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

ĐẶNG NGỌC SÁNG

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

Ngành: Sinh học
Mã số: 9420101

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2026

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

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

Phản biện 1:
……
……
……
Phản biện 2:
……
……
……
Phản biện 3:
……
……
……

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

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

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

DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

[1]. Hoang Tan Quang, Pham Thi Diem Thi, Dang Ngoc Sang, Tran Thi Ngoc Tram, Nguyen Duc Huy, Tran Quoc Dung, Quach Thi Thu The (2022) Effects of plant elicitors on growth and gypenosides biosynthesis in cell culture of *Giao co lam* (*Gynostemma pentaphyllum*). *Molecules* 27(9): 2972.

[2]. Nguyen Thanh Tung, Pham Thi Diem Thi, Dang Ngoc Sang, Do Thi Thao, Hoang Tan Quang (2022) Biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino in cell suspension cultures inhibiting human cancer cell growth. Research Journal of Biotechnology 17(3): 61-68.

[3]. Tung Nguyen-Thanh, Sang Dang-Ngoc, Dung Tran-Quoc, Quang Hoang-Tan (2023) Gypenosides production and spermatogenesis recovery potentials of extracts from cell suspension cultures of *Gynostemma pentaphyllum*. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology* 15(4): 216-222. https://doi.org/10.18502/ajmb.v15i4.13491

[4]. Đặng Ngọc Sáng, Nguyễn Quang Hoàng Vũ, Nguyễn Thị Nguyên Mẫn, Nguyễn Hữu 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 giảo cổ lam (Gynoste*mma 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

MỞ ĐẦU

1. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

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

Do có vai trò tương tự nhân sâm, trong khi quá trình trồng dễ hơn và thời gian thu hoạch ngắn hơn so với nhân sâm, nên Giảo cổ lam được xem là nguồn dược liệu thay thế nhân sâm đầy triển vọng. Tuy nhiên, nguồn Giảo cổ lam trong tự nhiên đã và đang bị khai thác quá mức dẫn đến khan hiếm. Theo sách đỏ Việt Nam năm 2007, Giảo cổ lam được xếp vào nhóm nguy cấp (EN A1a, c, d).

Việc nghiên cứu để tạo ra nguồn nguyên liệu *in vitro* thay thế cây Giảo cổ lam tự nhiên là cần thiết. Nuôi cấy huyền phù tế bào được xem là giải pháp hiệu quả và đã được áp dụng thành công trên nhiều đối tượng khác nhau, nguyên liệu để nuôi cấy huyền phù chính là callus. Nuôi cấy tế bào huyền phù có nhiều lợi thế hơn so với khai thác cây tự nhiên như sản xuất các hợp chất thứ cấp có hoạt tính sinh học cao, chủ động trong cung cấp nguyên liệu, không bị nhiễm bẩn bởi thuốc trừ sâu, thuốc diệt cỏ, cần ít diện tích sản xuất, … . Một số tác giả trên thế giới đã nghiên cứu nuôi cấy callus cây Giảo cổ lam như Jala và cs (2012) hay Ao và cs (1998), tuy nhiên, các bước tiếp theo về nuôi cấy huyền phù tế bào cây này chưa được thực hiện.

Trong tự nhiên, thực vật sản xuất các hợp chất thứ cấp để chống lại các yếu tố gây bệnh. Elicitor kích thích quá trình hình thành các hợp chất

thứ cấp, bổ sung elicitor vào môi trường nuôi cấy là phương thức để thu được các sản phẩm hợp chất thứ cấp một cách hiệu quả nhất. Do đó, việc nuôi cấy tế bào cây Giảo cổ lam có sử dụng elicitor để thu nhận gypenoside hứa hẹn sẽ mang lại hiệu quả cao, thay thế dần cho việc khai thác cây Giảo cổ lam tự nhiên.

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

2. MỤC TIÊU CỦA NGHIÊN CỨU

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

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHẠM VI NGHIÊN CỨU

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

Phạm vi nghiên cứu

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

4. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

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

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

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

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

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

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

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

6. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

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

Sản xuất gypenoside thông qua nuôi cấy tế bào huyền phù có sử dụng elicitor. Khi sử dụng elicitor đơn lẻ thì hàm lượng gypenoside đạt cao nhất là 79,721 mg/g khô khi xử lý với 100 µM SA sau 6 ngày nuôi cấy, gấp khoảng 2 lần mẫu tự nhiên. Sử dụng phối hợp ecicitor thì kết quả tối ưu nhất khi kết hợp đồng thời cả ba loại elicitor cụ thể là: MeJA (50 µM), SA (100 µM) và YE (3 g/L), hàm lượng gypenoside thu được cao nhất đạt 103,810 mg/g khô và hàm lượng Rb1 đạt giá trị cao nhất là 0,127 mg/g khô.

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

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

CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

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

Vật liệu nghiên cứu:

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

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Nuôi cấy callus

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

2.2.2. Nuôi cấy tế bào huyền phù

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

Tế bào huyền phù được nuôi trong các bình tam giác 250 mL chứa 50 mL môi trường lỏng có thành phần giống như môi trường nuôi cấy callus tốt nhất (không có agar). Sinh khối tế bào được thu sau mỗi 2 ngày nuôi cấy để xác định khối lượng tươi và khối lượng khô.

2.2.2.2. Xác định hàm lượng gypenoside

Tách chiết gypenoside: Để xác định hàm lượng gypenoside trong mẫu, tế bào được sấy khô ở 50^{o}C đến khối lượng không đổi và tách chiết trong dung môi methanol 80% có sử dụng siêu âm ở 40^{o}C.

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

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

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

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

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

2.2.2.4. Thử nghiệm nuôi cấy trong bioreactor

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

2.2.3. Xử lý elicitor

2.2.3.1. Chuẩn bị elicitor

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

2.2.3.2. Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ elicitor

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

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

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

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

2.2.4.1. Tách chiết DNA tổng số và khuếch đại gen

DNA tổng số được tách chiết từ mẫu lá cây *in vitro* bằng kit TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Việt Nam). Phản ứng PCR được thực hiện với DNA tổng số là khuôn mẫu, sử dụng 12 cặp mồi đã được công bố bởi Zhang và cs (2021).

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

Trình tự nucleotide của sản phẩm PCR đại diện cho 2 nhóm *CYP* và *UGT* được phân tích trực tiếp bằng phương pháp Sanger.

2.2.4.3. Dự đoán đặc điểm và chức năng của enzyme

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

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

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

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

dẫn của nhà sản xuất.

2.2.5.2. Phân tích realtime-PCR

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

2.2.6. Chuẩn bị chế phẩm gypenoside

2.2.6.1. Chuẩn bị cao chiết Giảo cổ lam

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

2.2.6.2. Tinh chế gypenoside

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

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

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

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

Phân tích Tetrazolium (MTT)

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

2.2.8. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tinh hoàn chuột

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

Phương pháp xử lý stress nhiệt

Mỗi lần 10 phút, 2 lần mỗi ngày cách nhau 10 phút và 6 ngày mỗi tuần (nghỉ Chủ Nhật) trong 5 tuần liên tiếp.

Phương pháp xác định nồng độ testosterone

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

Nhuộm Hematoxylin và Eosin (H&E)

Kỹ thuật nhuộm Hematoxylin và Eosin được tiến hành gồm các

bước theo hướng dẫn quy trình kỹ thuật giải phẫu bệnh-tế bào học của Bộ Y tế.

