone and in combination, were used to enhance the sanguinarine and chelerythrine biosynthesis from seedlings of *Macleaya cordata*. The study of Huang et al. (2021) showed that MeJA alone was the best treatment for sanguinarine and chelerythrine production in *Macleaya cordata* [8]. Recently, the influence of elicitors on the biosynthesis and accumulation of saponin in medicinal plant cells were reported. Vijendra et al. (2020) conducted a study on the influence of MeJA and SA (50–200 μ M) on enhanced ursolic acid and oleanolic acid production in *Leucas aspera* Spreng suspension cells. MeJA exhibited a maximum level of total saponin content (18.2 mg/g dry weight) at 100 μ M concentration over a period of 18 days, which is four-fold higher than the respective non-elicited control [24]. In the previous reports, we found that *G. pentaphyllum* suspension cells reached maximal accumulated gypenosides after 18 days of culture [19]. Thus, cells were harvested at day 18, in order to evaluate the effects of elicitors on gypenosides biosynthesis from in vitro cultures. Ginsenoside Rb1 was also present in both callus and suspension cells [19,20,25]; so, Rb1 was used as standard for gypenosides and Rb1 quantification.

In the present study, an inverse relationship was observed between gypenosides production and biomass accumulation after elicitor treatments. The data in Tables 1 and 2 showed the elicitation at the beginning of culture inhibits *G. pentaphyllum* cells growth at high concentration. The dry weights of cell biomasses were only 32–62% (25–200 μ M MeJA treatment), 14–86% (50–200 μ M SA treatment), 70–87% (2–5 g/L YE treatment), and 73–93% (1–5 g/L Fox treatment), compared to non-elicited cells after 18 days of culture (Figure 1). In contrast, a low concentration of elicitors increased cell growth, up to 107% (25 μ M SA) and 113% (1 g/L YE). In the suitable elicitor concentration (50 μ M MeJA, 100 μ M SA and 3 g/L YE) treatments, the gypenosides contents increased from 1.15-fold (MeJA treatment) to 1.52-fold (SA treatment). Meanwhile, *Fusarium* biomass inhibited the gypenosides level in all concentration treatments, indicating that *Fusarium* biomass is not suitable for enhancing gypenosides accumulation (Tables 1 and 2). Typically, adding elicitors into in vitro cultures, temporarily or permanently, improves the cells growth, activating the defense response by switching primary metabolism to secondary metabolite production [25]. Meanwhile, a higher concentration of elicitors induces a hypersensitive response, leading to cell death. Thus, elicitors concentration need to be investigated for optimal induction processing [15].

Elicitor treatments have been reported for improving the generation of reactive oxygen species (ROS), which has been demonstrated to act in signaling molecules to modulate specific protein activities, gene expression, and metabolic fluxes [26]. According to Liang et al. (2019), the gypenosides biosynthetic pathway can be divided into three parts: the initial steps consist of: the synthesis of IPP (isopentenyl diphosphate) or DMAPP (dimethylallyl pyrophosphate); the skeletal formation steps include: the cyclization of

2,3-oxidosqualene; and the modification steps involve: hydroxylation and glycosylation of the skeletons. The following, involved in the gypenoside biosynthetic pathway, are induced by MeJA in *G. pentaphyllum*: 3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase (HMRG), farnesyl pyrophosphate synthase (FPS), squalene epoxidase (SE), and squalene synthase (SS) [3]. Study of Zhang et al. (2021) demonstrated that seven cytochrome P450s (CYP71B19, CYP77A3, CYP86A7, CYP86A8, CYP89A2, CYP90A1, and CYP94A1) and five UDP-glucuronosyltransferases (UGT73B4, UGT76B1, UGT74F2, UGT91C1, and UGT91A1) contributed to gypenoside biosynthesis and the distribution in *G. pentaphyllum* [27]. Enhancing the expression of CYP and UGT genes may also increase the production of gypenoside in elucidated *G. pentaphyllum* suspension cells.

The results of this study are in agreements with other previous reports, whereas 50–100 μM of abiotic elicitors or 2–3 g of YE are optimum for medicinal compounds production. The accumulation of secondary compounds in suspension cells was 1.5- and 2.0-folds higher than that of the control. The highest rosmarinic acid (12% of dry weight) in *Mentha $\times$ piperita* cells was found after the addition of 100 μM MeJA, nearly 1.5 times, when compared to the non-elicited cells [28]. Cai et al. (2014) reported that chitosan or YE increased the production of phenolic acids by 1.5- and 2.0-fold, compared to that of control, after 3 day of culture, respectively [29]. Meanwhile, Loc et al. (2017) found that the highest madecassoside content (114 mg/g dry weight) was obtained when 100 μM SA added after 10 days of culture [16].

The present results also indicated that the most suitable elicitor treatment time for *G. pentaphyllum* cells was 6 days after inoculation. Supplementation of 100 μM SA to medium culture increased the gypenosides accumulation, up to 79.721 mg/g dry weight (0.093 mg Rb1/mg dry weight), which is 1.58-folds higher than that of the untreated cells. For MeJA, 50 μM improved gypenosides up to 73.901 mg/g dry weight at the day of 9, resulting in 1.46-folds higher than that of control (Table 3). In contrast, the optimal gypenosides content was found when YE was added at concentration of 3 g/L on the beginning of culture.

Suitable elicitor exposure time are different, depending on the plant species. Krzyzanowska et al. (2012) used 100 μM MeJA to improve the production of rosmarinic acid in the suspension cells of *Mentha $\times$ piperita*. The rosmarinic acid content reached a maximum value of 117.95 mg/g dry weight within 24 h [28]. Meanwhile, study by Nhan and Loc (2018) showed that eurycomanone accumulation in *Eurycoma longifolia* cell cultures reached the highest value after 4 days treatment with 20 μM MeJA (eurycomanone content of 17.36 mg/g in treated cells and 1.70 mg/g dry weight in control cells) [12].

In our study, HPLC analysis showed different profiles of elucidated cells. For example, the peak with retention time of 3.862 or 4.146 min (Figure 2). Secondary metabolites have complex chemical composition and are produced in response to various forms of stress to perform different physiological tasks in plants [30]. The different stress in cell culture system may lead to the different accumulation of gypenosides in *G. pentaphyllum*.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Suspension Cultivation

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino callus were provided by Laboratory of Gene Technology, Institute of Biotechnology, Hue University, Vietnam. Callus cultivation was described previously [31].

Cells suspension culture was conducted via the transfer of 3 g of 30-day-old callus into a 250-mL Erlenmeyer flask, containing 50 mL of liquid medium culture. The medium consisted of basic MS components [32], supplemented with 3% sucrose, 2.0 mg/L KIN, and 0.5 mg/L IBA. Culture flasks were then incubated at 25 ± 2 °C, with a shaking speed of 120 rpm and light intensity of 500 lux, with a photoperiod of 10-h daylight [19,31].

4.2. Elicitation

Elicitation effects of biotic (YE and Fox) and abiotic (MeJA and SA) elicitors were evaluated by adding their different concentrations to the liquid medium at the beginning of culture [12]. Elicitors were prepared depending on their characteristics. MeJA (392707-5ML, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and SA (30422-05, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) were dissolved in water, sterilized using 0.22 µm filters (Millipore, Darmstadt, Germany), and added to medium after autoclave. *F. oxysporum* HUIB02 was used for Fox elicitation [33]. YE (64343, Biorad, Hercules, CA, USA) and Fox were added directly to the medium before autoclave.

The cell biomass was harvested after 18 days of culture, in order to determine the fresh, dry weights and gypenosides content. Fresh cells biomass was filtered, washed, and weighed with a technical balance. The fresh biomass was dried at 50 °C, until a constant weight [19]. Non-elicited cells were used as control.

Optimal concentration of elicitors (100 µM SA, 50 µM MeJA, or 3 g/L YE) were selected to investigate elicitation time. Elicitors were added to the medium at the day of 3–15 after cell culture (3-day intervals). The addition of elicitors at the beginning of cell culture was used as the control in this experiment. The cells were also harvested after 18 days of culture to evaluate the growth and gypenosides accumulation.

4.3. Gypenosides Quantification

Gypenosides extraction: Dried suspension cells of *G. pentaphyllum* (0.5 g) were grinded and extracted with 5 mL of 80% methanol, assisted with ultrasonication for 30 mins, repeated three times, and evaporated at room temperature. Gypenosides residue was kept at 4 °C for further experiments [34].

Total gypenosides quantification: Total gypenosides concentration were estimated by colorimetric methods [35,36]. Ten milligrams of gypenoside residues were dissolved in 5 mL of 80% methanol. Fifty microliters of solution were transferred to another test tube, and 0.25 mL of vanillin reagent (8% w/v) was added. The reaction solution was placed on ice, and 2.5 mL of 72% (v/v) sulfuric acid was added, mixed, and left for 3 min. The test tube was warmed to 60 °C for 10 min and then cooled in ice. Absorbance was measured at 544 nm using UV-Vis scanning spectrophotometer (Spectro UV-2650, Labomed, Los Angeles, CA, USA.). Gypenoside contents were calculated based on the ginsenoside Rb1 (Y0001347, CRS) standard curves [31].

Rb1 quantification: The gypenosides extractions were re-suspended in methanol, to a final concentration of approximately 5 mg/mL, and filtered (0.22 µm, Sarorius, Göttingen, Germany). Rb1 was detected by HPLC, with Alliance E2695 system, with Symmetry®C18 column (WAT045905, Waters, UK; column parameters: inner diameter 4.6 mm, length 250 mm, particle size 5 mm, pore size 100 Å, high purity base-deactivated silica). The mobile phase consisted of acetonitrile (34%) and distiller water (66%).

The HPLC procedure was conducted for 20 min (with a flow rate at 0.8 mL/min), injected volume of 20 µL, and with a column temperature of 30 °C. The signal was measured via a PDA2998 detector, at a wavelength of 203 nm [37]. Rb1 content was calculated based on the Rb1 peak area of HPLC chromatogram, compared with the standard Rb1 ($y = 0.0000192x$, $R^2 = 0.998$, x was peak area, and y was Rb1 content (10–100 µg/mL)).

4.4. Statistical Analysis

All experiments of the cell culture and gypenosides quantification were repeated three times, with five Erlenmeyer flasks per experiment. The means were compared using ANOVA (a one-way analysis of variance), followed by Duncan's test ($p < 0.05$).

5. Conclusions

Gypenosides production, by *G. pentaphyllum* suspension cells, was improved with the supplementation of elicitors. Among of evaluated elicitors, salicylic acid was the most supportive for gypenosides accumulation, at a concentration of 100 µM. Gypenosides

content reached a maximum value of 79.721 mg/g dry biomass, which was 1.58-, 1.43-, and 2.18-folds higher than that of untreated cells and the leaves and stems of the natural product, respectively. HPLC analysis indicated a peak, corresponding to Rb1 and other metabolite compounds. Interestingly, SA did not inhibit cells growth, promising a potential candidate for high gypenoside production in industry scale-up production.

Author Contributions: Conceptualization, H.T.Q.; methodology, P.T.D.T., T.T.N.T., D.N.S. and Q.T.T.T.; formal analysis, H.T.Q. and T.Q.D.; investigation, H.T.Q.; data curation, T.Q.D.; writing—original draft preparation, H.T.Q.; writing—review and editing, N.D.H.; project administration, H.T.Q. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Vietnam Ministry of Education and Training, under grant number B2019-DHH-562-09.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the suspension cells and compounds are available from the authors.

References

1. Cui, W.Y.; Jin, Y.; Liu, H.; Zu, M.L.; Zhai, X.F.; Yang, C.; Gu, Y.L.; Cheng, Y.; Piao, X.L. Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities. *Nat. Prod. Res.* **2021**, *35*, 4433–4441. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Chen, P.Y.; Chang, C.C.; Huang, H.C.; Zhang, L.J.; Liaw, C.C.; Lin, Y.C.; Nguyen, N.L.; Vo, T.H.; Cheng, Y.Y.; Morris-Natschke, S.L.; et al. New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. *Molecules* **2019**, *24*, 1375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Liang, T.; Zou, L.; Sun, S.; Kuang, X.; Wei, J.; Wang, L.; Li, Y.; Sun, C. Hybrid sequencing of the *Gynostemma pentaphyllum* transcriptome provides new insights into gypenoside biosynthesis. *BMC Genom.* **2019**, *20*, 632. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Chen, W.; Balan, P.; Popovich, D.G. Chapter 6—Comparison of the ginsenoside composition of Asian ginseng (*Panax ginseng*) and American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) and their transformation pathways. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Atta Ur, R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 161–195.
5. Ahmed, T.; Raza, S.H.; Maryam, A.; Setzer, W.N.; Braid, N.; Nabavi, S.F.; de Oliveira, M.R.; Nabavi, S.M. Ginsenoside Rb1 as a neuroprotective agent: A review. *Brain Res. Bull.* **2016**, *125*, 30–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Zhou, P.; Xie, W.; Sun, Y.; Dai, Z.; Li, G.; Sun, G.; Sun, X. Ginsenoside Rb1 and mitochondria: A short review of the literature. *Mol. Cell. Probes* **2019**, *43*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
7. Shi, Y.H.; Li, Y.; Wang, Y.; Xu, Z.; Fu, H.; Zheng, G.Q. Ginsenoside-Rb1 for ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis of preclinical evidence and possible mechanisms. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 285. [\[CrossRef\]](#)
8. Huang, P.; Xia, L.; Zhou, L.; Liu, W.; Wang, P.; Qing, Z.; Zeng, J. Influence of different elicitors on BIA production in *Macleaya cordata*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 619. [\[CrossRef\]](#)
9. Luthra, R.; Roy, A.; Pandit, S.; Prasad, R. Biotechnological methods for the production of ginsenosides. *S. Afr. J. Bot.* **2021**, *141*, 25–36. [\[CrossRef\]](#)
10. Davey, M. Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd ed.; Thomas, B., Murray, B.G., Murphy, D.J., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2017; pp. 462–467.
11. Farag, M.A.; Al-Mahdy, D.A.; Meyer, A.; Westphal, H.; Wessjohann, L.A. Metabolomics reveals biotic and abiotic elicitor effects on the soft coral *Sarcophyton ehrenbergi* terpenoid content. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 648. [\[CrossRef\]](#)
12. Nhan, N.H.; Loc, N.H. Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *J. Plant Biotechnol.* **2018**, *45*, 340–346. [\[CrossRef\]](#)
13. Loc, N.H.; Anh, N.H.T.; Khuyen, L.T.; An, T.N.T. Effects of yeast extract and methyl jasmonate on the enhancement of solasodine biosynthesis in cell cultures of *Solanum hainanense* Hance. *J. BioScience Biotechnol.* **2014**, *3*, 1–6.
14. Kochan, E.; Szymczyk, P.; Kuźma, L.; Lipert, A.; Szymańska, G. Yeast Extract Stimulates Ginsenoside Production in Hairy Root Cultures of American Ginseng Cultivated in Shake Flasks and Nutrient Sprinkle Bioreactors. *Molecules* **2017**, *22*, 880. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Al-Khayri, J.M.; Naik, P.M. Elicitor-Induced Production of Biomass and Pharmaceutical Phenolic Compounds in Cell Suspension Culture of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Molecules* **2020**, *25*, 4669. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Loc, N.H.; Giang, N.T.; Huy, N.D.; Lan, T.T.P. Accumulation of madecassoside—A major component of centelloside—In centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) cells elicited by salicylic acid. *Period. Biol.* **2017**, *119*, 81–85.
17. Azeez, H.; Ibrahim, K. Effect of Biotic Elicitors on Secondary Metabolite Production in Cell Suspensions of *Hypericum triquetrefolium* Turra. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj-Napoca Hort.* **2013**, *70*, 26–33.
18. Endah, R.; Beyene, G.; Kiggundu, A.; van den Berg, N.; Schlüter, U.; Kunert, K.; Chikwamba, R. Elicitor and *Fusarium*-induced expression of NPR1-like genes in banana. *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 1007–1014. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