2.2.9. Xử lý thống kê

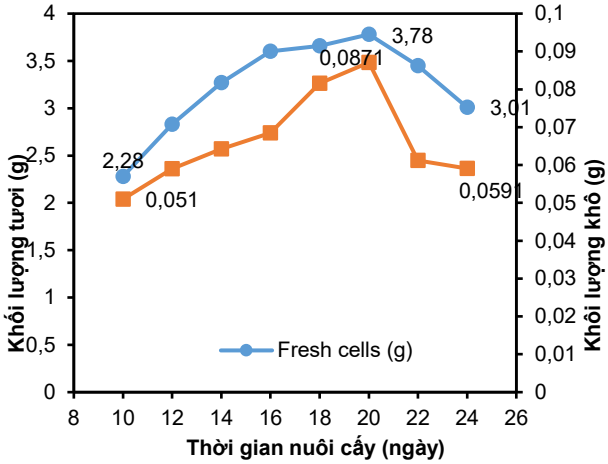
Các thí nghiệm nuôi cấy được bố trí ngẫu nhiên, mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả thí nghiệm được tính trung bình và phân tích ANOVA bằng Duncan's test với $p<0,05$ sử dụng phần mềm SPSS ver 20.0./.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

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

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

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



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

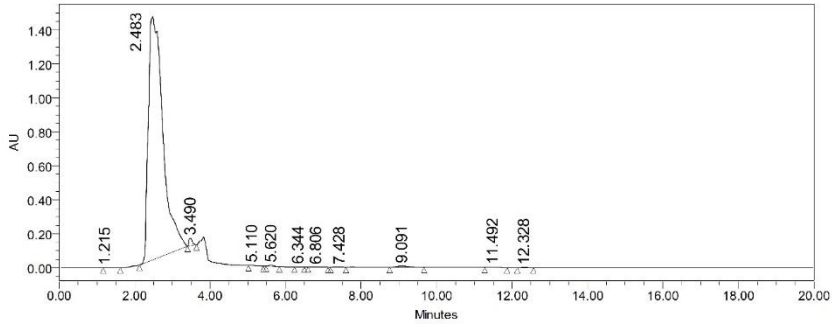
So với sinh trưởng của tế bào, sự tích lũy gypenoside trong tế bào Giảo cổ lam đạt cực đại sớm hơn từ 2-4 ngày. Khả năng tích lũy gypenoside

trong tế bào tăng dần từ ngày thứ 10 đến ngày thứ 16, ổn định trong khoảng ngày 16-18 sau đó giảm dần từ ngày thứ 20. Hàm lượng gypenoside thu được cao nhất là 42,122 mg/g vào ngày thứ 18 (sai khác không có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ 16) (Bảng 3.1). Trong khi đó, hàm lương Rb1 thu được cao nhất rơi vào khoảng ngày thứ 18-20 (khoảng 0,05 mg/g khô), chậm hơn so với tích lũy gypenoside tổng số khoảng 2 ngày.

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

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

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



Hình 3.2. Phổ HPLC mẫu tế bào

Như vậy, sự sinh tổng hợp gypenoside nói chung và Rb1 nói riêng đã diễn ra trong tế bào huyền phù cây Giảo cổ lam, trong đó hàm lượng gypenoside lẫn Rb1 trong tế bào đều cao hơn so với callus, tương đương với mẫu thân nhưng vẫn thấp hơn mẫu lá tự nhiên.

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

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

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

Đối với quá trình tích lũy gypenosdie, 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}

3.1.2.2. Ảnh hưởng của nguồn carbon

Kết quả trình bày ở bảng 3.3 cho thấy sucrose vẫn là nguồn carbon tốt nhất cho sinh trưởng (3,641 g tươi/bình) và tích lũy gypenoside của tế bào (39,845 mg gypenoside/ g khô), tiếp theo là glucose. Ở tất cả các nguồn carbon khác, tế bào đều sinh trưởng và tích lũy gypenoside không tốt bằng.

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

Nguồn Carbon	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
Sucrose	3,641[a]	0,157[a]	39,845[a]	0,037[a]
Glucose	3,247[b]	0,106[b]	22,349[d]	0,031[b]
Fructose	2,383[c]	0,095[b]	27,862[c]	0,030[b]
Galactose	2,795[c]	0,114[b]	15,033[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]

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

3.1.3.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ tiếp giống

Với lượng mẫu nuôi cấy ban đầu là 3 g, quá trình nuôi cấy cho hiệu quả cao nhất, khả năng sinh trưởng của tế bào tốt (khối lượng tươi đạt 5,392 g/bình) và tích lũy gypenoside cao (46,498 mg/g khô).

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

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

3.1.3.2. Ảnh hưởng của tốc độ lắc

Trong thí nghiệm của chúng tôi, tốc độ lắc 120 vòng/phút vẫn cho kết quả tốt nhất, các tốc độ lắc cao hơn hay thấp hơn đều không cho kết quả tốt bằng.

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

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

3.1.4. Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor

Trong 10 ngày đầu của quá trình nuôi cấy, sinh khối tươi của tế bào tăng chậm, chỉ đạt 38,860 g trong khi khối lượng đầu vào khoảng 37,221 g. Sau quá trình thích nghi ban đầu, sinh khối tế bào tăng nhanh trong những ngày tiếp theo, từ 38,860-45,611 g (1,341 - 1,792 g sinh khối khô); trong đó sinh khối đạt đỉnh ở ngày thứ 18.

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

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

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

Kết quả trình bày ở bảng 3.8 cho thấy YE là elicitor tốt nhất khi bổ sung vào thời điểm nuôi cấy ban đầu. Hàm lượng gypenoside tích lũy cao nhất khi 3 g/L YE được bổ sung vào môi trường nuôi cấy (73,767 mg/g chất khô), cao gấp khoảng 1,46 lần so với đối chứng.

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

Nồng độ (mM)	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	-	5,732^{a}	0,190^{a}	50,545^{d}	0,048^{cde}
25	MeJA	5,043^{bcd}	0,165^{bc}	54,546^{cd}	0,052^{bcd}
	SA	5,763^{a}	0,204^{a}	58,475^{bc}	0,060^{bc}
50	MeJA	5,003^{bcd}	0,163^{bc}	58,116^{bcd}	0,053^{bcd}
	SA	5,456^{ab}	0,163^{bc}	63,980^{b}	0,062^{b}
100	MeJA	4,876^{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}

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

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

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

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

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

Ngày xử lý	Elicitor	Khối lượng tươi (g)	Khối lượng khô (g)	Gypenoside (mg/g khô)	Rb1 (mg/g khô)
0	MeJA	4,968^{cde}	0,207^{fg}	57,852^{hi}	0,052^{g}
	SA	4,908^{cde}	0,148^{l}	76,480^{ab}	0,075^{c}
	YE	4,855^{e}	0,186^{i}	74,579^{bc}	0,061^{f}
3	MeJA	5,110^{bcde}	0,212^{ef}	65,633^{ef}	0,055^{ghi}
	SA	4,906^{de}	0,149^{l}	76,661^{ab}	0,088^{b}
	YE	4,980^{cde}	0,192^{h}	61,202^{gh}	0,056^{gh}
6	MeJA	5,168^{bcde}	0,216^{de}	73,461^{bc}	0,055^{ghi}
	SA	4,907^{bde}	0,157^{k}	79,721^{a}	0,093^{a}
	YE	5,041^{bcde}	0,204^{g}	57,543^{hi}	0,035^{k}
9	MeJA	5,302^{bc}	0,244^{b}	73,901^{bc}	0,066^{de}
	SA	5,025^{cde}	0,178^{j}	73,558^{bc}	0,063^{ef}
	YE	5,137^{bcde}	0,209^{f}	54,163^{ij}	0,031^{ij}
12	MeJA	5,254^{bcd}	0,229^{c}	68,622^{de}	0,067^{d}
	SA	5,259^{bcd}	0,211^{f}	70,547^{cd}	0,059^{fg}
	YE	5,424^{b}	0,221^{d}	51,321^{j}	0,027^{jk}
15	MeJA	5,018^{cde}	0,191^{hi}	60,814^{gh}	0,045^{j}
	SA	5,327^{bc}	0,221^{d}	62,628^{fg}	0,054^{ghi}
	YE	6,048^{a}	0,252^{a}	49,989^{j}	0,024^{k}

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

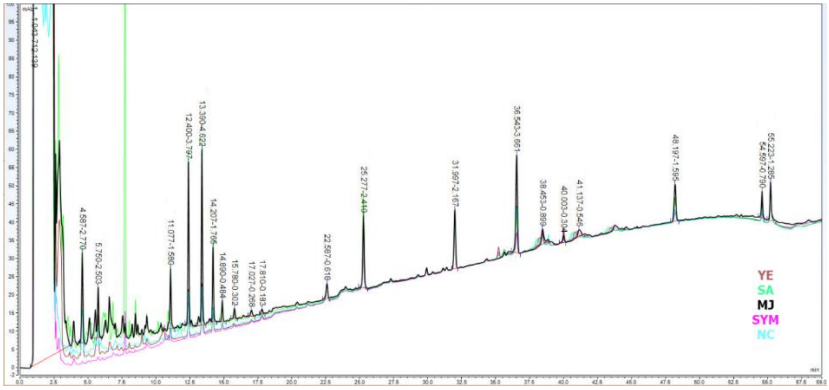
Công thức kết hợp tốt nhất (kết hợp cả 3 chất) cho lượng gypenoside đạt 103,810 mg/g khô, cao hơn khoảng 2,22 lần so với tế bào không được

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

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

Elicitor	Khối lượng tươi (g/bình)	Khối lượng khô (g/bình)	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}

Kết quả phân tích HPLC chồng phổ các mẫu thu được cho thấy khi xử lý SA (màu xanh lá), một số peak có đỉnh tăng cao, trong khi các peak còn lại tương đương so với các công thức xử lý khác (Hình 3.12). Kết quả phân tích cũng cho thấy có 24 peak gi nhận rõ ở các mẫu, trong đó xử lý MeJA thu được số peak nhiều nhất (21/24). Một số peak không ghi nhận ở đối chứng như các peak có thời gian lưu 7,73; 8,49; 15,78; 17,03; 17,81; 38,45 hay 40 phút, đây là các chất không xuất hiện hoặc xuất hiện dưới ngưỡng phát hiện, và được tăng cường tổng hợp trong các công thức có xử lý elicitor (Bảng 3.11).



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

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

Số peak	Thời gian lưu (phú)	Diện tích peak (%)				
		YE	**SA**	**MeJa**	**SYM**	**Đối chứng**
1	1,04	96,42	94,18	95,63	95,49	94,80
2	4,59	0,55	0,41	0,37	-	0,50
3	5,75	0,32	-	0,34	-	0,50
4	**7,73**	**-**	**2,01**	**-**	**0,34**	**-**
5	8,49	-	0,11	-	-	-
6	11,08	-	0,32	0,21	-	0,10
7	11,80	-	-	-	-	0,20
8	12,40	0,23	0,63	0,51	0,40	0,40
9	13,39	0,23	0,61	0,62	0,49	0,40
10	14,21	0,11	0,28	0,24	0,20	0,20
11	14,89	-	0,09	0,06	0,07	0,10
12	15,78	-	-	0,04	-	-
13	17,03	-	-	0,04	-	-
14	17,81	-	-	0,02	-	-
15	22,59	0,13	0,08	0,08	0,21	0,20
16	25,28	0,60	0,44	0,32	0,77	0,80
17	32,00	0,43	0,29	0,29	0,78	0,80
18	36,54	0,34	0,19	0,49	0,28	0,60
19	38,45	-	-	0,12	0,31	-
20	40,00	0,09	-	0,04	-	-
21	41,14	-	-	0,07	-	-
22	48,20	0,18	0,13	0,21	0,14	0,20
23	54,60	0,11	0,05	0,11	0,08	0,10
24	55,22	0,25	0,18	0,17	0,44	0,40

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Đối với các gen *CYP*, trong tế bào huyền phù các gen *CYP71B19, CYP86A8, CYP89A2* và *CYP 94A1* phiên mã mạnh, trong khi các gen còn lại không được phiên mã hoặc phiên mã rất yếu. Gen *CYP71B19* phiên mã mạnh

nhất khi xử lý SYM, tăng 6,14 lần so với đối chứng không xử lý elicitor. Trong khi đó, các gen khác tăng mức độ phiên mã lên nhiều lần khi được xử lý với MeJa. Gen *CYP86A8* tăng 8,25 lần so với đối chứng, gen *CYP94A1* tăng 10,01 lần và gen *CYP89A2* tăng 11,14 lần (Bảng 3.13).

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

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

Gen	Mẫu xử lý	Giá trị Ct		Giá trị 2-ΔΔCt
		GP-18S	Gen	
CYP71B19	YE	26,30	33,67	0,30
	SA	28,79	34,19	1,18
	MJ	32,43	36,09	3,95
	SYM	33,35	36,37	**6,14**
	NC	28,94	34,58	1,00
CYP77A3	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
CYP86A7	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
CYP86A8	YE	26,30	30,53	0,22
	SA	28,79	30,90	0,96
	MJ	32,43	31,44	**8,25**
	SYM	22,23	31,37	0,01
	NC	28,94	30,99	1,00
CYP89A2	YE	26,30	35,01	0,10
	SA	28,79	37,28	0,11

	MJ	32,43	34,27	**11,14**
	SYM	22,23	35,72	0,00
	NC	28,94	34,26	1,00
CYP90A1	YE	26,30	35,96	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	1,00
CYP94A1	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	37,64	0,38
	MJ	32,43	36,58	**10,01**
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	36,41	1,00

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

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

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

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

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

3.3.1. Sản xuất cao chiết và chế phẩm gypenoside

3.3.1.1. Sản xuất cao chiết

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

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

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

3.3.1.2. Sản xuất chế phẩm gypenoside

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

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

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

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

Ảnh hưởng của cao chiết đến dòng tế bào A549

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

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

Trong các dòng tế bào ung thư gan người, cao chiết tế bào và cao chiết tự nhiên ức chế sự tăng sinh của cả tế bào HepG2 và Huh7.

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

Cao chiết tế bào và cao chiết tự nhiên ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người ở hai nồng độ cao nhất, 100 và 200 µg/mL.

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

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào A549

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

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào HepG2 và Huh7

Thử nghiệm ở nồng độ 200 µg/mL cho thấy hoạt tính ức chế cao nhất trong mẫu chiết tự nhiên (42,30 ± 3,37 ở HepG2 và 42,17 ± 2,03 ở Huh7) cũng như trong mẫu huyền phù tế bào (88,21 ± 4,87 ở HepG2 và 63,11 ± 3,12 ở Huh7).

Ảnh hưởng của gypenoside đến dòng tế bào HL-60

Mẫu tế bào và mẫu tự nhiên ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư bạch cầu ở người ở hai nồng độ cao nhất là 200 µg/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 µg/mL trong cả mẫu tự nhiên (37,80 ± 3,81) và mẫu tế bào (96,35 ± 3,48).