19. Anh, T.T.N.; Thi, P.T.D.; Lan, T.T.; Dung, T.Q.; Vu, N.Q.H.; Phuong, T.T.B.; Quang, H.T. Affect of culture conditions on growth and accumulation of saponin Rb1 in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino suspension cells. *Proc. Vietnam. Natl. Conf. Biotechnol.* **2020**, 885–890. (In Vietnamese)
20. Quang, H.T.; Thi, P.T.D.; Lan, T.T.; Thuy, P.M.T.; Hoang, V.D.; Kim, P.T.A. Effects of culture medium on callus growth of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino—A valuable medicinal plant. *Hue Univ. J. Sci. Nat. Sci.* **2021**, 130, 127–137. (In Vietnamese)
21. Namdeo, A.G. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A review. *Pharmacogn. Rev.* **2007**, 1, 69–79.
22. Naik, P.M.; Al-Khayri, J.M. Abiotic and Biotic Elicitors—Role in Secondary Metabolites Production through In Vitro Culture of Medicinal Plants. In *Abiotic and Biotic Stress in Plants—Recent Advances and Future Perspectives*; Shanker, A.K., Shanker, C., Eds.; IntechOpen: London, UK, 2016.
23. Patel, Z.M.; Mahapatra, R.; Jampala, S.S.M. Chapter 11—Role of fungal elicitors in plant defense mechanism. In *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*; Sharma, V., Salwan, R., Al-Ani, L.K.T., Eds.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2020; pp. 143–158.
24. Vijendra, P.D.; Jayanna, S.G.; Kumar, V.; Sannabommaji, T.; Rajashekar, J.; Gajula, H. Product enhancement of triterpenoid saponins in cell suspension cultures of *Leucas aspera* Spreng. *Ind. Crops Prod.* **2020**, 156, 112857. [[CrossRef](#)]
25. Raghavendra, S.; Ramesh, C.K.; Kumar, V.; Moinuddin Khan, M.H. Elicitors and precursor induced effect on L-Dopa production in suspension cultures of *Mucuna pruriens* L. *Front. Life Sci.* **2011**, 5, 127–133. [[CrossRef](#)]
26. Sliwińska, A.; Sykłowska, K.; Kosmider, A.; Granica, S.; Miszczak, K.; Nowicka, G.; Kasztelan, A.; Podsadni, P.; Turlo, J. Stimulation of phenolic compounds production in the in vitro cultivated *Polyscias filicifolia* Bailey shoots and evaluation of the antioxidant and cytotoxic potential of plant extracts. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2018**, 87, 289–316. [[CrossRef](#)]
27. Zhang, Y.; Chen, Q.; Huang, Y.; Zhao, R.; Sun, J.; Yuan, X.; Xu, H.; Liu, H.; Wu, Y. 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* **2021**, 16, e0260027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Krzyzanowska, J.; Czubačka, A.; Pecio, L.; Przybys, M.; Doroszeńska, T.; Stochmal, A.; Oleszek, W. The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2012**, 108, 73–81. [[CrossRef](#)]
29. Cai, Z.; Kastell, A.; Smetanska, I. Chitosan or yeast extract enhance the accumulation of eight phenolic acids in cell suspension cultures of *Malus × domestica* Borkh. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2014**, 89, 93–99. [[CrossRef](#)]
30. Chandran, H.; Meena, M.; Barupal, T.; Sharma, K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* **2020**, 26, e00450. [[CrossRef](#)]
31. Tung, N.T.; Thi, P.T.D.; Sang, D.N.; Thao, D.T.; Quang, H.T. Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. *Res. J. Biotechnol.* **2022**, 17, 61–68.
32. Murashige, T.; Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1962**, 15, 473–497.
33. Huy, N.D.; Ha, D.T.T.; Khoo, K.S.; Lan, P.T.N.; Quang, H.T.; Loc, N.H.; Park, S.-M.; Veeramuthu, A.; Show, P.L. Synthetic dyes removal by *Fusarium oxysporum* HUIB02 and stimulation effect on laccase accumulation. *Environ. Technol. Innov.* **2020**, 19, 101027. [[CrossRef](#)]
34. Wu, Q.; Jang, M.; Piao, X.L. Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 78, 311–316. [[CrossRef](#)]
35. 35 Goel, N.G.; Sirohi, S.K.; Dwivedi, J. Estimation of total saponins and evaluate their effect on in vitro methanogenesis and rumen fermentation pattern in wheat straw based diet. *J. Adv. Vet. Res.* **2012**, 2, 120–126.
36. Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med.* **1976**, 29, 116–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Liu, F.; Ren, D.; Guo, D.A.; Pan, Y.; Zhang, H.; Hu, P. Method Development for Gypenosides Fingerprint by High Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection and the Addition of Internal Standard. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, 56, 389–393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Gypenosides Production and Spermatogenesis Recovery Potentials of Extracts from Cell Suspension Cultures of *Gynostemma pentaphyllum*

Tung Nguyen-Thanh ^{1,2}, Sang Dang-Ngoc ^{3,4}, Dung Tran-Quoc ⁵ and Quang Hoang-Tan ^{3*}

1. Faculty of Basic Science, University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue 49000, Vietnam

2. Institute of Biomedicine, University of Medicine and Pharmacy, Hue University, Hue 49000, Vietnam

3. Institute of Biotechnology, Hue University, Hue 49000, Vietnam

4. Vo Nguyen Giap Gifted High School, Quang Binh 47000, Vietnam

5. University of Education, Hue University, Hue 49000, Vietnam

Abstract

Background: *Gynostemma pentaphyllum* (GP), also called Giao-co-lam, is a traditional Vietnamese herb, also known as the "Herb of Immortality", that grows throughout Asian countries and is used for the treatment of hematuria, edema in the pharynx and neck, tumors, and trauma.

Methods: In this study, we investigated the effects of culture conditions on cell growth and total gypenoside accumulation in the GP suspension cells. Cells were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA, and different inoculum sizes (2-4 g) for 10-24 days.

Results: The results showed that the optimum inoculum size and shaking speed were 3 g of callus and 120 rpm, respectively. The highest cell biomass reached was 5.833 g of fresh weight, corresponding to 0.136 g of dry weight after 20 days of culture. The total gypenoside and Rb1 accumulation was the highest after 18 days of culture, with 46.498 mg/g and 0.038 mg/g dry weight, respectively. In addition, the crude extract from GP cell suspension cultures remarkably improved pathological changes in mouse testicular tissue after scrotal heat exposure. Blood testosterone levels were significantly increased in heat-exposed mice treated with the GP cell suspension culture extract.

Conclusion: Taken together, these results suggest that GP bio-mass production by cell suspension cultures leads to the accumulation of gypenosides in large amounts, and provides the potential for the recovery of spermatogenesis following heat stress.

Keywords: Giao-co-lam, *Gynostemma pentaphyllum*, Gypenoside, Heat stress, Saponin Rb1, Spermatogenesis, Suspension cells

To cite this article: Nguyen-Thanh T, Dang-Ngoc S, Tran-Quoc D, Hoang-Tan Q. Gypenosides Production and Spermatogenesis Recovery Potentials of Extracts from Cell Suspension Cultures of *Gynostemma pentaphyllum*. Avicenna J Med Biotech 2023;15(4):216-222.

* Corresponding author:
Quang Hoang-Tan, Ph.D.,
Institute of Biotechnology, Hue
University, Hue 49000, Vietnam
Tel: +84 983735509
E-mail:
htquang@hueuni.edu.vn
Received: 28 Mar 2023
Accepted: 3 Jul 2023

Introduction

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino (GP) belongs to the Gynostemma, Cucurbitaceae family, and is a perennial creeping herb ¹. GP is a medicinal plant with potential pharmacological activities such as antioxidant, antitumor, immunopotentiating, cholesterol-lowering, hypoglycemic, and antidiabetic effects ². More than 180 gypenosides, flavonoids, and polysaccharides have been isolated and characterized from GP ³. In Vietnam, GP has been used as a folk medicine to treat cough and chronic bronchitis and is distributed from plains to mountainous areas at altitudes of up to 2000 m ⁴.

Gypenosides, dammarane saponins isolated from GP, are the most important bioactive compounds that respond to their biological activities and clinical effects ^{4,5}. The chemical structure of gypenosides closely resembles that of the ginsenosides in *Panax ginseng* ². The eight saponins found in GP are similar to the protopanaxadiol-type in *Panax ginseng*, including ginsenosides Rb1 (Gypenoside III), Rc, Rb3, Rd (Gypenoside VIII), F2, Rg3, malonyl-Rb1, and malonyl-Rd ⁵.

Numerous bioactive compounds are produced in plants through the application of bioreactors to cultivate plant cells and organs. Plant cell culture in a bio-

reactor has many advantages over classical tissue culture such as easy optimization of the real-time temperature, nutrients, oxygen concentration, and pH of the medium. On the other hand, the cost and time consumed are reduced, the quality of products is enhanced without pesticide contamination, and production is independent of cultivation season or geographical constraints⁶. However, there is limited information on gypenoside production in GP cell culture². However, *in vitro* gypenoside production has been reported, such as in hairy root cultures² or calli⁷. Gypenoside production in cell suspension cultures has not been well studied.

GP extract has been reported to affect cell and animal models of several diseases such as chronic liver disease⁸, dermal cell aging⁹, obesity¹⁰, and cancer¹¹. GP has been proposed to correlate with multiple signaling pathways, including apoptosis, cell cycle arrest, inhibition of glycolysis, immunomodulatory activity, and antioxidant activity by upregulating SIRT1 and regulating the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway^{10,12}. Furthermore, several clinical studies have shown that the GP extract could have potent curative effects on cancer¹¹, chronic stressful conditions¹³, treating obese individuals¹⁴, and improving body composition in overweight males and females¹⁵.

This study aimed to establish a suspension cell culture system of *Gynostemma pentaphyllum* for gypenoside production, analyze the gypenosides accumulated in the cells, and investigate the effect of suspension cell biomass extract on spermatogenesis in mice.

Materials and Methods

Cell suspension culture

GP calli were provided by the Laboratory of Gene Technology, Institute of Biotechnology, Hue University, Vietnam¹⁶. Cell suspension culture was conducted by transferring 2 g of 30-day-old calli into a 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of Murashige and Skoog (MS) liquid medium supplemented with 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA. The culture flasks were then incubated at 25±2°C, shaking at 120 rpm¹⁷. Suspension cells were harvested every two days, starting from day 10 to day 24. The fresh cell biomass was filtered, washed with distilled water, and weighed. Dry weight was determined by drying the fresh biomass at 50°C until a constant weight was achieved. Cell growth and gypenoside accumulation during the culture period were estimated.

To investigate the effects of inoculum size on gypenoside accumulation, culture systems with different inoculum sizes (2-4 g of calli per flask) were used. Suspensions of cells were collected on the day with the highest total gypenoside concentration, as previously determined.

Quantification of gypenosides accumulation

Dried suspension cells of GP (0.5 g) were extracted

with 5 ml of 80% methanol, ultrasonicated for 30 min, repeated three times, and evaporated at room temperature. The residues were resuspended in methanol and filtered through a 0.22 µm membrane. The gypenoside solution was maintained at 4°C for further experiments¹⁸.

Total gypenosides quantification

The total gypenoside concentration was estimated using colorimetric methods^{19,20}. Ten mg of gypenosides residue were dissolved in 5 ml of 80% methanol. Fifty µl of the solution was transferred to another test tube and 0.25 ml of vanillin reagent (8% w/v) was added. The reaction solution was placed on ice and 2.5 ml of 72% (v/v) sulfuric acid was added, mixed, and left for 3 min. The test tubes were warmed to 60°C for 10 min and then cooled on ice. Absorbance was measured at 544 nm using a UV-Vis scanning spectrophotometer (Spectro UV-2650, Labomed, Inc.). The ginsenoside content was calculated based on ginsenoside Rb1 (Y0001347, CRS) standard curves.

Rb1 quantification

The residue was resuspended in methanol to a final concentration of approximately 5 mg/ml and filtered (0.22 µm). Rb1 content was determined by HPLC using an Alliance E2695 system with a C18 column (4.6 mm × 250 mm × 5 mm). The mobile phase consisted of water (66%) and acetonitrile (34%) for 20 min, a column temperature of 30°C, a flow rate of 0.8 ml/min, and an injected volume of 20 µl. The signal was measured using a PDA2998 detector at a wavelength of 203 nm²¹. The Rb1 content was calculated based on the peak area of the HPLC dendrogram compared to the standard Rb1.

Animal model for heat stress-induced spermatogenesis

The animal experimental protocol was reviewed and approved by the Hue University of Medicine and Pharmacy (certificate no. H2019/345). Adult male Swiss mice, aged 8-10 weeks old (20-23 g), were purchased from the Pasteur Institute of Nha Trang, Vietnam. Mice were kept in an animal facility at a controlled temperature (25±1°C) and photoperiod (12 hr light: 12 hr dark) with free access to food and water. The animals were randomly divided into four groups of 10 mice each: Control group (CON), 40°C Heat exposure group (H40), 40°C heat exposure and treatment with extraction of natural products from GP at 200 mg/kg group (H40+N), 40°C heat exposure and treatment with extraction of biomass products from GP cell suspension culture at 200 mg/kg group (H40+CS).

The heat-stress procedure was performed as described in a previous study. In brief, the lower half of the mouse's body, including the scrotum, was submerged in a temperature-controlled water bath at 40°C for 10 min, twice per day, at 10 min intervals, 6 days per week for 5 weeks. Control mice were treated in the same way but in a water bath maintained at 25°C. After the bath, the mice were dried and examined for any

injury or redness of the scrotal skin before being returned to their cages. Mice in the four groups were housed in different cages and had free access to water and food. All animals were cared for under identical environmental conditions. Mice were monitored for general health. After completing the heat exposure experiment for five weeks, all mice were sacrificed under anesthesia. Blood and testicular tissues were harvested for testosterone and histological morphometric analyses.