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

Nồng độ gypenoside (µg/mL)	Khả năng ức chế (%, M ± SD)	
	Mẫu tự nhiên	Mẫu tế bào
Tế bào ung thư phổi A549		
4	3,57 ± 1,48	5,48 ± 1,70
20	8,47 ± 1,70	8,57 ± 0,71
100	22,86 ± 1,28	53,78 ± 1,31*
200	33,76 ± 2,70	83,37 ± 5,04*
IC_{50}	> 200	94,07 ± 6,22
Tế bào ung thư gan HepG2		
4	8,45 ± 0,46	15,04 ± 0,50
20	15,54 ± 0,13	23,58 ± 2,83
100	36,75 ± 1,28	51,74 ± 1,24*
200	42,30 ± 3,37	88,21 ± 4,87*
IC_{50}	> 200	86,66 ± 2,22
Tế bào ung thư gan Huh7		
4	2,66 ± 0,12	1,53 ± 0,25
20	8,47 ± 0,49	11,03 ± 0,43
100	15,41 ± 0,49	42,66 ± 2,27*
200	42,17 ± 2,03	63,11 ± 3,12*
IC_{50}	> 200	136,99 ± 11,60
Tế bào ung thư bạch cầu HL-60		
4	5,44 ± 0,37	4,79 ± 0,18
20	10,82 ± 1,19	10,88 ± 1,75
100	17,42 ± 1,37	38,46 ± 2,47*
200	37,80 ± 3,81	96,35 ± 3,48*
IC_{50}	> 200	119,30 ± 5,45

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

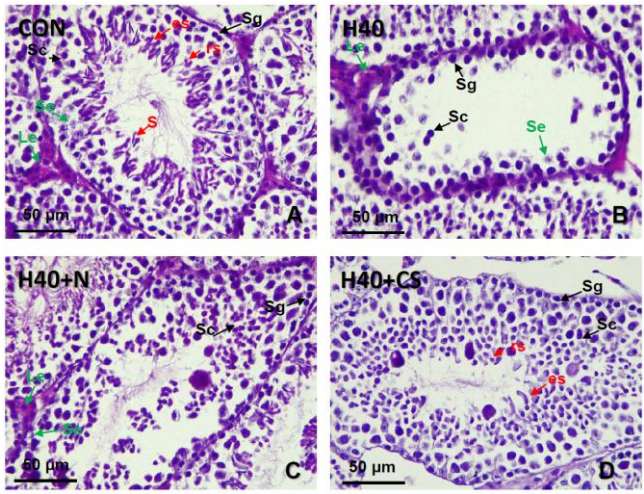
3.3.3. Thử nghiệm khả năng bảo vệ tế bào tinh hoàn của cao chiết

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

Dịch chiết từ tế bào Giáo 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 (Hình 3.21d).

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



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

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

Cao chiết của 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.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

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

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

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

4. Luận án đã thiết lập được quy trình làm giàu gypenoside từ cao chiết tổng số thông qua các bước khử tạp kém phân cực và kỵ nước, thu được phân đoạn giàu gypenoside hòa tan tốt trong methanol và DMSO, phù hợp cho phân tích HPLC và các thử nghiệm sinh học. Quy trình này tạo cơ sở cho các nghiên cứu chuẩn hóa và phát triển chế phẩm trong tương lai.

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

KIẾN NGHỊ

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

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

HUE UNIVERSITY
INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY
---o0o---

DANG NGOC SANG

INVESTIGATION OF THE PRODUCTION AND ACTIVITY DETERMINATION OF GYPENOSIDES FROM CELL CULTURES OF *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino

Major: Biology
Code: 9420101

DOCTORAL THESIS IN BIOLOGY

HUE, 2026

The project was completed at: Institute of Biotechnology, Hue University

Thesis Advisor: PGS.TS. Tran Quoc Dung
TS. Hoang Tan Quang

Reviewer 1:
……
……
……

Reviewer 2:
……
……
……

Reviewer 3:
……
……
……

The thesis will be defended at the Hue University Thesis Evaluation Council, meeting at Hue University, at …….

Thesis can be found at the following libraries:
1. National Library of Vietnam.
2. Hue University Learning Resource Center.
3. Library of Institute of Biotechnology, Hue University.

LIST OF PUBLISHED WORKS

[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]. Dang Ngoc Sang, Nguyen Quang Hoang Vu, Nguyen Thi Nguyen Man, Nguyen Huu Thuan Anh, Tran Quoc Dung, & Hoang Tan Quang. (2025). Isolation, characterization, and transcriptional analysis of the Cytochrome P450 (CYP89A2) gene from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino. *Proceedings of the 3rd National Conference on Plant Physiology – 2025* (pp. 79–86).

[5]. Dang Ngoc Sang, Pham Thi Diem Thi, Tran Thi Thoa, Tran Quoc Dung & Hoang Tan Quang (2025). Biomass and gypenoside production from cell cultures of *Gynostemma pentaphyllum*. *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, 134(3A), 119–129. https://doi.org/10.26459/hueunijard.v134i3A.7717

INTRODUCTION

1. RATIONALE OF THE STUDY

Gynostemma pentaphyllum (Thunb.) Makino is a medicinal plant of the Cucurbitaceae family, widely distributed in East and Southeast Asia, and known for diverse pharmacological activities such as hepatoprotective, antitumor, and anti-inflammatory effects, as well as regulation of glucose and lipid metabolism. Its major bioactive constituents, gypenosides, are dammarane-type triterpenoid saponins derived from the isoprenoid pathway. Compared with *Panax ginseng*, *G. pentaphyllum* accumulates substantially higher levels of triterpenoid saponins and exhibits a faster growth rate, making it a promising and cost-effective alternative source of ginsenoside-like compounds.

To reduce dependence on wild resources, the development of in vitro production systems for *G. pentaphyllum* is necessary. Suspension cell culture, typically established from callus, is an effective platform for producing plant secondary metabolites. Moreover, elicitors are widely used to stimulate secondary metabolite biosynthesis and represent one of the most efficient strategies to enhance gypenoside accumulation. Therefore, elicitor-treated suspension cultures of *G. pentaphyllum* provide a sustainable and efficient approach for gypenoside production.

Based on the aforementioned practical considerations, we conducted the study entitled: ***"Investigation of the production and activity determination of gypenosides from cell cultures of Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino".**

2. RESEARCH OBJECTIVES

Establish a procedure for the production and isolation of gypenosides from suspension cell cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

3. OBJECTS AND SCOPE OF THE STUDY

Research Subject: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Scope of the Study

Time frame: from March 2021 to September 2025.

Research subjects: suspension cell cultures producing gypenosides from *G. pentaphyllum*, cancer cell lines, and mouse testes.

Research locations: Institute of Biotechnology, Hue University; Hue University of Medicine and Pharmacy; Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology.

4. RESEARCH CONTENTS

Content 1: Investigation of the effects of culture conditions on gypenoside accumulation in suspension cells.

Content 2: Investigation of the effects of elicitors on enhancing gypenoside production from suspension cultures.

Content 3: Investigation of the isolation process and bioactivity testing of gypenosides derived from suspension cells.

5. SCIENTIFIC AND PRACTICAL SIGNIFICANCE OF THE STUDY

Scientific significance:

The results of this study will provide new scientific evidence on the potential for gypenoside production through suspension cell cultures of *Gynostemma pentaphyllum* under elicitor treatment. It will also generate data on the transcriptional levels of genes involved in the gypenoside biosynthetic pathway in suspension cells, as well as the anticancer potential of gypenosides.

Practical significance:

The findings will serve as a valuable source of information and reference for the application of suspension cell culture techniques, gene expression analysis, and the evaluation of gypenoside bioactivity against cancer cell lines.

6. NOVEL CONTRIBUTIONS OF THE DISSERTATION

6.1. For the first time, a protocol for establishing suspension cell cultures of *Gynostemma pentaphyllum* has been developed. The culture conditions for *G. pentaphyllum* suspension cells in Erlenmeyer flasks consisted of liquid basal MS medium supplemented with 2.0 mg/L kinetin (KIN) and 0.5 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), with an inoculation ratio of 3 g per 50 mL medium, maintained under shaking at 120 rpm.

6.2. For the first time, a protocol for gypenoside production through suspension cell culture with elicitor treatment has been established. The highest gypenoside content was recorded at 79.721 mg/g dry weight when treated with 100 μM salicylic acid (SA) after six days of culture, approximately twice the level found in natural samples. When combining the optimal elicitor concentrations of MeJA (50 μM), SA (100 μM), and YE (3 g/L), the maximum gypenoside content reached 103.810 mg/g dry weight.

6.3. The transcriptional levels of 12 genes involved in the gypenoside biosynthetic pathway in *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells

were evaluated under the influence of different elicitors. Among them, CYP86A8 increased 8.25-fold, CYP94A1 increased 10.01-fold, and CYP89A2 increased 11.14-fold compared with the control when treated with MeJA. The UGT73B4 gene exhibited the strongest transcriptional activation under SYM treatment, with a 15.35-fold increase relative to the control.

6.4. For the first time, the protective effects of *Gynostemma pentaphyllum* cell extract on mouse testicular cells have been reported. The extract derived from suspension cell cultures of *G. pentaphyllum* demonstrated the ability to protect testicular cells, enhance spermatogenesis, and increase testosterone levels in heat-stressed mice.

CHAPTER 2. MATERIALS AND METHODS

2.1. MATERIALS

Research subject: *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino.

Experimental materials:

- Suspension cells of *G. pentaphyllum*.
- Gypenosides derived from suspension cells.
- Cancer cell lines including hepatocellular carcinoma(HepG2, Huh7), lung carcinoma (A549), and leukemia (HL-60) cells.

2.2. METHODS

2.2.1. Callus culture

Callus was maintained on basal MS medium supplemented with 3% sucrose, 0.8% agar, 2.0 mg/L kinetin (KIN), and 0.5 mg/L indole-3-butyric acid (IBA), adjusted to pH 5.8.

2.2.2. Suspension cell culture

2.2.2.1. Establishment of growth curve and gypenoside accumulation

Suspension cells were cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of liquid medium with the same composition as the optimized callus culture medium (without agar). Cell biomass was harvested every two days of culture to determine fresh weight and dry weight.

2.2.2.2. Determination of gypenoside content

Extraction of gypenosides: To determine the gypenoside content in samples, cells were dried at 50 °C to constant weight and extracted with 80% methanol using ultrasonic treatment at 40 °C.

Determination of gypenoside content: The total gypenoside content was quantified by the vanillin colorimetric method. The colorimetric reaction was measured using a spectrophotometer at 544

nm.

Determination of Rb1 content: HPLC analysis was carried out on an Alliance E2695 system equipped with a Symmetry® C18 column (4.6 mm × 250 mm × 5 µm). The mobile phase consisted of water and acetonitrile (34%) over a 20-minute run, with a column temperature of 30 °C, a flow rate of 0.8 mL/min, and an injection volume of 20 µL.

2.2.2.3. Effects of medium composition and culture conditions on cell growth

- Plant growth regulators: combinations of cytokinins (BAP and KIN) and auxin (IBA).
- Carbon sources: sucrose, glucose, fructose, galactose, lactose, and glycerol.
- Inoculum size: different initial inoculum sizes ranging from 4% to 8%.
- Shaking speed: various agitation rates (100, 120, and 150 rpm).

2.2.3.4. Bioreactor culture experiment

The LiFlux GX system (Hanil, Korea) was used with a working culture volume of 6 liters. The inoculation ratio was 10% (v/v), and agitation was maintained at 150 rpm. All other parameters were set at default conditions.

2.2.3. Elicitor treatment

2.2.3.1. Preparation of elicitors

The elicitors used in this study included MeJA, SA, YE, and *Fusarium* (Fox) biomass.

2.2.3.2. Evaluation of elicitor concentration effects

The effects of elicitor concentrations were assessed by supplementing each elicitor individually into the medium at different concentrations at the beginning of the culture. Specifically, MeJA and SA were applied at concentrations ranging from 25 to 200 µM, while YE and Fox biomass were applied at concentrations from 1 to 5 g/L. The control treatment consisted of cultures without elicitor supplementation.

2.2.3.3. Evaluation of elicitor application timing

Elicitors were added to the medium at different culture times ranging from day 3 to day 15. The control treatment consisted of elicitor supplementation at the initial time of culture.

2.2.4. Characterization of selected CYP and UGT genes

2.2.4.1. Total DNA extraction and gene amplification

Total genomic DNA was extracted from in vitro leaf samples using the TopPURE Plant DNA Extraction Kit (ABT, Vietnam). PCR reactions were carried out using total DNA as the template and 12 primer pairs previously reported by Zhang et al. (2021).

2.2.4.2. Gene sequencing and phylogenetic tree construction

The nucleotide sequences of PCR products representing two groups of CYP and UGT genes were directly analyzed using the Sanger sequencing method.

2.2.4.3. Prediction of enzyme characteristics and functions

The structural characteristics and potential functions of representative CYP and UGT enzymes were predicted using bioinformatics tools.

2.2.5. Determination of transcriptional levels of CYP and UGT genes

2.2.5.1. Total RNA extraction and first-strand cDNA synthesis

Total RNA was extracted from cultured cells using the GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Scientific, USA). First-strand cDNA was synthesized using the First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1612, Fermentas) according to the manufacturer's instructions.

2.2.5.2. Real-time PCR analysis

To evaluate the transcriptional levels of CYP and UGT genes, real-time PCR reactions were performed with gene-specific primers, using 18S rRNA as the internal reference (housekeeping gene).

2.2.6. Preparation of gypenoside extracts

2.2.6.1. Preparation of Gynostemma pentaphyllum crude extract

After extraction, the crude extract was evaporated to dryness and subsequently re-dissolved to the desired concentrations.

2.2.6.2. Purification of gypenosides

The extraction and purification procedure was performed according to Liang et al. (2014), with modifications adapted to laboratory conditions.

2.2.7. Evaluation of anticancer activity

2.2.7.1. Sulforhodamine B (SRB) assay

Cytotoxicity was analyzed using the sulforhodamine B staining method, as described by Vajrabhaya et al. (2018).

2.2.7.2. Tetrazolium (MTT) assay

The effect of *G. pentaphyllum* extracts on the growth and

proliferation of HL-60 leukemia cells was evaluated using the MTT assay.

2.2.8. Evaluation of the protective effects on mouse testes

Mice were randomly assigned to experimental groups: a control group (10 mice) maintained at 25°C, a heat-stress group exposed to 40°C (H40, 10 mice), a heat-stress group administered natural *Gynostemma pentaphyllum* extract at 200 mg/kg (H40+N), and a heat-stress group administered *G. pentaphyllum* suspension cell extract at 200 mg/kg (H40+CS).

Heat stress treatment protocol

Heat stress was applied at 40 °C for 10 minutes, twice per day with a 10-minute interval, six days per week (with rest on Sundays) for a total of five consecutive weeks.

Determination of testosterone concentration

Plasma testosterone levels were measured using ELISA on an automated immunoassay analyzer (Cobas e411, ROCHE).

Hematoxylin and Eosin (H&E) staining

Histological evaluation was performed using the Hematoxylin and Eosin staining method, following the technical guidelines for histopathology and cytology issued by the Ministry of Health.

2.2.9. Statistical analysis

The culture experiments were arranged in a completely randomized design, with each experiment repeated three times. Experimental results were expressed as mean values and analyzed using ANOVA followed by Duncan's test at $p < 0.05$, performed with SPSS software version 20.0./.

CHAPTER 3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. EFFECTS OF CULTURE CONDITIONS ON GYPENOSIDE ACCUMULATION IN SUSPENSION CELLS

3.1.1. Establishment of the growth curve and gypenoside accumulation

From the beginning of culture until day 10, cell growth was minimal, with biomass increasing only from 2 g to 2.280 g. Subsequently, cell biomass increased continuously from day 10 to day 20, reaching a maximum of 3.780 g fresh weight per flask, corresponding to 0.087 g dry weight per flask, with a growth index of 1.89 after 20 days of culture (Figure 3.1). After reaching this peak, the biomass declined steadily, and by day 24 only 3.010 g fresh weight (0.059 g dry weight) was obtained, with a growth index of 1.51.