Tissue processing and hematoxylin-eosin staining

At the end of the surgical procedure, testicular specimens were individually immersed in 4% buffered formaldehyde, dehydrated with graded concentrations of ethyl alcohol, and embedded into paraffin blocks. Paraffin sections 5 μm thick were obtained and transferred onto gelatin-coated slides, deparaffinized with xylene, and then rehydrated through a descending series of ethanol and water. The slides were stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and observed under a light microscope for histopathological analysis.

Blood sampling and plasma testosterone assays

Blood samples were harvested from anesthetized mice by heart puncture using a syringe and collected in EDTA blood collection tubes. Serum was obtained after centrifugation at 2000 *rpm* at 4°C for 20 min. Plasma testosterone concentration was measured by electrochemiluminescence immunoassay using Elecsys Testosterone II (05200067190; Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis

All cell culture and gypenoside quantification experiments were repeated thrice. Means were compared using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Duncan's test ($p < 0.05$).

Results

Biomass production by suspension cell cultures

A preliminary investigation of the growth of GP suspension cells showed that the growth rate was low during 0-10 days of culture, in which fresh biomass increased from 2.000 to 2.280 g/flask (data not shown). Thus, cell biomass and gypenoside content were estimated only after 10 days of incubation. As shown in figure 1, the cell biomass increased continuously from 10 to 20 days of culture. The highest fresh biomass reached was 3.780 g/flask (0.087 g dry biomass). Cell biomass accumulation dramatically decreased, accumulating only 3.010 g and 0.059 g of fresh and dry weight, respectively, after 24 days of culture.

Kinetic gypenosides accumulation in cell suspension culture

The accumulation of Rb1 and gypenosides in suspension cells reached the highest value 2-4 days earlier than biomass accumulation (Table 1). The total gypenosides increased from day 10 to day 18, reaching a maximum of 42.122 mg/g dry weight, and then decreased after 20 days of cultivation. There were no

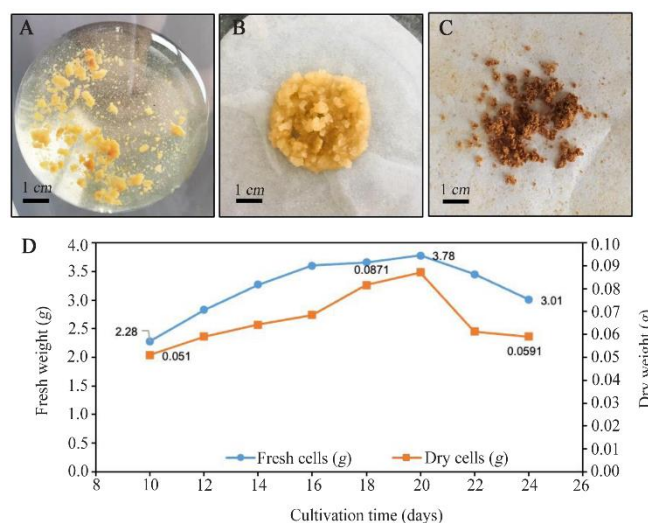


Figure 1. Cell growth kinetics and biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* using cell suspension culture.

A) *Gynostemma pentaphyllum* suspension cell culture, B) Fresh biomass accumulation, C) and dried biomass, D) Growth kinetics curves of fresh and dry weights of suspension cells in MS liquid medium supplemented with 2.0 mg/L KIN and 0.5 mg/l IBA on culturing days.

Table 1. Gypenosides accumulation in cell suspension culture

Cultivation time (days)	Rb1 (mg/g dry weight)	Total gypenosides (mg/g dry weight)
10	0.010 ^d	28.291 ^{cd}
12	0.011 ^d	30.343 ^c
14	0.012 ^d	36.210 ^b
16	0.022 ^c	41.321 ^a
18	0.049 ^a	42.122 ^a
20	0.050 ^a	34.100 ^c
22	0.041 ^a	25.510 ^d
24	0.024 ^c	24.081 ^d

Different letters (a, b, c, ...) in each column indicate significantly different means (Duncan's test, $p < 0.05$).

significant differences in gypenoside concentration between days 16 and 18. The biosynthesis of Rb1 was not relevant to gypenoside accumulation. Gypenoside content in cells increased from 10 to 18 days to a maximum of 42.122 mg/g dry weight. Meanwhile, Rb1 content was maintained in the cell until day 20, and then decreased sharply from days 22 to 24.

Optimization of culture conditions for gypenosides biosynthesis

Table 2 shows the data on the growth and gypenoside accumulation of 16-20-day suspension cell lines that differed in inoculum sizes (2-4 g callus). The results indicated that the fresh biomass reached the highest value on day 20 when the inoculum sizes were 2 and 3 g. Meanwhile, the biomass reached its highest value earlier with 4 g inoculum. Increasing the inoculum size to 3 g and 4 g also enhanced biomass accumu-

Table 2. Effects of inoculum sizes on cells growth and gypenosides accumulation

Inoculum size (g)	Cultivation time (days)	Fw (g/flack)	Dw (g/flack)	Rb1 (mg/g dry weight)	Gypenosides (mg/g dry weight)
2	16	3.602 ^c	0.069 ^c	0.022 ^c	41.320 ^b
	18	3.661 ^c	0.082 ^b	0.049 ^a	42.876 ^b
	20	3.781 ^c	0.087 ^b	0.050 ^a	34.103 ^c
3	16	4.660 ^b	0.122 ^a	0.019 ^c	32.291 ^c
	18	5.392 ^a	0.128 ^a	0.038 ^b	46.498 ^a
	20	5.833 ^a	0.136 ^a	0.029 ^{b,c}	43.439 ^b
4	16	5.189 ^a	0.129 ^a	0.020 ^c	33.169 ^c
	18	5.430 ^a	0.130 ^a	0.021 ^c	34.520 ^c
	20	4.570 ^b	0.112 ^a	0.019 ^c	31.981 ^c

Different letters (a, b, c, ...) in each column indicate significantly different means (Duncan's test, $p < 0.05$).

lation in comparison with an inoculum size of 2 g, reaching 5.833 g, 5.430 g, and 3.781 g, respectively. The data suggest that cell growth may require a certain initial density of cells, where lower or higher inoculum sizes inhibit the growth of the suspension cell culture. HPLC analysis of gypenoside showed the highest concentration of 46.498 mg/g dry weight after 18 days of culture with an inoculum size of 3 g. In contrast, the highest Rb1 concentration was observed in the culture system with 2 g of inoculum. The present study suggests that the inoculum size of the GP suspension cell culture may vary depending on the research purpose where gypenosides or Rb1 production is targeted.

Cell biomass of GP cell recovery of spermatogenesis after heat stress

Control mice without heat exposure and those who didn't receive GP extract showed histopathology of normal testicles with the complete process of spermatogenesis in which progenitor spermatogonia developed into mature spermatozoa in the seminiferous tubules (Figure 2A). Meanwhile, chronic heat exposure at 40°C for 5 weeks (H40 group) impaired the histological architecture of the testicular tissue, and spermatogenesis was completely arrested. The testicular histology of the heat-exposed group exhibited degenerated and disorganized features of spermatogenic epithelium and reduced spermatogenic cell numbers (Figure 2B). Heat-exposed mice receiving GP extract from natural plants (H40+N group) or cell suspension cultures (H40+CS group) showed histological recovery of testicular tissue compared to those in the heat-stress exposure group. Several round and elongated spermatids were found in the spermatogenic epithelium near the lumen. Spermatogenesis was ameliorated with the differentiation process that occurs in the seminiferous epithelium observed in the testis of heat-exposure mice receiving GP extract (Figures 2C and D).

Plasma testosterone assay was performed to assess spermatogenesis. Figure 2E shows that GP extract attenuated the heat stress-induced disruption of spermatogenesis. Control mice had higher levels of plasma

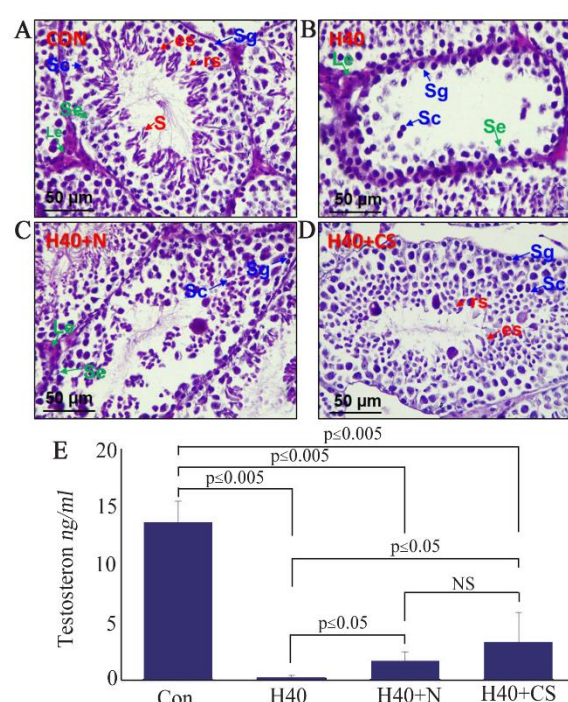


Figure 2. Attenuation of heat-stress-induced spermatogenesis complications by GP extract in mice. A) Normal spermatogenesis in the seminiferous tubules in the testes of the control group (CON). B) Spermatogenesis in seminiferous tubules disruption in heat stress-induced mice at 40°C (H40). C) Extraction of natural products from plant recovery spermatogenesis (H40+N). D) Extraction of biomass products from cell suspension culture recovered spermatogenesis (H40+CS). E) The extraction of natural products from plants and biomass products from cell suspension cultures recovers blood testosterone levels. Le: Leydig cells, Se: Sertoli cells, Sg: Spermatogonia, Sc: Spermatocytes, rs: round spermatids, es: elongating spermatids, S: Spermatozoa

testosterone than those exposed to heat. Chronic heat exposure at 40°C for five weeks significantly suppressed serum testosterone levels. Heat exposure may disrupt testosterone biosynthesis in mice. Interestingly, GP extract from natural plants and cell suspension culture significantly increased plasma testosterone levels

compared to those in mice that received only heat stress. There was no significant difference in testosterone levels in mice that received the GP extract from natural plants or cell suspension cultures.

Discussion

Plant cell suspension culture in a bioreactor, an incessant, sustainable, economical, and viable production of secondary metabolites, has been considered a powerful tool for the production of bioactive compounds from medicinal plants²². Numerous compounds in medicinal plants are produced through plant tissue culture, such as catechin from *Ajuga bracteosa*²³ and eurycomanone from *Eurycoma longi-folia*²⁴. Production of high-value active secondary metabolites at the industrial level, such as shikonin, berberine, and sanguinarine, has been achieved in cell cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, *Coptis japonica*, and *Papaver somniferum*, respectively²⁵.

Only a few studies have been conducted on the accumulation of bioactive metabolites in *in vitro* cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (*G. penta-phyllum*). For example, Chang *et al* established a hairy root culture system of *G. pentaphyllum* and found that the dry biomass of hairy roots grown in MS medium for 49 days was 7.3 g/L with a gypenoside content of 38 mg/g dry weight². Gypenoside is also produced from the callus culture of *G. pentaphyllum*^{7,16}. Gy-penoside production has not been well studied, except for the first results of our studies^{26,27}.

Our data confirmed that both gypenosides and Rb1 accumulated the most after 18 days of suspension cell culture. Thus, further gypenoside and Rb1 accumulation studies were conducted on suspension cells harvested after 18 days of culture. Moreover, gypenosides in a cell line are higher than those of callus and stem¹⁶, and similar to a hairy root in a previous report².

In particular, inoculum size had a positive effect on biomass and metabolite production up to an optimum concentration²⁸. In this study, the optimal inoculum size for biomass accumulation and gypenoside production was 3 g of callus per 50 ml culture medium (6% w/v), which is similar to that reported by Loc *et al* for the production of madecassoside in *Centella asiatica* (L.) suspension cell culture²⁹. Nhan *et al* also found that an inoculum size of 6% (w/v) is optimal for eurycomanone biosynthesis in long jack (*Eurycoma longi-folia*) suspension cells culture²⁴. In other reports, the optimal initial inoculum sizes for secondary metabolic compound production were lower, such as 2% for flavonoid production from *Ficus deltoidea* var. *kun-stleri* cell¹⁷, or 3.2% in anthocyanin production from *Vitis vinifera* cell³⁰.

Our histological examination and plasma testosterone analysis indicated that both GP extract from natural plants and cell suspension culture attenuated heat stress-induced damage to testicular tissue and sperma-

togenesis complications. For centuries, many herbs have been used by humans in folk medicine as therapeutics for male reproductive impairment, such as bioactive compounds (Curcumin, Ellagic Acid, Vitamin C, Vitamin E) and natural products with bioactive compounds (Garlic, Ginger, Grape, Green Tea)³¹. Heat stress can negatively affect male reproduction in mammals. Arun *et al* showed that *Phyllanthus emblica* leaf extract protects against testicular damage in rats with chronic stress by changing to functional proteins, especially testicular tyrosine-phosphorylated proteins³². Green tea extract (*Camellia sinensis*) has been reported to lead to better recovery of sperm motility and morphology after testicular heat shock in rats³³. Hou *et al* show that twenty-five herbs in the Duzhong Butiansu prescription improved heat stress-induced spermatogenic disorders by regulating sperm formation and the HSF/Hsp70 signaling pathway³⁴.

Conclusion

In conclusion, the highest gypenoside concentration in suspension cells obtained in the 50 ml MS liquid medium culture system contained 3 g of inoculum size and a shaking speed of 120 rpm. The total gypenosides and Rb1 accumulation reach their highest after 18 days of culture with 46.498 mg/g and 0.038 mg/g dry weight, respectively. This study provides evidence for the efficient use of GP suspension cells to accelerate the production of gypenosides and Rb1. GP cell suspension biomass extract attenuates heat stress-induced disruption of spermatogenesis in seminiferous tubules and plasma testosterone level.

Acknowledgement

This work was partially supported by Hue University under the Core Research Program Grant No. NCM. DHH2020.12. We thank the reviewer and approval by the Hue University of Medicine and pharmacy ethics committee.

Conflict of Interest

No conflict of interest.

References

1. Lee KH. Jiaogulan: China's "Immortality Herb". Journal of Natural Products 2000;63:431.
2. Chang CK, Chang KS, Lin YC, Liu SY, Chen CY. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: a promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. Biotechnol Lett 2005 Aug;27:1165-9.
3. Chen PY, Chang CC, Huang HC, Zhang LJ, Liaw CC, Lin YC, et al. New dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. Molecules 2019 Apr 8;24(7):1375.
4. Ky PT, Huong PT, My TK, Anh PT, Van Kiem P, Van Minh C, et al. Dammarane-type saponins from Gynos-

- temma pentaphyllum. *Phytochemistry* 2010 Jun 1;71(8-9):994-1001.
5. Razmovski-Naumovski V, Huang TH, Tran VH, Li GQ, Duke CC, Roufogalis BD. Chemistry and pharmacology of *Gynostemma pentaphyllum*. *Phytochemistry Review* 2005 Jul;4:197-219.
6. Wang J, Gao WY, Zhang J, Zuo BM, Zhang LM, Huang LQ. Production of ginsenoside and polysaccharide by two-stage cultivation of *Panax quinquefolium* L. cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2012 Feb;48:107-12.
7. Zhonghua A, Zhangzheng Q. Effect of some stress factors on gypenoside accumulation in callus of *Gynostemma pentaphyllum*. *Chin J Appl Environ Biol* 1998; 4:10-14.
8. Hong M, Cai Z, Song L, Liu Y, Wang Q, Feng X. *Gynostemma pentaphyllum* attenuates the progression of nonalcoholic fatty liver disease in mice: a biomedical investigation integrated with in silico assay. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018 Mar 21;2018.
9. Lobo SN, Qi YQ, Liu QZ. The effect of *Gynostemma pentaphyllum* extract on mouse dermal fibroblasts. *ISRN Dermatol* 2014;2014.
10. Lee HS, Lim SM, Jung JI, Kim SM, Lee JK, Kim YH, et al. *Gynostemma pentaphyllum* extract ameliorates high-fat diet-induced obesity in C57BL/6N mice by upregulating SIRT1. *Nutrients* 2019 Oct 15;11(10):2475.
11. Li Y, Lin W, Huang J, Xie Y, Ma W. Anti-cancer effects of *Gynostemma pentaphyllum* (thunb.) makino (jiaogulan). *Chin Med* 2016 Dec;11(1):43.
12. Zhang Y, Shi G, Luo Z, Wang J, Wu S, Zhang X, Zhao Y. Activity components from *Gynostemma pentaphyllum* for preventing hepatic fibrosis and of its molecular targets by network pharmacology approach. *Molecules* 2021 May 18;26(10):3006.
13. Choi EK, Won YH, Kim SY, Noh SO, Park SH, Jung SJ, Lee CK, Hwang BY, Lee MK, Ha KC, Baek HI. Supplementation with extract of *Gynostemma pentaphyllum* leaves reduces anxiety in healthy subjects with chronic psychological stress: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytomedicine*. 2019 Jan 1;52:198-205.
14. Park SH, Huh TL, Kim SY, Oh MR, Tirupathi Pichiah PB, Chae SW, et al. Antiobesity effect of *Gynostemma pentaphyllum* extract (actiponin): a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Obesity* 2014 Jan;22(1): 63-71.
15. Rao A, Clayton P, Briskey D. The effect of an orally-dosed *Gynostemma pentaphyllum* extract (Activ-AMP®) on body composition in overweight, adult men and women: A double-blind, randomised, placebo-controlled study. *J Hum Nutr Diet* 2022 Jun;35(3):583-9.
16. Quang HT, Thi PTD, Lan TT, Thuy PMT, Hoang VD, Kim PTA. [Effects of culture medium on callus growth of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino – a valuable medicinal plant]. *Hue University Journal of Science: Natural Science* 2021;130:127-37. Vietnamese.
17. Haida Z, Syahida A, Ariff SM, Maziah M, Hakiman M. Factors affecting cell biomass and flavonoid production of *Ficus deltoidea* var. *kunstleri* in cell suspension culture system. *Sci Rep*. 2019 Jul 2;9(1):9533.
18. Wu Q, Jang M, Piao XL. Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2014 Feb 1;78(2):311-6.
19. Goel N, Sirohi SK, Dwivedi J. 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* 2012 Apr 1;2(2):120-6.
20. Hiai S, Oura H, Nakajima T. Color reaction of some sapogenins and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Med* 1976 Mar;29(02):116-22.
21. Liu F, Ren D, Guo DA, Pan Y, Zhang H, Hu P. Method development for gypenosides fingerprint by high performance liquid chromatography with diode-array detection and the addition of internal standard. *Chem Pharm Bull* 2008 Mar 1;56(3):389-93.
22. Chandran H, Meena, Barupal T, Sharma K. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol Rep (Amst)* (Amsterdam, Netherlands) 2020, 26, e00450-e00450.
23. Ali H, Khan MA, Kayani WK, Dilshad E, Rani R, Khan RS. Production of biomass and medicinal metabolites through adventitious roots in *Ajuga bracteosa* under different spectral lights. *J Photochem Photobiol B* 2019 Apr 1;193:109-17.
24. Nhan NH, Loc NH. Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment. *Journal of Plant Biotechnology* 2018;45: 340-6.
25. Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2002 May 1;20(2):101-53.
26. Anh TT, Thi PT, Lan TT, Dung TQ, Vu NQ, Phuong TT, Quang HT. Affect of culture conditions on growth and accumulation of saponin Rb1 in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino suspension cells. *InProc. Vietnam. Natl. Conf. Biotechnol* 2020 (pp. 885-890).
27. Thanh TN, Thi DT, Ngoc SD, Do Thi T, Tan QH. Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. *Research Journal of Biotechnology* Vol. 2022 Mar;17:3.
28. Gorret N, bin Rosli SK, Oppenheim SF, Willis LB, Lessard PA, Rha C, et al. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *J Biotechnol* 2004 Mar 18;108(3):253-63.
29. Loc NH, Giang NT, Huy ND, Lan TT. Accumulation of madecassoside-a major component of centelloside-in centella (*Centella asiatica* (L.) Urban) cells elicited by salicylic acid. *Periodicum Biologorum* 2017 Apr 24;119 (1).
30. Jun-Ge QU, Zhang W, Quan-Li HU, Mei-Fang JI. [Impact of subculture cycles and inoculum sizes on

- suspension cultures of *Vitis vinifera*]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 2006 Nov;22(6):984-9. Chinese.
31. Martins RV, Silva AM, Duarte AP, Socorro S, Correia S, Maia CJ. Natural products as protective agents for male fertility. BioChem 2021 Sep 28;1(3):122-47.
 32. Arun S, Burawat J, Yannasithinon S, Sukhorum W, Lim-pongsa A, Iamsaard S. Phyllanthus emblica leaf extract ameliorates testicular damage in rats with chronic stress. J Zhejiang Univ Sci B 2018 Dec;19(12):948.
 33. Vieira JI, Silva TA, Barbosa WM, Azevêdo GL, Arruda LC, Guerra MM, et al. Effect of green tea extract (*Camellia sinensis*) on the spermatogenic parameters of Wistar rats submitted or not to testicular heat shock. Anim Reprod 2020 Jun 5;17(2):e20190049.
 34. Hou Y, Yuan P, Fu Y, Zhang Q, Wei Y, Gao L, et al. Duzhong butiansu prescription improves heat stress-induced spermatogenic dysfunction by regulating sperm formation and heat stress pathway. Evid Based Complement Alternat Med 2020 Feb 27;2020:6723204.



NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT SINH KHỐI VÀ GYPENOSIDE TỪ NUÔI CẤY TẾ BÀO CÂY GIẢO CỔ LAM (*Gynostemma pentaphyllum*)

Đặng Ngọc Sáng^{1,2}, Phạm Thị Diễm Thi¹, Trần Thị Thoa¹,
Trần Quốc Dung³, Hoàng Tấn Quảng^{1*}

¹ Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Nguyễn Đình Tú, Huế, Việt Nam

² Trường THPT Chuyên Võ Nguyên Giáp, Trần Quang Khải, Đồng Hới, Quảng Bình, Việt Nam

³ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

* Tác giả liên hệ: Hoàng Tấn Quảng <htquang@hueuni.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 9-01-2025; Ngày chấp nhận đăng: 20-2-2025)

Tóm tắt. Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) được sử dụng như một loại dược liệu hay làm trà uống với tác dụng giảm mỡ máu. Giảo cổ lam còn có nhiều tác dụng có lợi như hạ đường huyết, chống ung thư, bảo vệ tim mạch, gan và thần kinh, chống tiểu đường và viêm. Thành phần có hoạt tính sinh học chính là flavonoid và saponin. Trong nghiên cứu này, xác định môi trường nuôi cấy phù hợp và thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor tế bào huyền phù để sản xuất sinh khối và gypenoside đã được thực hiện. Khi nuôi cấy trong bình tam giác, môi trường nuôi cấy tế bào giảo cổ lam tốt nhất là MS cơ bản bổ sung 2 mg/L KIN kết hợp 0,5 mg/L IBA, sucrose 3% với sinh khối tươi đạt 3,693 g/50 mL môi trường, hàm lượng gypenoside đạt 40,240 mg/g và Rb1 đạt 0,041 mg/g khô sau 18 ngày nuôi cấy. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor chứa 6 L môi trường cho thấy sinh khối tế bào đạt cao nhất sau 18 ngày, với 45,611 g tươi. Trong khi đó, hàm lượng gypenoside và Rb1 đạt cao nhất vào ngày thứ 16, với giá trị tương ứng là 40,090 mg/g và 0,038 mg/g khô. Kết quả nghiên cứu cho thấy có thể nuôi tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam để sản xuất sinh khối, cung cấp nguyên liệu cho quá trình sản xuất gypenoside.

Từ khóa: bioreactor, giảo cổ lam *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, tế bào huyền phù

Study on biomass and gypenoside production of *Gynostemma pentaphyllum* via suspension cell culture

Dang Ngoc Sang^{1,2}, Pham Thi Diem Thi¹, Tran Thi Thoa¹,
Tran Quoc Dung³, Hoang Tan Quang^{1*}

¹ Institute of Biotechnology, Hue University, Nguyen Dinh Tu St., Hue, Vietnam

² Vo Nguyen Giap Gifted High School, Tran Quang Khai St., Dong Hoi, Quang Binh, Vietnam

³ University of Education, Hue University, 34 Le Loi St., Hue, Vietnam

* Correspondence to Hoang Tan Quang <htquang@hueuni.edu.vn>

(Submitted: January 9, 2025; Accepted: February 20, 2025)

Abstract. *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino can be used for both medicinal and tea and has lipid-lowering properties. It has many beneficial effects such as hypolipidemic, anti-cancer, cardioprotective, hepatoprotective, neuroprotective, anti-diabetic and anti-inflammatory. Its main bioactive components are flavonoids and saponins. In this study, determining a suitable culture medium and testing the bioreactor culture of suspension cells for biomass and gypenoside production were performed. In Erlenmeyer flasks cultivation, the suitable culture medium is basic MS supplemented with 2 mg/L KIN combined with 0.5 mg/L IBA, 3% sucrose with fresh biomass value of 3.693 g/50 mL medium, gypenoside and Rb1 content reached 40.240 mg/g and 0.041 mg/g dry weight after 18 days of culture, respectively. Preliminary cultivation in bioreactor containing 6 L of medium showed that fresh cell biomass reached the highest after 18 days, reaching 45,611 g. Meanwhile, gypenoside and Rb1 content reached the highest on day 16, with values of 40.090 mg/g and 0.038 mg/g dry weight, respectively. The results show that it is possible to grow suspension cell of jiaogulan in bioreactor to produce biomass, providing raw materials for the gypenoside production process.

Keywords: bioreactor, jiaogulan, *Gynostemma pentaphyllum*, gypenoside, suspension cell

1 Đặt vấn đề

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 [1]. Giảo cổ lam có tác dụng hạ đường huyết, chống oxy hóa, bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu, ... [2]. Thành phần hoạt tính sinh học chính là flavonoid và saponin, trong đó saponin dạng dammarane-triterpene được cho là thành phần có vai trò chính [2, 3]. 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 (*Panax ginseng*) [4].

Do có vai trò tương tự nhân sâm nhưng giá thành rẻ hơn, nên Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy triển vọng [5]. 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,

Giáo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d). Do đó, việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giáo cổ lam tự nhiên là cần thiết. Trong đó, 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 [6].

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, ... [7]. Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giáo cổ lam như Jala và cs. [8] hay Ao và cs. [9], tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào cây này chưa được các tác giả trên thực hiện. Trong thời gian qua, nhóm nghiên cứu của chúng tôi đã tạo và nuôi cấy thành công tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam, một số yếu tố điều kiện nuôi cấy cũng đã được xác định như tỷ lệ tiếp giống, tốc độ lắc, thời gian nuôi, ... Trong đó, các loại gypenoside, đặc biệt là Rb1, đã được chứng minh là xuất hiện trong tế bào huyền phù [10, 11]. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục trình bày các kết quả nghiên cứu xác định môi trường nuôi cấy tế bào và kết quả bước đầu về nuôi cấy tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam trong bioreactor.

2 Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Tế bào huyền phù cây Giáo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) hình thành từ cây *in vitro*, đây là cây có nguồn gốc tự nhiên tại xã Trà Nam, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam [12].

Phương pháp nghiên cứu

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng đến sinh trưởng và tích lũy gypenoside

Nuôi cấy tế bào huyền phù được thực hiện bằng cách cấy chuyển 2 g callus (30 ngày tuổi) vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng, tốc độ lắc là 120 vòng/phút trên máy lắc SM 30A (Edmund Buhler, Đức) [10] để đánh giá ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng và nguồn carbon đến khả năng sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù.

- Chất điều hòa sinh trưởng: phối hợp giữa 0,5 mg/L IBA (3-indolebutyric acid) và các cytokinin riêng lẻ là BAP (6-benzylaminopurine - BAP) hoặc KIN (Kinetin) ở các nồng độ 1,0–3,0 mg/L tương tự như trong thí nghiệm đối với callus [12].

- 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%.

Tất cả các thí nghiệm nuôi cấy được tiến hành tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Gen, Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, nhiệt độ phòng nuôi 25 ± 2 °C, chu kỳ chiếu sáng 12h/12h

sáng/tối, cường độ chiếu sáng 2.000 lux. Môi trường nuôi cấy là môi trường Murashige và Skoog, 1962 (MS) [13] cơ bản có chứa 3% đường sucrose, bổ sung các chất điều hòa sinh trưởng khác nhau tùy theo từng thí nghiệm, pH 5,8 và được hấp khử trùng ở 121 °C trong thời gian 15 phút.

Sinh khối tế bào được thu sau 18 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 [14].

Các tiêu chí được sử dụng để đánh giá khả năng sinh trưởng của tế bào huyền phù bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô, và hàm lượng gypenoside.

Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor

Để thử nghiệm khả năng sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào trong bioreactor, chúng tôi sử dụng hệ thống LiFlux GX (thể tích bình 14 lít, Hanil, Hàn Quốc) để tiến hành nuôi cấy; thể tích nuôi cấy 6 lít, tỷ lệ tiếp giống 10% (v/v) (tương đương với khoảng 6 g khối lượng tươi/L môi trường), tốc độ khuấy 150 vòng/phút, các thông số khác được cài đặt mặc định [15]. Môi trường sử dụng trong thử nghiệm là môi trường lỏng tốt nhất thu được trong thí nghiệm ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng. Điều kiện nhiệt độ, ánh sáng phòng nuôi tương tự thí nghiệm nuôi cấy tế bào trong bình tam giác.

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy, mẫu được thu sau mỗi hai ngày nuôi từ ngày thứ 10 (10 mL dịch huyền phù, mỗi lần lấy 3 mẫu) thông qua van thu mẫu trên bioreactor, các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm khối lượng tươi, khối lượng khô và hàm lượng gypenoside. Sinh khối và sự sinh trưởng của tế bào trong hệ lên men được quy đổi từ sinh khối tươi và sinh khối khô trong mỗi lần thu.