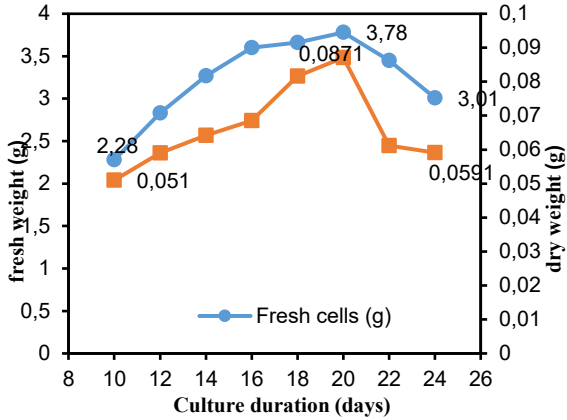


Figure 3.1. Growth curve of suspension cells

Compared with cell growth, gypenoside accumulation in *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells reached its maximum 2–4 days earlier. The accumulation capacity gradually increased from day 10 to day 16, remained stable between days 16–18, and then declined from day 20 onwards. The highest gypenoside content obtained was 42.122 mg/g on day 18 (not significantly different from day 16) (Table 3.1). In contrast, the maximum Rb1 content was observed between days 18–20 (approximately 0.05 mg/g dry weight), which was about two days later than the peak of total gypenoside accumulation.

Table 3.1. Effects of culture duration on cell growth and gypenoside accumulation

Culture duration (days)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
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}

Based on the accumulation of fresh biomass, dry biomass, total gypenoside content, and Rb1 levels, day 18 was selected as the optimal harvesting time point, as it ensured both high biomass yield and elevated accumulation of the target compounds.

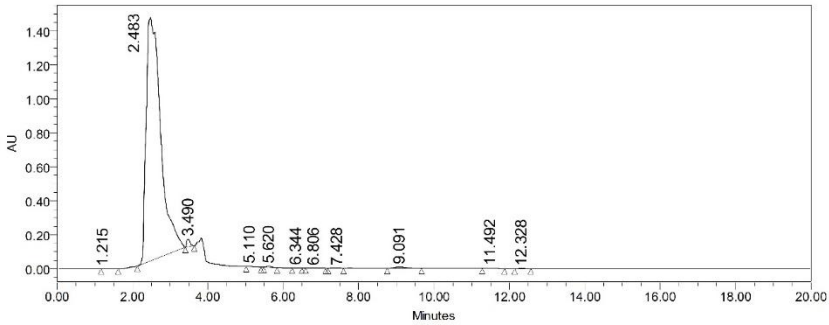


Figure 3.2. HPLC chromatogram of cell samples

Thus, the biosynthesis of gypenosides in general, and Rb1 in particular, occurred in the suspension cells of *Gynostemma pentaphyllum*. The levels of both total gypenosides and Rb1 in suspension cells were higher than those in callus, comparable to stem samples, but still lower than those in natural leaves.

3.1.2. Effects of culture medium on gypenoside accumulation in suspension cells

3.1.2.1. Effects of combinations of plant growth regulators

In terms of biomass production, two media yielded the highest biomass after 18 days of culture: the medium supplemented with 2.5 mg/L BAP combined with 0.5 mg/L IBA (3.501 g fresh weight per flask), and the medium containing 2 mg/L KIN combined with 0.5 mg/L IBA (3.693 g fresh weight per flask). Other media resulted in lower biomass yields.

Regarding gypenoside accumulation, media containing KIN and IBA were more effective than those containing BAP and IBA. Among them, KIN concentrations ranging from 1.5 to 2 mg/L resulted in the highest gypenoside contents (40–41 mg/g dry weight). The highest Rb1 content was obtained in the medium supplemented with 2 mg/L KIN and 0.5 mg/L IBA (0.041 mg/g dry weight).

Table 3.2. Effects of BAP or KIN in combination with 0.5 mg/L IBA on cell growth and gypenoside accumulation

BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
1	-	3,203^{b}	0,149^{ab}	26,360^{d}	0,025^{d}
1,5	-	2,822^{c}	0,120^{c}	34,601^{b}	0,043^{b}
2	-	2,997^{bc}	0,138^{b}	34,932^{b}	0,049^{a}

2,5	-	3,501[a]	0,161[a]	35,850[b]	0,048[a]
3	-	2,732[c]	0,113	25,053[d]	0,019[e]
-	1	2,573[cd]	0,121[c]	23,287[d]	0,025[d]
-	1,5	2,860[c]	0,118[c]	40,900[a]	0,034[c]
-	2	3,693[a]	0,157[a]	40,240[a]	0,041[b]
-	2,5	3,274[b]	0,144[ab]	31,733[c]	0,032[c]
-	3	2,369[d]	0,095[d]	24,190[d]	0,013[f]

3.1.2.2. Effects of carbon sources

The results presented in Table 3.3 show that sucrose remained the most effective carbon source for both cell growth (3.641 g fresh weight per flask) and gypenoside accumulation (39.845 mg gypenoside/g dry weight), followed by glucose. For all other tested carbon sources, both cell growth and gypenoside accumulation were less efficient.

Table 3.3. Effects of carbon sources on cell growth and gypenoside accumulation

Carbon source	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
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]

3.1.3.1. Effects of inoculation ratio

With an initial inoculum of 3 g, the culture process yielded the best results, with good cell growth (5.392 g fresh weight per flask) and high gypenoside accumulation (46.498 mg/g dry weight).

Table 3.4. Effects of inoculum size on cell growth and gypenoside accumulation

Inoculum size (g)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
2	3,661[b]	0,082[b]	42,876[b]	0,049[a]
3	5,392[a]	0,128[a]	46,498[a]	0,038[b]
4	5,430[a]	0,130[a]	34,520[c]	0,021[c]

3.1.3.2. Effects of shaking speed

In our experiments, the shaking speed of 120 rpm yielded the best results, while both higher and lower shaking speeds were less effective.

Table 3.5. Effects of shaking speed on cell growth and gypenoside accumulation

Shaking speed (rpm)	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flash)	Rb1 (mg/g dry)	Gypenoside (mg/g dry)
100	3,462[c]	0,066[b]	-	13,542[c]
120	5,430[a]	0,131[a]	0,039[a]	46,870[a]
150	4,521[b]	0,049[b]	0,022[b]	38,041[b]

3.1.4. Suspension cell culture in a bioreactor

During the first 10 days of culture, the fresh biomass of cells increased slowly, reaching only 38.860 g compared with the initial inoculum of approximately 37.221 g. After this initial adaptation phase, cell biomass increased rapidly in the following days, from 38.860 g to 45.611 g (corresponding to 1.341–1.792 g dry biomass), with the maximum biomass observed on day 18.

3.2. EFFECTS OF ELICITORS ON ENHANCING GYPENOSIDE PRODUCTION IN SUSPENSION CULTURES

3.2.1. Effects of elicitor concentrations on cell growth and gypenoside accumulation

The results presented in Table 3.7 show that all concentrations of MeJA inhibited cell growth, with dry biomass ranging from 0.063 to 0.118 g per flask (compared with 0.190 g per flask in the control). Relative to the control, gypenoside content increased when 25–100 µM MeJA was added, with the highest level observed at 50 µM (58.116 mg/g dry weight). In cells treated with SA, biomass accumulation decreased, but the highest gypenoside content was recorded at 100 µM SA (76.809 mg/g dry weight), approximately 1.52-fold higher than the untreated control.