Xác định hàm lượng gypenoside

Tách chiết gypenoside: Sinh khối khô tế bào Giảo cổ lam (thu từ bình nuôi cấy hoặc hệ lên men) được sử dụng để tách chiết gypenoside theo tỉ lệ 0,5 g mẫu: 10 mL methanol 80% và siêu âm (S10H, Elmasonic) ở 40 °C trong thời gian 30 phút, lặp lại 3 lần. Dịch chiết thu được để bay hơi đến khô ở 50 °C. Cao chiết được cân và tái hòa tan trong methanol đến nồng độ 5 mg/mL, lọc qua màng lọc 0,22 µm sau đó bảo quản ở 4 °C để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo [16].

Xác định hàm lượng gypenoside: Hàm lượng gypenoside được xác định bằng phản ứng màu với vanillin. 50 µL dịch chiết gypenoside được chuyển vào ống nghiệm sau đó bổ sung 250 µL dung dịch vanillin 8% (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 (UV-2650, Labomed, Mỹ) ở bước sóng 544 nm. Chất chuẩn được sử dụng trong phân tích là ginsenoside Rb1 (Rb1) (Y0001347, CRS) [17].

Xác định hàm lượng Rb1: Rb1 được định lượng bằng phương pháp HPLC 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. Tín hiệu được thu nhận bằng đầu dò PDA2998 ở bước sóng 203 nm. Hàm lượng Rb1 được xác định dựa trên diện tích của peak có thời gian lưu trùng với peak chuẩn [17].

Xử lý thống kê

Các thí nghiệm 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.

3 Kết quả và thảo luận

Ảnh hưởng của chất điều hòa sinh trưởng lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào.

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. Sự lựa chọn các thành phần môi trường phù hợp đóng một vai trò quan trọng trong việc sản xuất hợp chất thứ cấp. Các thành phần dinh dưỡng đa lượng và vi lượng, vitamin, nguồn carbon, amino acid, các chất điều hòa sinh trưởng (cytokinin, auxin) đều ảnh hưởng lên quá trình sản xuất hợp chất thứ cấp [18]. Để thăm dò ảnh hưởng của các chất điều hòa sinh trưởng lên sinh trưởng và tích lũy saponin của tế bào, chúng tôi sử dụng 10 môi trường với các tổ hợp chất điều hòa sinh trưởng khác nhau, kết quả trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. 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

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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 chưa 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).

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 [12].

Ảnh hưởng của nguồn carbon lên sinh trưởng và tích lũy gypenoside của tế bào.

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 [19]. Ngoài ra, chúng cũng có thể là phân tử tín hiệu và đóng vai trò tương tự chất điều hoà sinh trưởng 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 [20]. 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... [21]. Do đó, việc khảo sát nguồn cung cấp carbon và nồng độ thích hợp là cần thiết.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các nguồn carbon được sử dụng là sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose, và glycerol ở nồng độ 3%. Kết quả trình bày ở Bảng 2 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.

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. 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 [22]. 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 *Morinda elliptica*. Trong nuôi cấy tế bào cây ngô fructose được

Bảng 2. 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

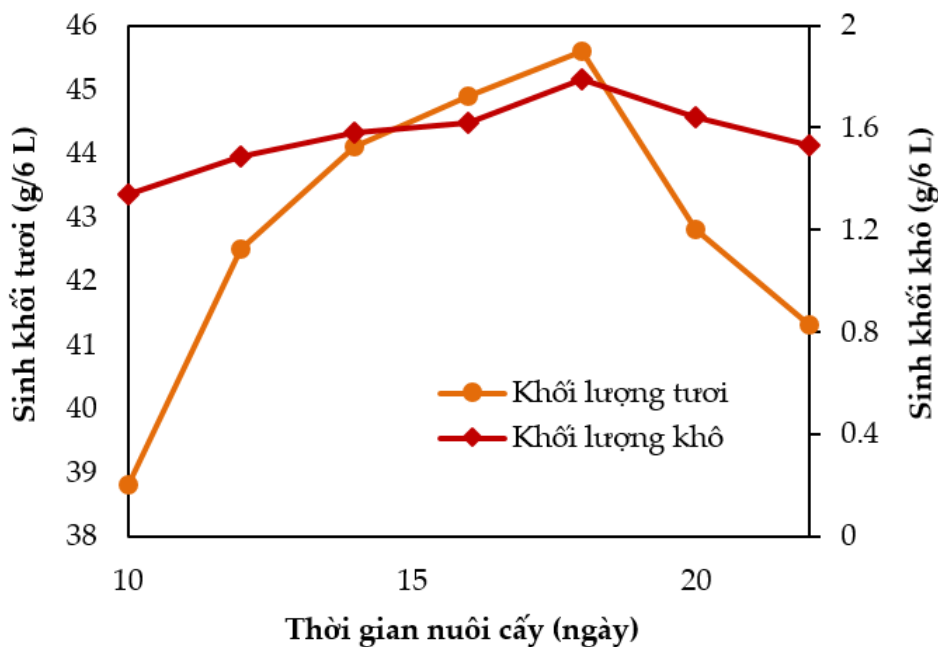
Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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 (*Solanum eleagnifolium*), *Ficus deltoide* và dây thần thông (*Tinospora cordifolia*) [23].

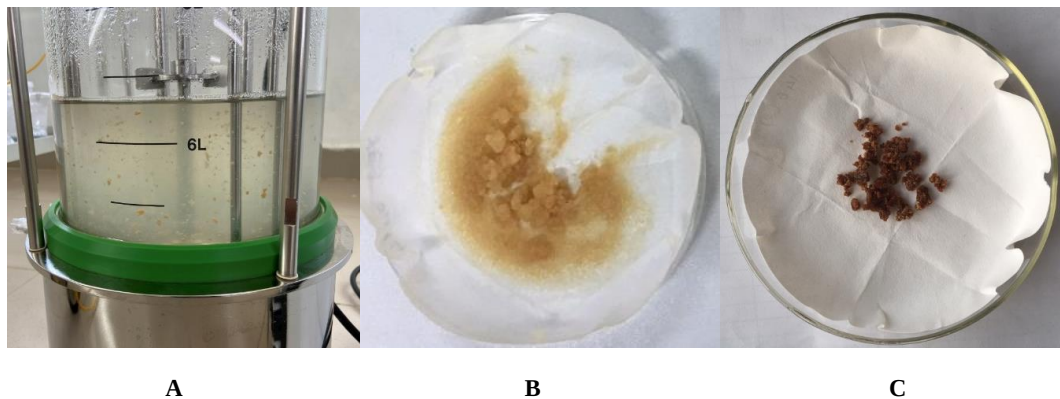
Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor

Các khối callus Giảo cổ lam trước khi nuôi cấy trong bioreactor được chuyển vào nuôi cấy trong các bình tam giác chứa môi trường lỏng, đây là bước chuyển tiếp quan trọng để tạo dịch huyền phù tế bào. 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.

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 (Hình 1). Trong giai đoạn này sinh khối có màu vàng đậm, kết thành nhiều khối nhỏ (Hình 2). 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. Ở thí nghiệm nuôi cấy trong bioreactor, thể tích mẫu thu trong mỗi đợt là 30 mL, chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ so với thể tích nuôi (> 6 L) nên không ảnh hưởng đến quá trình sinh trưởng của tế bào.



. Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù nuôi cấy trong bioreactor



A. Tế bào sinh trưởng trong bioreactor, B. Sinh khối tươi, C. Sinh khối khô. bar = 1 cm
ấy tế bào huyền phù *Glomus intraradices* trong bioreactor 12 lít

Sinh khối khô thu được từ các ngày nuôi cấy khác nhau trong bioreactor được chiết với methanol để thu gypenoside tổng số. Kết quả phân tích hàm lượng gypenoside tích lũy trong tế bào huyền phù được thể hiện ở Bảng 3.

Đường cong sinh trưởng của tế bào huyền phù *Glomus intraradices* nuôi cấy trong bioreactor 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

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy lên quá trình tích lũy gypenoside của tế bào huyền phù trong bioreactor

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

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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... [7].

4 Kết luận

Nuôi tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam có thể được thực hiện để sản xuất sinh khối, cung cấp nguyên liệu cho quá trình sản xuất gypenoside ở quy mô bioreactor. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor chứa 6 L môi trường cho thấy sinh khối tế bào đạt cao nhất sau 18 ngày, với 45,611 g tươi. Trong khi đó, hàm lượng gypenoside và Rb1 đạt cao nhất vào ngày thứ 16, với giá trị tương ứng là 40,090 mg/g và 0,038 mg/g khô.

Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhóm Nghiên cứu mạnh, Đại học Huế (mã số NCM.DHH2020.12).

Tài liệu tham khảo

1. Cui W. Y., Jin Y., Liu H., Zu M. L., Zhai X. F., Yang C., Gu Y. L., Cheng Y., Piao X. L. (2021), Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities, *Natural Product Research*, 35(22), 4433–4441.
2. Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lã Văn Hiền, Ngô Xuân Bình (2015), Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma*

- pentaphyllum* Thunb) bằng phương pháp *in vitro*, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, 15, 249–256.
3. Xie P., Luo H. T., Pei W. J., Xiao M. Y., Li F. F., Gu Y. L., Piao X. L. (2024), Saponins derived from *Gynostemma pentaphyllum* regulate triglyceride and cholesterol metabolism and the mechanisms: A review, *Journal of Ethnopharmacology*, 319(Pt 1), 117186.
 4. Chen P. Y., Chang C. C., Huang H. C., Zhang L. J., Liaw C. C., Lin Y. C., Nguyen N. L., Vo T. H., Cheng Y. Y., Morris-Natschke S. L., Lee K. H., Kuo Y. H. (2019), New Dammarane-type Saponins from *Gynostemma pentaphyllum*, *Molecules*, 24(7).
 5. 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.
 6. 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.
 7. Nguyễn Hoàng Lộc (2011), *Nuôi cấy mô và tế bào thực vật-Các khái niệm và ứng dụng*. NXB Đại học Huế.
 8. Jala A., Patchpoonporn W. (2012), Effect of BA NAA and 2,4D on Micropropagation of Tiaogulan (*Gynostemma pentaphyllum* Makino), *International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies*, 3(4), 363–370.
 9. 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.
 10. 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), 216–22.
 11. Anh T. T. N., Thi P. T. D., Lan T. T., Dung T. Q., Vu N. Q. H., Phuong T. T. B., Quang H. T. (2020), Affect of culture conditions on growth and accumulation of saponin Rb1 in *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino suspension cells, *Proceedings of Vietnam National Conference of Biotechnology*, 885–890 (in Vietnamese).
 12. 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.
 13. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497.
 14. Nhan N. H., Loc N. H. (2018), Enhancement of eurycomanone biosynthesis in cell culture of longjack (*Eurycoma longifolia*) by elicitor treatment, *J Plant Biotechnol*, 45(4), 340–346.

15. Loc N. H., Nhat N. T. D. (2013), Production of asiaticoside from centella (*Centella asiatica* L. Urban) cells in bioreactor, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(10), 806–810.
16. Wu Q., Jang M., Piao X. L. (2014), Determination by UPLC-MS of four dammarane-type saponins from heat-processed *Gynostemma pentaphyllum*, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(2), 311–316.
17. Quang H. T., Thi P. T. D., Sang D. N., Tram T. T. N., Huy N. D., Dung T. Q., The Q. T. T. (2022), Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*), *Molecules*, 27(9), 2972.
18. 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.
19. André S. B., Mongomake K., Kouassi M., Edmond K. K., 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.
20. 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.
21. Mello M. O., Dias C. T. S., Amaral A. F. C., 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.
22. 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.
23. 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.

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)

**Đặng Ngọc Sáng^{1,2}, Nguyễn Quang Hoàng Vũ¹, Nguyễn Thị Nguyên Mẫn³,
Nguyễn Hữu Thuần Anh⁴, Trần Quốc Dung⁵, Hoàng Tấn Quảng^{1*}**

¹Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế

²Trường THPT Chuyên Võ Nguyên Giáp, Quảng Bình

³Công ty TNHH Một thành viên Công nghệ sinh học QueenLabs, Huế

⁴Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, Thành phố Hồ Chí Minh

⁵ Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ. E-mail: htquang@hueuni.edu.vn

TÓM TẮT

Trong cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino), một số gene cytochrome P450 (CYP) và UDP-glucuronosyltransferase (UGT) đã được chứng minh đóng vai trò chính trong quá trình sinh tổng hợp gypenoside, trong đó có CYP89A2. Trong nghiên cứu này, mức độ phiên mã và đặc điểm của gene CYP89A2 đã được xác định. Đoạn gene CYP89A2 phân lập từ cây Giảo cổ lam có nguồn gốc tỉnh Quảng Nam có trình tự nucleotide tương đồng 99,17% với trình tự mRNA CYP89A2 đã được công bố trên Ngân hàng Gene (mã số MT416753). Kết quả dự đoán cấu trúc và đặc tính enzyme cho thấy enzyme CYP89A2 có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α và 8 vị trí gấp cuộn phiến β , có tới 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N-glycosylation. CYP89A2 chủ yếu hoạt động xuyên màng, có khả năng hoạt động tốt ở môi trường kiềm và chịu nhiệt độ từ 55 - 65 °C. Kết quả phân tích realtime PCR cho thấy gene CYP89A2 hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý methyl jasmonate, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, xử lý tế bào bằng salicylic acid và dịch chiết nấm men không làm thay đổi hoạt động của gene so với đối chứng. Kết quả nghiên cứu này cung cấp cơ sở khoa học để nghiên cứu cơ chế điều hòa biểu hiện gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside sau này.

Từ khóa: *Gynostemma pentaphyllum*, tin sinh học, Cytochrome P450, CYP89A2, tế bào huyền phù.

ĐẶT VẤN ĐỀ

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 (Cui *et al.*, 2020). Giảo cổ lam có tác dụng hạ đường huyết, chống oxi hóa, bảo vệ tế bào gan, giảm cholesterol và triglycerol trong máu,... trong đó saponin dạng dammarane-triterpene được cho là thành phần có vai trò chính (Bùi Đình Lãm và cs., 2015). 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 (*Panax ginseng*) (Chen *et al.*, 2019). Các protein họ cytochrom p450 (CYP) và UDP-glucuronosyltransferase (UGT) đóng vai trò điều chỉnh các gene liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside. 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 monosaccharide vào triterpene aglycone bởi

UDP-glycosyltransferase (UGT) (Xu *et al.*, 2020).

Zhang và cộng sự (2021) đã khảo sát mức độ biểu hiện của 7 enzyme cytochrome P450 và 5 enzyme UDP-glucuronosyltransferases tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside trong cây Giảo cổ lam, tác giả nhận thấy 5 gene là CYP77A3, CYP86A7, CYP94A1, UGT74F2 và UGT91C1 biểu hiện mạnh ở lá, đến thân và rễ. Trong khi đó, các gene CYP86A8, CYP89A2, CYP90A và UGT73B4 biểu hiện mạnh trong lá, đến rễ và thân. Tăng cường mức độ biểu hiện của các gene CYP và UGT có thể tăng khả năng sinh tổng hợp gypenoside. Tuy nhiên, đặc điểm, cấu trúc, chức năng của hầu hết các gene này chưa được nghiên cứu kỹ trên cây Giảo cổ lam, mặc dù đã có một số nghiên cứu tương tự trên các loài cây khác. Hiện nay, gene CYP89A2 mới chỉ có một trình tự được công bố trên Ngân hàng Gene và chưa được nghiên cứu ở Việt Nam.

Trong khuôn khổ nghiên cứu này, chúng tôi trình bày các kết quả phân tích và dự đoán đặc điểm của gene CYP89A2 trong cây Giảo cổ lam có

nguồn gốc từ tỉnh Quảng Nam. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để nghiên cứu cơ chế điều hòa biểu hiện gene tham gia vào quá trình sinh tổng hợp gypenoside sau này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Cây Giảo cổ lam 5 lá (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb) Makino) *in vitro* và tế bào hình thành từ cây *in vitro* (Hình 1) có nguồn gốc tự nhiên tại xã Trà Nam, huyện Nam Trà My, tỉnh Quảng Nam (Hoàng Tấn Quảng và cs., 2021).

Phương pháp

Nuôi tế bào huyền phù và xử lý kích kháng

Nuôi cấy tế bào huyền phù được thực hiện bằng cách cấy chuyển 3 g callus (30 ngày tuổi) vào bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường

lỏng, tốc độ lắc là 120 vòng/phút trên máy lắc SM 30A (Edmund Buhler, Đức). Các elicitor được bổ sung vào ngày thứ 6 của quá trình nuôi cấy với nồng độ hiệu quả nhất của từng chất, bao gồm methyl jasmonate (MeJA-50 μ M), salicylic acid (SA-100 μ M) và dịch chiết nấm men (YE-3 g/L). Sinh khối tế bào được thu sau 18 ngày nuôi cấy để tách chiết RNA tổng số (Quang *et al.*, 2022; Tung *et al.*, 2022).

Tách chiết DNA tổng số

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. Tiễn 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.



Hình 1. Cây Giảo cổ lam *in vitro* và tế bào huyền phù.

Khuếch đại gene

Phản ứng PCR được thực hiện với DNA tổng số là khuôn mẫu, sử dụng 12 cặp mồi đã được công bố bởi Zhang *et al.* (2021). Thành phần phản ứng PCR bao gồm: 1 μ L DNA tổng số (100 ng/ μ L), 1 μ L mồi của mỗi loại (10 pmol), 10 μ L 2 $\times$ GoTaq Green Master Mix (Promega, Mỹ), 3 μ L nước cất, tổng thể tích phản ứng là 12 μ L. 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).

Phân tích trình tự gene và xây dựng cây phát sinh

Trình tự nucleotide của sản phẩm PCR gene CYP89A2 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 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Các trình tự DNA được sắp xếp đóng cột bằng chức năng Clustal W trên phần mềm MEGA 11 với các tham số mặc định. Cây phát sinh được xây dựng dựa trên phương pháp Maximum Likelihood với giá trị bootstrap 1000 (Tamura *et al.*, 2021).

Dự đoán đặc điểm và chức năng của enzyme CYP89A2

Đặc điểm và chức năng của enzyme Cytochrome P450 (CYP89A2) từ cây Giảo cổ lam được dự đoán bằng các công cụ tin sinh học, bao gồm protein domain (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Letunic *et al.*, 2021). Mô hình cấu trúc không gian của CYP89A2 được dự đoán bằng công cụ Phyre2.2 (<https://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) (Kelley *et al.*, 2015). Cấu trúc xoắn xuyên màng được dự đoán nhờ TMHMM Server v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service>).

php?TMHMM-2.0) (Krogh *et al.*, 2001). Phân tích khả năng glycosyl hóa kiểu N (N-glycosylation) của enzyme bằng công cụ NetNGlyc 1.0 Server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>) (Gavel, von Heijne, 1990).

Đặc điểm hóa - lý của enzyme *CYP89A2* được dự đoán như điểm đẳng điện bằng công cụ IPC 2.0 (<http://www.ipc2-isoelectric-point.org/>) (Kozlowski, 2021), khả năng chịu nhiệt được dự đoán bằng công cụ Tm Predictor (<http://140.114.98.13/tm/>). Môi trường xúc tác (acid/base) của enzyme được dự đoán bằng công cụ AcalPred (<http://lin-group.cn/server/AcalPred>) (Lin *et al.*, 2013).

Xác định mức độ phiên mã của gene trong tế bào

RNA tổng số được tách chiết từ mẫu tế bào huyền phù bằng kit GeneJET Plant RNA

Purification Kit (Thermo Scientific, Mỹ) và phản ứng sinh tổng hợp sợi cDNA thứ nhất được thực hiện bằng kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để đánh giá mức độ phiên mã của gene *CYP89A2*, chúng tôi tiến hành phản ứng realtime PCR với cặp mồi đặc hiệu của gene này là *RT-CYP89A2*, sử dụng nội đối chứng (control - house keeping gene) là 18sRNA (Bảng 1). Phản ứng Real-Time 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 (Zhang *et al.*, 2021). Thành phần phản ứng: 10 µL Go Taq qPCR Master Mix 2X (Promega, Mỹ), 1 µL mỗi mỗi loại (10 pmol), 1 µL cDNA, 7 µL nước cất. Quá trình khuếch đại được thực hiện trên hệ thống QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (ABI, Mỹ).

Bảng 1. Các mồi được sử dụng trong nghiên cứu.

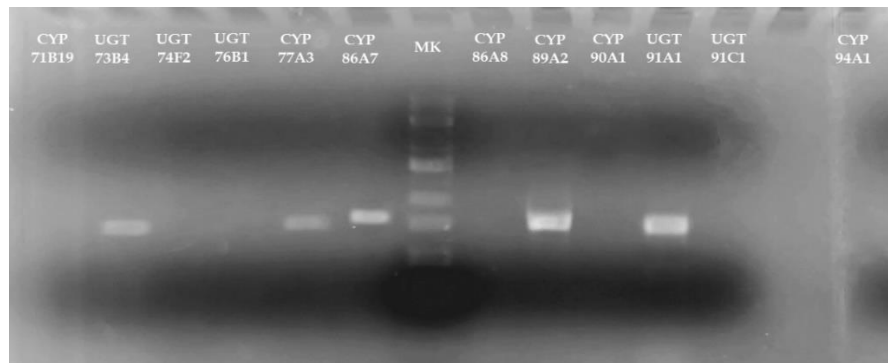
Mồi	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
RT-CYP89A2	5'-CCCTTCCAAACTCACAAAAC-3' 5'-AATGGAGATTGCGAAGAGTT-3'	(Zhang <i>et al.</i> , 2021)
GP-18sRNA	5'-ACGATGCCGACCAGGGATT-3' 5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2018)

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập gene *CYP89A2*

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 4/7 gene *CYP* và 1/5 gene *UGT* có sản phẩm khuếch đại đặc hiệu (Hình 2). Trong đó, gene *CYP89A2* thể hiện sự khuếch đại mạnh nhất (băng đậm nhất) nên được lựa chọn để nghiên cứu sâu hơn.



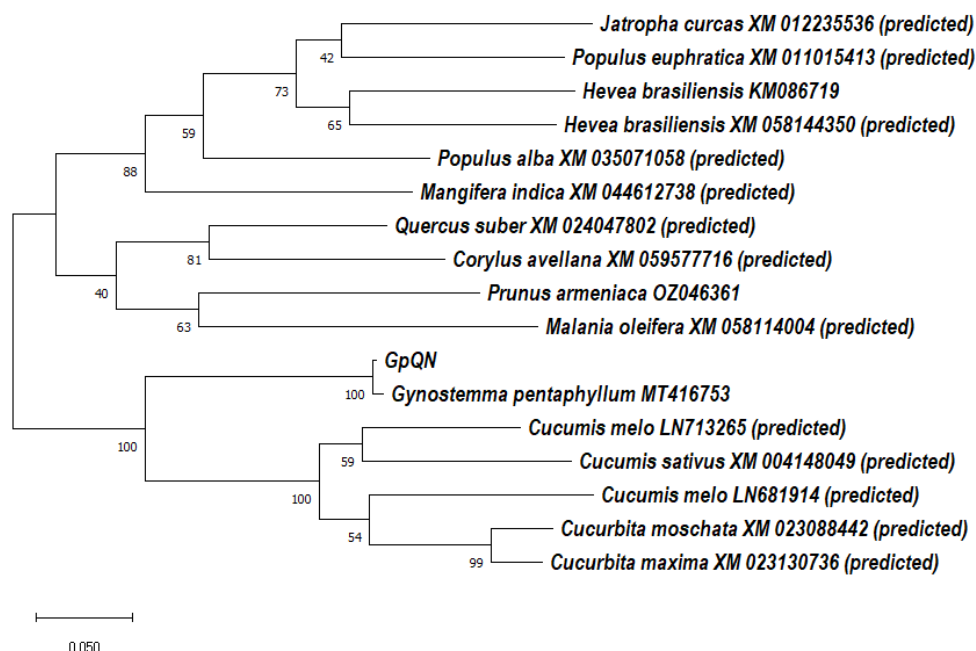
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR 12 gene *CYP* và *UGT*. MK: thang chuẩn kích thước DNA (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Mỹ).

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), từ đó có thể khẳng định đoạn gene *CYP89A2* đã phân lập được.

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 *Cucurbita maxima* 76,60% (XM_023130736), *Cucumis melo* 76,21% (LN681914) hay *Cucurbita moschata* 76,21% (XM_023087977). Đối với các họ thực vật khác, sự khác biệt cao hơn, ví dụ tương đồng 71,92% so với *Prunus armeniaca* (OZ046361) (Hình 3).



Hình 3. Cây di truyền dựa trên trình tự gene *CYP89A2*. Chỉ số ở mỗi nhánh thể hiện mức độ tin cậy với bootstrap 1000.

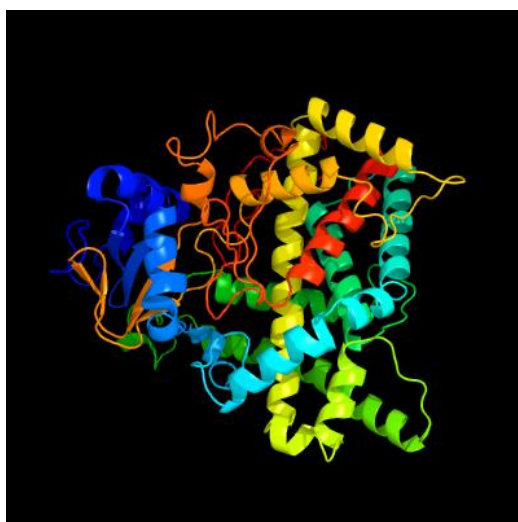
Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm hóa lý của enzyme

Từ kết quả phân tích trình tự, đoạn gene *CYP89A2* từ mẫu CpQN 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 squal synthase của cây Đan sâm *Salvia miltiorrhiza* CYP76AH3 (mã số PDB: 7x2q, mã số Phyre: c7x2qA_) với độ bao phủ 91% (460/506 amino acid) và độ tin cậy 100%. Cấu trúc bậc hai của *CYP89A2* có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α (chiếm 45%) và 8 vị trí gấp cuộn β (8%) (Hình 4). Ngoài ra, trong cấu trúc enzyme còn có các đoạn rối (Disordered) chiếm 7% và xoắn xuyên màng (TM helix) chiếm 8%.

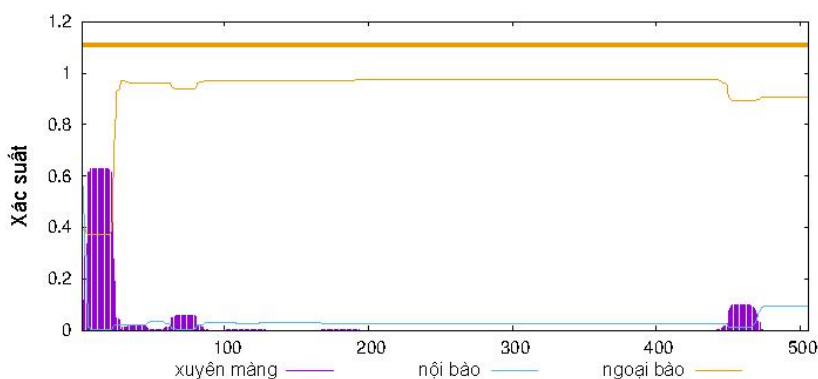
Vùng bảo tồn được dự đoán bằng chương trình SMART cho thấy enzyme có 13 domain hiện diện là PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding,

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 (Hình 5). 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 (Hình 6).

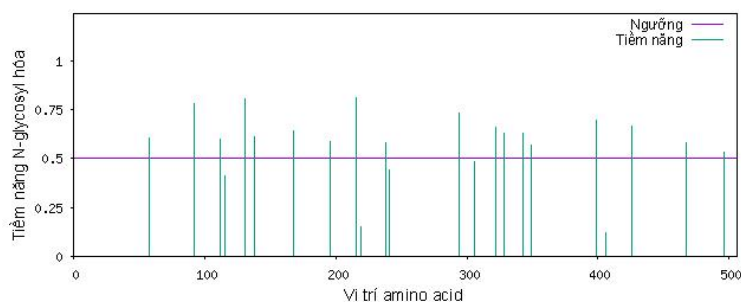
Đối với *CYP89A2*, trình tự mRNA có chiều dài 1.521 bp và mã hóa trình tự polypeptide dài 506 amino acid, enzyme có khối lượng phân tử là 58,44 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 7,06. Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của *CYP89A2* bằng công cụ Tm Predictor cho thấy enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55 - 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.



Hình 4. Dự đoán cấu trúc không gian của *CYP89A2*. 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.



Hình 5. Mô hình cấu trúc không gian của *CYP89A2* được xây dựng nhờ TMHMM Server v. 2.0.



Hình 6. Vị trí các amino acid có thể glycosyl hóa.

Xác định mức độ phiên mã của gene *CYP89A2* trong tế bào huyền phù

Để hiểu rõ vai trò và hoạt động của gene *CYP89A2*, chúng tôi đánh giá mức độ phiên mã của gene này trong tế bào huyền phù nuôi cấy ở các điều kiện xử lý kích kháng khác nhau. Trong nghiên cứu trước đây, công thức xử lý kích kháng riêng lẻ tốt nhất là MeJA (50 μ M), SA (100 μ M) và YE (3 g/L) (Quang *et al.*, 2022), vì vậy, mức độ phiên mã của gene *CYP89A2* được xác định trong các công thức tốt

nhất này.