The results presented in Table 3.8 demonstrate that YE was the most effective elicitor when added at the initial stage of culture. The highest gypenoside content was achieved when 3 g/L YE was supplemented into the medium (73.767 mg/g dry weight), approximately 1.46-fold

higher than the control.

Table 3.6. Effects of MeJA and SA on cell growth and gypenoside accumulation

Concentration (mM)	Elicitor	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
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}

Table 3.7. Effects of YE and Fox on cell growth and gypenoside accumulation

Concentration (g/L)	Elicitor	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
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}

3.2.2. Effects of elicitor application timing on cell growth and gypenoside accumulation

SA treatment was most effective when added to the medium on day 6, yielding a gypenoside content of 79.721 mg/g dry weight. This value was 1.58-fold higher than the untreated control, 1.4-fold higher than stem samples, and twice as high as natural leaf samples.

Table 3.8 . Effects of elicitor application timing on cell growth and gypenoside accumulation

Treatment timing	Elicitor	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
0	MeJA	4,968^{cde}	0,207^{fg}	57,852^{hi}	0,052^{g}
	SA	4,908^{cde}	0,148^{l}	76,480^{ab}	0,075^{c}
	YE	4,855^{e}	0,186^{i}	74,579^{bc}	0,061^{f}
3	MeJA	5,110^{bcde}	0,212^{ef}	65,633^{ef}	0,055^{ghi}
	SA	4,906^{de}	0,149^{l}	76,661^{ab}	0,088^{b}
	YE	4,980^{cde}	0,192^{h}	61,202^{gh}	0,056^{gh}
6	MeJA	5,168^{bcde}	0,216^{de}	73,461^{bc}	0,055^{ghi}
	SA	4,907^{bde}	0,157^{k}	79,721^{a}	0,093^{a}
	YE	5,041^{bcde}	0,204^{g}	57,543^{hi}	0,035^{k}
9	MeJA	5,302^{bc}	0,244^{b}	73,901^{bc}	0,066^{de}
	SA	5,025^{cde}	0,178^{j}	73,558^{bc}	0,063^{ef}
	YE	5,137^{bcde}	0,209^{f}	54,163^{ij}	0,031^{ij}
12	MeJA	5,254^{bcd}	0,229^{c}	68,622^{de}	0,067^{d}
	SA	5,259^{bcd}	0,211^{f}	70,547^{cd}	0,059^{fg}
	YE	5,424^{b}	0,221^{d}	51,321^{j}	0,027^{jk}
15	MeJA	5,018^{cde}	0,191^{hi}	60,814^{gh}	0,045^{j}
	SA	5,327^{bc}	0,221^{d}	62,628^{fg}	0,054^{ghi}
	YE	6,048^{a}	0,252^{a}	49,989^{j}	0,024^{k}

3.2.3. Effects of combined elicitors on cell growth and gypenoside accumulation

The optimal combination (including all three elicitors) resulted in a gypenoside content of 103.810 mg/g dry weight, which was approximately 2.22-fold higher than untreated cells and about 2.78-fold higher than natural samples.

Table 3.10. Effects of combined elicitors on cell growth and gypenoside accumulation

Elicitor	Fresh weight (g/flask)	Dry weight (g/flask)	Gypenoside (mg/g dry)	Rb1 (mg/g dry)
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}

HPLC overlay analysis of the obtained samples revealed that under SA treatment (green line), several peaks exhibited increased intensities, while other peaks remained comparable to those observed in different treatment conditions (Figure 3.12). The analysis also indicated that a total of 24 peaks were clearly detected across all samples, with MeJA treatment yielding the highest number of peaks (21/24). Certain peaks, with retention times of 7.73; 8.49; 15.78; 17.03; 17.81; 38.45, and 40 minutes, were absent in the control but appeared or were enhanced in elicitor-treated samples. These compounds were either undetectable or below the detection limit in untreated cells and were induced upon elicitor application (Table 3.11).

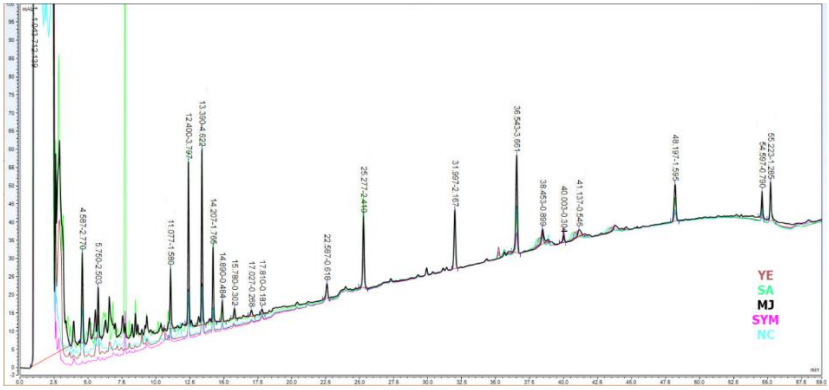


Figure 3.12. HPLC chromatogram of *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells

Table 3.11. Major gypenoside peaks in *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells

Number of peaks	Retention time (min)	Peak area (%)				
		YE	SA	MeJa	SYM	Control
1	1,04	96,42	94,18	95,63	95,49	94,80
2	4,59	0,55	0,41	0,37	-	0,50
3	5,75	0,32	-	0,34	-	0,50
4	**7,73**	**-**	**2,01**	**-**	**0,34**	**-**
5	8,49	-	0,11	-	-	-
6	11,08	-	0,32	0,21	-	0,10

7	11,80	-	-	-	-	0,20
8	12,40	0,23	0,63	0,51	0,40	0,40
9	13,39	0,23	0,61	0,62	0,49	0,40
10	14,21	0,11	0,28	0,24	0,20	0,20
11	14,89	-	0,09	0,06	0,07	0,10
12	15,78	-	-	0,04	-	-
13	17,03	-	-	0,04	-	-
14	17,81	-	-	0,02	-	-
15	22,59	0,13	0,08	0,08	0,21	0,20
16	25,28	0,60	0,44	0,32	0,77	0,80
17	32,00	0,43	0,29	0,29	0,78	0,80
18	36,54	0,34	0,19	0,49	0,28	0,60
19	38,45	-	-	0,12	0,31	-
20	40,00	0,09	-	0,04	-	-
21	41,14	-	-	0,07	-	-
22	48,20	0,18	0,13	0,21	0,14	0,20
23	54,60	0,11	0,05	0,11	0,08	0,10
24	55,22	0,25	0,18	0,17	0,44	0,40

3.2.4. Determination of CYP and UGT gene expression levels in suspension cells

3.2.4.1. Isolation and characterization of CYP and UGT genes

Screening with gene-specific primers for 12 genes described by Zhang et al. (2021) showed that 4 out of 7 CYP genes and 1 out of 5 UGT genes produced specific amplification products. Among them, CYP89A2 and UGT91A1 exhibited the strongest amplification. The PCR product of the CYP89A2 gene (CpQN) showed 99.17% sequence similarity to the CYP89A2 mRNA sequence of *Gynostemma pentaphyllum* (accession no. MT416753), whereas the UGT91A1-QN gene from *G. pentaphyllum* (Quang Nam) showed only 92.55% similarity compared with the reference sequence (accession no. MN128698).

3.2.4.2. Prediction of three-dimensional structure and physicochemical properties of enzymes

The prediction results indicated that the CYP89A2 protein shared 26% structural similarity with sugiol synthase (CYP76AH3) from *Salvia*

miltiorrhiza. The UGT91A1-QN enzyme showed 40% structural similarity with glycosyltransferase OsUGT91C1 (apo form) from *Oryza sativa* subsp. *japonica* (Table 3.12).