Kết quả phân tích Real-Time PCR cho thấy gene *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý MJ, 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 gen so với đối chứng (Bảng 2). Theo Quang và cộng sự (2022), 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 gene *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất khi xử lý với MJ, điều này có thể gene *CYP89A2* có thể đóng các vai trò khác trong chu trình sinh tổng hợp gypenoside. 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.

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 *Polypogon fugax* 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 (Chen *et al.*, 2023). Gene *CYP89A2* cũng biểu hiện ở các mô trong cây *Apera spica-venti* khi xử lý thuốc diệt cỏ (Babineau *et al.*, 2017). Ở cây *Arabidopsis thaliana*, biểu hiện của gene *CYP89A2* cũng tăng lên khi xử lý ánh sáng đỏ xa (far red) (Cole, 2018). Tuy nhiên, vai trò chức năng cụ thể của gene *CYP89A2* vào con đường sinh tổng hợp saponin cần nghiên cứu thêm.

Bảng 2. Mức độ biểu hiện của gene *CYP89A2* trong các loại mẫu khác nhau.

Gene	Xử lý kích kháng	Giá trị Ct GP-18S	Gene	2- $\Delta\Delta$ Ct
<i>CYP89A2</i>	YE	26,30	34,51	0,10
	SA	28,79	36,78	0,11
	MJ	32,43	33,81	10,83
	NC	28,94	33,76	1,00

KẾT LUẬN

Đoạn gene *CYP89A2* phân lập từ cây Giảo cổ lam có nguồn gốc tỉnh Quảng Nam có trình tự nucleotide tương đồng 99,17% với trình tự mRNA *CYP89A2* của cây Giảo cổ lam đã được công bố trên Ngân hàng Gene (mã số MT416753). Kết quả dự đoán cấu trúc và đặc tính enzyme cho thấy enzyme *CYP89A2* có 15 vị trí gấp cuộn xoắn α và 8 vị trí gấp cuộn phiến β , có 21 vị trí amino acid có khả năng xảy ra N-glycosylation. *CYP89A2* chủ yếu hoạt động xuyên màng, có khả năng hoạt động tốt ở môi trường kiềm và chịu nhiệt độ từ 55 - 65 $^{\circ}$ C. Enzyme *CYP89A2* hoạt động mạnh nhất trong tế bào được xử lý methyl jasmonate, cao hơn khoảng 11 lần so với đối chứng không xử lý elicitor.

Lời cảm ơn

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của nhóm Nghiên cứu mạnh, Đại học Huế (mã số NCM.DHH2020.12).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

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. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3538-4>.
 Bùi Đình Lâm, Nguyễn Thị Tình, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Văn Bảo, Lê Văn Hiền, Ngô Xuân Bình (2015) Nghiên cứu khả năng nhân giống cây Giảo cổ lam (*Gynostemma pentaphyllum* Thunb)

bằng phương pháp *in vitro*. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 15: 249-256.

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). 10.3390/molecules24071375

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. *Ecotoxicol Environ Saf* 263: 115263. 10.1016/j.ecoenv.2023.115263.

Cole A (2018) Regulation of Seed Germination by MFT, MEE26, and *CYP89A2* in *Arabidopsis thaliana*. Thesis, University of York.

Cui WY, Jin Y, Liu H, Zu ML, Zhai XF, Yang C, Gu YL, Cheng Y, Piao XL (2020) Dammarane-type saponins from *Gynostemma pentaphyllum* and their cytotoxicities. *Nat Prod Res* 1-9.

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.

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.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10(6): 845-858.
- Kozłowski Lukasz P (2021) IPC 2.0: prediction of isoelectric point and pKa dissociation constants. *Nucleic Acids Res* 49(W1): W285-W292.
- 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.
- Letunic I, Khedkar S, Bork P (2021) SMART: recent updates, new developments and status in 2020. *Nucleic Acids Res* 49(D1): D458-D460.
- Lin H, Chen W, Ding H (2013) AcalPred: a sequence-based tool for discriminating between acidic and alkaline enzymes. *PLoS One* 8(10): e75726.
- Quang HT, Thi PTD, Sang DN, Tram TTN, Huy ND, Dung TQ, The QTT (2022) Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*). *Molecules* 27(9): 2972. <https://doi.org/10.3390/molecules27092972>.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol* 38: 3022-3027.
- Tung NT, Thi PTD, Sang DN, Thao DT, Quang HT (2022) Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. *Res J Biotech* 17: 61-68.
- 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*. *Chin Her Med* 10(1): 34-39.
- 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.
- 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. [10.1371/journal.pone.0260027](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260027). eCollection 2021.

GENE ISOLATION, CHARACTERISTICS PREDICTION AND TRANSCRIPTION LEVEL OF CYTOCHROME P450 GENE (CYP89A2) FROM *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino

Dang Ngoc Sang^{1,2}, Nguyen Quang Hoang Vu¹, Nguyen Thi Nguyen Man³, Nguyen Huu Thuan Anh⁴, Tran Quoc Dung⁵, Hoang Tan Quang^{1*}

¹Institute of Biotechnology, Hue University

² Vo Nguyen Giap Gifted High School, Quang Binh

³QueenLabs Biotechnology One Member Company, Hue

⁴Nguyen Tat Thanh University, Ho Chi Minh City

⁵ University of Education, Hue University

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: htquang@hueuni.edu.vn

SUMMARY

Gypenosides produced from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino are mainly dammarane-type triterpenoid saponins with diverse structures and important biological activities. Seven cytochrome P450 (CYP) and five UDP-glucuronosyltransferase (UGT) genes have been demonstrated to be involved in gypenoside biosynthesis and distribution in *G. pentaphyllum*. In this study, the transcription levels and characteristics of the CYP89A2 gene were determined. The result showed that the nucleotide sequence of CYP89A2 gene fragment had

99.17% similarity to the reference gene (GenBank accession number of MT416753). The secondary structure prediction reveals that *CYP89A2* has 15 α -helices and 8 β -sheets. The predicted *CYP89A2* is an alkaline extracellular enzyme and resistant to temperatures from 55-65 °C. Realtime PCR analysis showed that the *CYP89A2* transcription level was high in suspension cells with methyl jasmonate treatment, about 11 times higher than that of control. Meanwhile, salicylic acid and yeast extract elicitation did not change gene transcription compared to the control. The results provide a scientific basis for studying the gene expression regulation mechanism of gypenoside biosynthesis in the future.

Keywords: *Bioinformatics tools, Gynostemma pentaphyllum, Cytochrome P450, CYP89A2, suspension cell.*

Huế, ngày 10 tháng 6 năm 2026

BẢN GIẢI TRÌNH CHỈNH SỬA
SAU HỘI ĐỒNG ĐÁNH GIÁ LUẬN ÁN TIẾN SĨ CẤP ĐẠI HỌC HUẾ

1. **Họ và tên nghiên cứu sinh:** Đặng Ngọc Sáng
2. **Tên 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)
3. **Khóa:** 2021
4. **Ngành:** Sinh học Mã số: 9420101
5. **Bảo vệ luận án cấp cơ sở ngày:** 17/11/2025
6. **Bảo vệ luận án cấp Đại học Huế ngày:** 13/3/2026
7. **Người hướng dẫn:**
 1. PGS. TS. Trần Quốc Dung
 2. TS. Hoàng Tấn Quảng

Dựa trên những nhận xét, góp ý và đề nghị của các thành viên trong Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Đại học Huế đối với bản luận án, nghiên cứu sinh xin tiếp thu nghiêm túc và sửa chữa luận án theo các điểm sau:

STT	Yêu cầu, góp ý của Hội đồng	Sửa chữa hoặc bảo lưu
1	VỀ HÌNH THỨC TRONG LUẬN ÁN - Mục lục cần định dạng lại để dòng cuối không bị sang 1 trang mới.	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS đã định dạng lại mục lục để dòng cuối không bị sang 1 trang mới.
	- Yêu cầu về chỉnh sửa, bổ sung, thay thế cho hình ảnh bị mờ, thiếu chú thích, Việt hóa	- NCS đã thay thế các hình ảnh mờ bằng hình ảnh có độ phân giải tốt hơn. Bổ sung Việt hóa, bổ sung chú thích cho các hình ảnh, biểu đồ.

- Danh mục hình cần định dạng lại để giảm những dòng cuối sang 1 trang mới.	- NCS đã định dạng lại danh mục hình để giảm những dòng cuối sang trang mới.
- Danh mục các từ viết tắt tách riêng sang trang mới.	- NCS đã tách riêng danh mục các từ viết tắt sang trang mới.
- Cần rà soát và thống nhất 1 định dạng trích dẫn để hoàn thiện luận văn.	- NCS đã rà soát lại và thống nhất 1 định dạng trích dẫn.
- Cần rà soát và sắp xếp lại danh mục tài liệu tham khảo theo đúng trình tự trích dẫn (tăng dần). Hiện nay, một số trích dẫn trong nội dung luận án và danh mục tham khảo chưa đảm bảo tính đồng nhất về thứ tự	- NCS đã rà soát và sắp xếp lại danh mục tài liệu tham khảo theo thứ tự alphabet và trích dẫn theo thứ tự đó.
- Hình 1.3; 1.4 mờ cần làm lại. Tương tự rà soát tất cả các hình.	- NCS đã đổi lại Hình 1.3 và 1.4 để tăng độ phân giải của hình.
- Bảng 2.2 cần bổ sung chiều của trình tự môi.	- NCS đã bổ sung chiều của trình tự môi ở Bảng 2.2.
- Ở Hình 1.3 (trang 22), đây là sơ đồ quy trình nghiên cứu nên phù hợp hơn khi đặt trong phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu, do đó có thể chuyển sang mục 2.2 (trang 35). Đồng thời cần thay hình có độ phân giải cao hơn vì hình hiện còn mờ. Hình 1.4 (trang 24) cũng nên kiểm tra lại chất lượng hình ảnh để đảm bảo khả năng quan sát.	- NCS đã chuyển Hình 1.3 sang mục 2.2 đồng thời NCS đã thay thế Hình 1.3 và Hình 1.4 bằng hình có độ phân giải cao hơn.
- Bảng Danh mục các hình ảnh không trùng khớp với số trang trong luận án (tr.viii). Hình ảnh, bảng với phần ghi chú nên sắp xếp trên cùng một trang để dễ theo dõi (nhiều chỗ);	- NCS đã chỉnh sửa để trong Bảng danh mục các hình ảnh trùng khớp với số trang trong luận án. - NCS đã sắp xếp phần ghi chú của hình ảnh và bảng biểu để cả hai đều nằm trên một trang cho dễ theo dõi.

Hình cắt dán chưa khớp (H.3.13 tr.93). - Cách viết gene và protein tương ứng của gene.	- NCS đã thay thế Hình 3.13 thay thế cho hình cũ cắt dán chưa khớp. - NCS đã thống nhất cách viết gene và protein tương ứng trong toàn bộ luận án.
- Danh mục các từ viết tắt: cần rà soát và bổ sung các từ viết tắt của toàn bộ luận án: ví dụ viết tắt về các gen ở cây nhân sâm...	- NCS đã rà soát và bổ sung đầy đủ các từ viết tắt của toàn bộ luận án.
- Rà soát các lỗi khoảng cách, chính tả, format dấu chấm (.) phẩy (,) ở phần số trong toàn bộ luận án. - Bổ sung thanh bar (thước đo) ở các hình còn thiếu.	- NCS đã rà soát và chỉnh sửa lại các lỗi khoảng cách, chính tả, format dấu chấm, dấu phẩy ở phần số trong toàn bộ luận án. - NCS đã bổ sung thanh bar (thước đo) ở các hình còn thiếu.
- Luận án còn lỗi chính tả, lỗi in ấn, ví dụ Hình 3.10: TMHMM là công cụ dự đoán topo xuyên màng (2D), nhưng NCS ghi nhầm tên hình là "Mô hình cấu trúc không gian". - Cần chuẩn hóa một số thuật ngữ khoa học như đổi "cây di truyền" thành "cây phát sinh loài". Đổi "cỡ mẫu" trong nuôi cấy thành "mật độ tiếp giống". Đổi "bắt giữ chu kỳ tế bào" nếu dịch từ cụm từ "cell cycle arrest" thì cần chuyển thành "ngừng chu kỳ tế bào", "sợi cDNA thứ nhất" thành "cDNA mạch đơn", "giải trình tự lai" thành "giải trình tự kết hợp"... - Đánh số lại Bảng biểu (hiện đang thiếu Bảng 3.16 trong danh mục).	- NCS đã đổi lại tên hình là: "Dự đoán topo xuyên màng (2D)..." - NCS đã chuẩn hóa một số thuật ngữ khoa học như đổi "cây di truyền" thành "cây phát sinh loài". Đổi "cỡ mẫu" trong nuôi cấy thành "mật độ tiếp giống". Đổi "bắt giữ chu kỳ tế bào" thành "ngừng chu kỳ tế bào", "sợi cDNA thứ nhất" thành "cDNA mạch đơn", "giải trình tự lai" thành "giải trình tự kết hợp" - NCS đã đánh số lại các Bảng biểu trong danh mục để thứ tự được liên tục.

	- Phân tích HPLC cho ra "sắc ký đồ" (chromatogram), chứ không phải là "phổ" (phổ chỉ dành cho MS, NMR, UV-Vis) (Hình 3.6)... - Một số câu văn diễn đạt chưa thật rõ nghĩa và chưa chuẩn về cách diễn đạt khoa học, ví dụ "<i>Nghiên cứu công nghệ giải trình tự RNA tế bào đơn cho thấy quá trình sinh tổng hợp gypenoside...</i>".	- NCS đã đổi tên của hình 3.6 thành "Sắc ký đồ..." để phản ánh đúng kết quả của phân tích HPLC. - NCS đã diễn đạt lại một số câu văn để đảm bảo mức độ chính xác và rõ nghĩa.
2	VỀ MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU - Mục tiêu chung cần viết tổng quát hơn. Mục tiêu cụ thể cần bám sát các nội dung nghiên cứu để xây dựng mục tiêu chi tiết.	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS xin trân trọng tiếp thu ý kiến góp ý của Hội đồng phản biện. - Mục tiêu chung của luận án đã được NCS chỉnh sửa theo hướng khái quát hơn, phản ánh định hướng khoa học tổng thể của đề tài thay vì mô tả trực tiếp một nội dung nghiên cứu cụ thể. - Đồng thời, các mục tiêu cụ thể đã được rà soát và chỉnh sửa để bám sát các nội dung nghiên cứu chính của luận án, bảo đảm tính logic và sự thống nhất giữa mục tiêu, nội dung nghiên cứu, kết quả đạt được và phần kết luận.
	- Luận án có trình bày kết quả giải trình tự và phân tích mức độ biểu hiện của một số gen <i>CYP</i> và <i>UGT</i> liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside, nhưng nội dung này chưa được đề cập trong các mục tiêu nghiên cứu.	- NCS đã rà soát và chỉnh sửa mục tiêu nghiên cứu theo hướng thể hiện rõ hơn nội dung nghiên cứu về phân tích biểu hiện các gen liên quan đến sinh tổng hợp gypenoside.

3	VỀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU - Trong phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (trang 34), nên bổ sung tiểu mục riêng về hóa chất, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu. - Sơ đồ bố trí thí nghiệm phải đặt ở phần Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (tr.22). - Cần bổ sung nhiệt độ gắn mỗi vào Bảng 2.1. Trình tự mỗi trong nhận diện các gene. - Tiêu đề mục 2.2.1 (trang 35) nên chỉnh thành “Cảm ứng và nuôi cấy mô sẹo (callus)”. Ở trang 36, nên thay các thuật ngữ “trọng lượng khô”, “trọng lượng không đổi” bằng “khối lượng khô” và “khối lượng không đổi”. - Khi sử dụng ký hiệu ORF (trang 40) nên viết đầy đủ khi xuất hiện lần đầu: Open Reading Frame (ORF). - Ở mục 2.2.9 – Xử lý thống kê (trang 49), nên mô tả đầy đủ rằng thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với ba lần lặp lại. - Nêu một số hạn chế của nuôi cấy huyền phù tế bào. - Nên bổ sung quy trình nuôi cấy và thu nhận sinh khối tế bào cây Giáo cổ lam.	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS đã bổ sung tiểu mục “Hóa chất, dụng cụ và thiết bị nghiên cứu” trong Chương 2. - NCS đã chuyển sơ đồ bố trí thí nghiệm từ phần Tổng quan sang Chương 2 – Vật liệu và phương pháp nghiên cứu. - NCS đã bổ sung nhiệt độ gắn mỗi vào Bảng 2.1. Trình tự mỗi trong nhận diện các gene. - NCS đã chỉnh sửa tiêu đề mục 2.2.1 (trang 35) cũng như thay thế các thuật ngữ như góp ý của Hội đồng. - NCS đã viết đầy đủ của ký hiệu viết tắt ORF là Open Reading Frame khi xuất hiện lần đầu - NCS đã chỉnh sửa, bổ sung mô tả: thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với ba lần lặp lại. - NCS đã bổ sung một số hạn chế của phương pháp nuôi cấy huyền phù tế bào. - NCS xin tiếp thu ý kiến của phản biện và đã rà soát lại phần Phương pháp nghiên cứu. Quy trình nuôi cấy hiện đã được trình bày tại các mục
---	---	--

		2.2.1 và 2.2.2 với các bước thực hiện và điều kiện nuôi cấy tương ứng. Để bảo đảm tính mạch lạc và tránh trùng lặp, nghiên cứu sinh chỉ chỉnh sửa, hoàn thiện cách diễn đạt mà không bổ sung thêm một quy trình riêng biệt.
4	VỀ PHẦN TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU - Trang 10 câu cuối ở đoạn đầu tiên cần nói rõ một số tế dòng tế bào nào đã được dùng để thử nghiệm là dòng tế bào ung thư nào? - Bổ sung tổng quan về tác dụng dược lý của Giáo cổ lam đến bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột. - Một số nội dung của tổng quan <i>không cần</i> mô tả quá chi tiết như đặc điểm thực vật học, điều kiện sinh thái, đây là kiến thức chung. - Phần tổng quan tài liệu nên bổ sung thêm các nội dung liên quan đến vai trò sinh thái của gypenoside trong cơ chế phòng vệ của thực vật, cơ chế kích hoạt sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp bởi elicitor. - Tác giả nên giới thiệu gen <i>UGT91A1</i> đóng vai trò quan trọng trong việc glycosyl hóa các hợp chất thứ cấp (như saponin, anthocyanin)	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS đã chỉnh sửa, bổ sung tên của một số dòng tế bào ung thư đã được dùng để thử nghiệm trong luận án. - NCS đã bổ sung nội dung tổng quan về cơ chế và hiệu quả tác dụng dược lý của Giáo cổ lam đến bảo vệ tế bào tinh hoàn chuột. - NCS đã rà soát lại toàn bộ phần Tổng quan, lược bỏ hoặc rút gọn các nội dung mô tả quá chi tiết về đặc điểm thực vật học, điều kiện sinh thái và các kiến thức mang tính phổ thông đã được công bố rộng rãi trong các tài liệu chuyên ngành. - NCS đã rà soát và bổ sung các nội dung tổng quan liên quan đến chức năng sinh thái của gypenoside cũng như cơ chế kích hoạt con đường sinh tổng hợp hợp chất thứ cấp dưới tác động của elicitor, góp phần hoàn thiện cơ sở lý luận cho các nội dung nghiên cứu của luận án. - NCS đã tiếp thu ý kiến của Hội đồng và bổ sung nội dung về vai trò của gene <i>UGT91A1</i> trong quá trình glycosyl hóa các hợp chất thứ cấp và

	để phản ứng lại với các stress phi sinh học (abiotic stress) như khô hạn, độ mặn, hoặc nhiệt độ lạnh (bổ sung vào phần tổng quan tài liệu). - Hình ảnh 1.2 không được chú thích và đưa vào nội dung bài. - Trong phạm vi luận án, cần xác định rõ thuật ngữ “giảo cổ lam” là để chỉ loài <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino mà tác giả nghiên cứu hay nói chung.	đáp ứng của thực vật đối với stress phi sinh học vào phần Tổng quan tài liệu. - NCS đã bổ sung chú thích Hình 1.2 và đưa vào nội dung bài. - NCS đã xác định rõ hơn về đối tượng nghiên cứu với thông tin bổ sung: “Trong toàn bộ luận án, tên gọi “Giảo cổ lam” được sử dụng thống nhất để chỉ loài <i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino là đối tượng nghiên cứu, nhằm tránh nhầm lẫn với các loài khác thuộc chi <i>Gynostemma</i>.”
5	VỀ PHẦN KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN - Đa phần các kết quả thí nghiệm có thảo luận nhưng đôi chỗ thì không (tr.55). - Phần 3.1.1. nên bổ sung thảo luận vì sao sinh khối tươi và khô đều cao nhất sau 20 ngày nuôi cấy nhưng tích lũy gypenoside lại đạt cao nhất (42,122 mg/g khô) vào ngày 18. - Bảng 3.2 (trang 55). Vì sao khi nghiên cứu ảnh hưởng của BAP và KIN lên tích lũy gypenoside thì hàm lượng tích lũy gypenoside (35, 850 mg/g khô và 40,9 mg/g khô tương ứng) lại thấp hơn điều kiện nuôi cấy chuẩn trong môi trường MS lỏng.	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS đã bổ sung nội dung thảo luận nhằm làm rõ tỷ lệ cytokinin và auxin có ảnh hưởng đáng kể đến quá trình sinh trưởng và chuyển hóa thứ cấp của tế bào huyền phù. - NCS đã bổ sung thảo luận ở phần 3.1.1 để làm rõ quá trình tích lũy hợp chất thứ cấp không hoàn toàn đồng bộ với quá trình tăng sinh sinh khối. - NCS đã bổ sung phần thảo luận để làm rõ rằng chất điều hòa sinh trưởng (BAP, KIN) và nguồn carbon không chỉ ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp gypenoside mà còn tác động đến sự phân chia và tăng trưởng của tế bào. Trong một số điều kiện, nguồn carbon và năng lượng được ưu tiên cho quá trình sinh

- Ở mục 3.2 (trang 63) cần bổ sung thêm phần viết biện luận ở khổ đầu tiên để làm rõ ý về ảnh hưởng của elicitor đến sản xuất gypenoside từ nuôi cấy huyền phù. - Trong Bảng 3.2 (trang 55), kết quả về môi trường tối ưu chưa đầy đủ vì cả hai công thức BAP 2,5 mg/L + IBA 0,5 mg/L và KIN 2 mg/L + IBA 0,5 mg/L đều đạt cùng mức phân hạng thống kê cao nhất; do đó cần điều chỉnh phần nhận xét cho phù hợp với số liệu. - Ở Hình 3.2 (trang 52), cần kiểm tra lại hình ảnh vì có dấu hiệu mẫu chưa thật sự đồng nhất với mô tả dòng huyền phù. - Nội dung mục 3.2.1 nên chia thành hai tiểu mục riêng để rõ ràng hơn: nhóm elicitor MeJA, JA và nhóm YE, FOX. - Ở Hình 3.5 (trang 68) cần bổ sung scale bar.	trường hơn là chuyển hóa thứ cấp, dẫn đến hàm lượng gypenoside tính trên đơn vị khối lượng khô thấp hơn so với điều kiện nuôi cấy chuẩn trong môi trường MS lỏng. - NCS đã bổ sung phần biện luận ở khổ đầu tiên mục 3.2 để làm rõ hơn nữa ảnh hưởng của elicitor đến sản xuất gypenoside từ nuôi cấy huyền phù. - NCS đã điều chỉnh phần nhận xét ở kết quả thể hiện trong Bảng 3.2 để phù hợp với số liệu thống kê. - NCS đã kiểm tra lại hình ảnh và xác nhận hình ảnh lựa chọn là chính xác với mô tả dòng tế bào nuôi cấy huyền phù. - Nghiên cứu sinh xin tiếp thu ý kiến của Hội đồng. Tuy nhiên, do các nội dung trong mục 3.2.1 đều thuộc cùng một nhóm nghiên cứu về ảnh hưởng của các elicitor đến nuôi cấy tế bào huyền phù và được trình bày theo một cấu trúc thống nhất để thuận lợi cho việc đối chiếu, so sánh kết quả, nghiên cứu sinh xin được giữ nguyên bố cục của tiểu mục - NCS đã thay thế bằng hình ảnh có scale bar.
--	--

	- Đối với Hình 3.6 (trang 72), tiêu đề hình nên viết đầy đủ hơn. - Trong mục 3.3.1 (trang 86) nên thay cụm từ “sản xuất cao chiết” bằng “thu nhận cao chiết” cho phù hợp với quy mô nghiên cứu. - Bổ sung hình ảnh chạy điện di khi phân lập 12 gene trên vào phần 3.2.4.1. - Tiểu mục “3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết” nên đổi thành “3.3.3. Đánh giá tác dụng bảo vệ mô tinh hoàn chuột <i>in vivo</i> của chế phẩm cao chiết”.	- NCS đã chỉnh sửa lại tiêu đề của hình như nhận xét của Hội đồng. - NCS đã thay thế cụm từ “sản xuất cao chiết” bằng “thu nhận cao chiết” để phù hợp với quy mô nghiên cứu. - Giải trình: NCS xin trân trọng cảm ơn ý kiến góp ý của Hội đồng. Các thí nghiệm phân lập 12 gene trong nghiên cứu được thực hiện độc lập ở nhiều thời điểm khác nhau theo tiến độ triển khai của từng nhóm gene và không được tiến hành trong cùng một lần điện di. Do đó, NCS không có hình ảnh điện di chung cho toàn bộ 12 gene. Mặt khác, kết quả phân lập của từng gene đã được xác nhận thông qua kích thước sản phẩm PCR, kết quả giải trình tự nucleotide và các phân tích tin sinh học tương ứng được trình bày trong luận án. Vì vậy, nghiên cứu sinh xin phép giữ nguyên cách trình bày hiện tại của luận án. - NCS đã chỉnh sửa, thay đổi tên của tiểu mục 3.3.3 theo góp ý của Hội đồng phản biện.
6	VỀ PHẦN KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ - Phần kết luận (trang 96) nên viết lại ngắn gọn, bám sát mục tiêu	Giải trình, chỉnh sửa: - NCS đã rà soát, biên tập lại phần Kết luận theo hướng ngắn gọn, súc tích và bám sát các mục tiêu nghiên

nguyên cứu, tránh các câu mang tính diễn giải. - Phần kết luận và kiến nghị: Kết luận 03 cần ghi rõ gene <i>CYP</i> và <i>UGT</i> nào tăng phiên mã. Không nên lặp lại từ “luận án” quá nhiều lần ở 05 kết luận. - Một số kết luận cần viết lại cho phù hợp với số liệu, ví dụ ở kết luận thứ 4. - Tác giả cần điều chỉnh lại các kết luận về giá trị IC_{50} theo hướng phản ánh đúng phạm vi thí nghiệm và kết quả thu được.	cứ của luận án. Trong đó các kết luận được trình bày dưới dạng các kết quả chính đạt được, hạn chế các nội dung mang tính diễn giải, so sánh hoặc thảo luận nhằm bảo đảm tính logic và thống nhất với cấu trúc của một luận án tiến sĩ. - NCS đã ghi rõ các gene <i>CYP</i> và <i>UGT</i> tăng phiên mã ở phần kết luận cụ thể là: “...<i>CYP89A2</i> tăng 11,14 lần, <i>CYP94A1</i> tăng 10,01 lần, <i>UGT73B4</i> tăng 15,35 lần.” - NCS đã viết lại kết luận thứ 4 theo góp ý của Hội đồng phản biện vì nội dung “thiết lập quy trình làm giàu gypenoside” và “tạo cơ sở cho chuẩn hóa, phát triển chế phẩm” chưa được chứng minh đầy đủ bằng dữ liệu thực nghiệm. - NCS đã điều chỉnh lại kết luận về giá trị IC_{50} ở kết luận 05: Vì giá trị IC_{50} khoảng 86,7 $\mu\text{g/mL}$ này thực chất chỉ phản ánh mức hoạt tính trung bình yếu trong các thang đánh giá cytotoxicity thông thường.
- Các kiến nghị của luận án cần diễn đạt thận trọng hơn khi đề cập đến khả năng cung cấp nguồn nguyên liệu quy mô lớn cho ngành dược vì các thí nghiệm trong luận án mới dừng ở quy mô phòng thí nghiệm.	- NCS đã chỉnh sửa lại kiến nghị thứ nhất như sau: “Cần tiếp tục mở rộng quy mô nuôi cấy và tối ưu quy trình sản xuất gypenoside trên hệ thống pilot nhằm đánh giá tính ổn định của sinh trưởng, khả năng tích lũy hoạt chất và tính khả thi của việc ứng dụng hệ nuôi cấy tế bào trong sản

	- Kiến nghị về việc nghiên cứu sinh tổng hợp flavonoid chưa thực sự gắn chặt với các kết quả chính của luận án, do nghiên cứu hiện tại chủ yếu tập trung vào nhóm hợp chất gypenoside.	xuất nguồn nguyên liệu dược liệu.” - NCS đã chỉnh sửa lại kiến nghị thứ hai như sau: “Nghiên cứu chức năng của các gene <i>CYP</i> và <i>UGT</i> tham gia con đường sinh tổng hợp gypenoside, kết hợp với các chiến lược xử lý elicitor và nuôi cấy quy mô lớn nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất gypenoside từ tế bào huyền phù <i>Giáo cổ lam</i>.”
--	---	--

Xác nhận của tập thể GVHD



PGS. TS. Trần Quốc Dung TS. Hoàng Tấn Quảng

Xác nhận của NCS



Đặng Ngọc Sáng

Xác nhận của Thư ký Hội đồng



TS. Nguyễn Bảo Hưng

Xác nhận của Chủ tịch Hội đồng



GS. TS Nguyễn Hoàng Lộc

Xác nhận của đơn vị đào tạo



PGS. TS. Trương Thị Hồng Hải