Table 3.12. Predicted three-dimensional structure and physicochemical properties of enzymes

Characteristic	CYP89A2	UGT91A1-QN
Full-length gene (bp)	-	1.460
cDNA	1.521	1.383
Polypeptide chain	506 aa	460 aa
Molecular weight (kDa)	58,44	52,786
Isoelectric point (pI)	7,06	5,66
Tm	55°C~65°C	55°C~65°C
Acid/base	base	base
Domain	PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding, ClpB_D2_small và MoCF_biosynth	UDPGT (224-443)
α helix	15	16
β strain	8	15

3.2.4.3. Determination of transcriptional levels of CYP and UGT genes

For CYP genes in suspension cells, CYP71B19, CYP86A8, CYP89A2, and CYP94A1 were strongly transcribed, whereas the remaining genes were either not transcribed or expressed at very low levels. Among them, CYP71B19 exhibited the highest transcriptional activation under SYM treatment, showing a 6.14-fold increase compared with the untreated control. In contrast, other genes displayed substantial transcriptional induction in response to MeJA treatment: CYP86A8 increased 8.25-fold, CYP94A1 increased 10.01-fold, and CYP89A2 increased 11.14-fold (Table 3.13).

Regarding UGT genes in suspension cells, only UGT73B4 showed strong transcription, while the others were not transcribed (undetectable). UGT73B4 exhibited the highest transcriptional activation under SYM treatment, with a 15.35-fold increase compared with the untreated control (Table 3.14).

Table 3.13. Expression levels of CYP genes in suspension cells of *Gynostemma pentaphyllum*

Gene	Treated sample	Ct value		2-ΔΔCt value
		GP-18S	Gene	

CYP71B19	YE	26,30	33,67	0,30
	SA	28,79	34,19	1,18
	MJ	32,43	36,09	3,95
	SYM	33,35	36,37	**6,14**
	NC	28,94	34,58	1,00
CYP77A3	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
CYP86A7	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
CYP86A8	YE	26,30	30,53	0,22
	SA	28,79	30,90	0,96
	MJ	32,43	31,44	**8,25**
	SYM	22,23	31,37	0,01
	NC	28,94	30,99	1,00
CYP89A2	YE	26,30	35,01	0,10
	SA	28,79	37,28	0,11
	MJ	32,43	34,27	**11,14**
	SYM	22,23	35,72	0,00
	NC	28,94	34,26	1,00
CYP90A1	YE	26,30	35,96	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	1,00
CYP94A1	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	37,64	0,38
	MJ	32,43	36,58	**10,01**
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	36,41	1,00

"-": not detected. MeJA: treatment with methyl jasmonate; SA: treatment with salicylic acid; YE: treatment with yeast extract; SYM: combined treatment with all three elicitors; NC: negative control without elicitor treatment.

Table 3.14. Expression levels of UGT genes in *Gynostemma pentaphyllum* suspension cells

Gene	Treated sample	Ct value		2-ΔΔCt value
		GP-18S	Gene	
UGT76B1	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
UGT74F2	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	-	-
UGT73B4	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	39,53	0,04
	MJ	32,43	36,17	5,38
	SYM	33,35	35,57	**15,35**
	NC	28,94	35,11	1,00
UGT91A1	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	33,35	-	-
	NC	28,94	35,61	1,00
UGT91C1	YE	26,30	-	-
	SA	28,79	-	-
	MJ	32,43	-	-
	SYM	22,23	-	-
	NC	28,94	34,72	1,00

3.3. ISOLATION AND BIOACTIVITY ASSAY OF GYPENOSIDES FROM SUSPENSION CELLS

3.3.1. Preparation of extracts and gypenoside preparations

3.3.1.1. Preparation of extracts

The extracts were analyzed for gypenoside content using spectrophotometric methods and for Rb1 content using HPLC. The gypenoside content presented in Table 3.15 shows that the suspension cell extract contained 472.159 mg/g dry weight, which was higher than that of the natural extract at 369.489 mg/g dry weight. These extracts were subsequently used in further experiments to evaluate bioactivity.

Table 3.15. Accumulation of gypenosides in *Gynostemma pentaphyllum* extracts

Sample	Nature	Cell suspension
Gypenoside in dry biomass (mg/g)	37,270 ± 4,710	48,844 ± 3,933
Rb1 in dry biomass (mg/g)	0,072 ± 0,021	0,041 ± 0,004
Gypenoside in extract (mg/g dry)	369,489 ± 25,317	472,159 ± 59,098
Rb1 in extract (mg/g dry)	0,697 ± 0,081	0,394 ± 0,021

3.3.1.2. Preparation of gypenoside preparations

To produce gypenoside preparations, *Gynostemma pentaphyllum* cells were cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture medium (294 flasks, divided into 7 culture batches). A combined elicitor treatment consisting of MeJA (50 µM), SA (100 µM), and YE (3 g/L) was added on the 6th day of culture. After extraction of the dried biomass with 80% methanol, 11.13 g of crude extract was obtained. This extract was further purified to yield approximately 5.2 g of gypenosides, which were subsequently used to evaluate cytotoxic activity.

3.3.2. Cytotoxic activity assays against cancer cells

3.3.2.1. Cytotoxic activity of crude extracts

Effect of extracts on A549 cells

The *Gynostemma pentaphyllum* extracts exhibited dose-dependent inhibition of A549 cell proliferation. However, the inhibitory effect on A549 cells was not strong.

Effect of extracts on HepG2 and Huh7 cells

In human liver cancer cell lines, both suspension cell extracts and natural extracts inhibited the proliferation of HepG2 and Huh7 cells.

Effect of extracts on HL-60 cells

Both suspension cell extracts and natural extracts inhibited the proliferation of human leukemia HL-60 cells at the two highest concentrations, 100 and 200 µg/mL.

3.3.2.2. Cytotoxic activity of gypenosides

Effect of gypenosides on A549 cells

At the highest concentration tested (200 µg/mL), the inhibitory effect reached 83.37 ± 5.04% for the suspension cell sample and 33.76 ± 2.70% for the natural extract.

Effect of gypenosides on HepG2 and Huh7 cells

At 200 µg/mL, the natural extract showed maximal inhibitory

activity (42.30 ± 3.37% for HepG2 and 42.17 ± 2.03% for Huh7), whereas the suspension cell extract exhibited significantly stronger inhibition (88.21 ± 4.87% for HepG2 and 63.11 ± 3.12% for Huh7).

Effect of gypenosides on HL-60 cells

Both the natural and suspension cell extracts inhibited the proliferation of human leukemia HL-60 cells at the highest tested concentration of 200 µg/mL, with a statistically significant difference between the two samples. The proliferation of HL-60 cells was markedly suppressed by *G. pentaphyllum* gypenosides at 200 µg/mL, reaching 37.80 ± 3.81% inhibition for the natural extract and 96.35 ± 3.48% for the suspension cell extract.

Table 3.17. Inhibitory effects of gypenosides on cancer cell lines

Concentration gypenoside (µg/mL)	Inhibitory activity (%, M ± SD)	
	Natural sample	Suspension cell sample
A549 lung cancer cells		
4	3,57 ± 1,48	5,48 ± 1,70
20	8,47 ± 1,70	8,57 ± 0,71
100	22,86 ± 1,28	53,78 ± 1,31*
200	33,76 ± 2,70	83,37 ± 5,04*
IC_{50}	> 200	94,07 ± 6,22
HepG2 liver cancer cells		
4	8,45 ± 0,46	15,04 ± 0,50
20	15,54 ± 0,13	23,58 ± 2,83
100	36,75 ± 1,28	51,74 ± 1,24*
200	42,30 ± 3,37	88,21 ± 4,87*
IC_{50}	> 200	86,66 ± 2,22
Huh7 liver cancer cells		
4	2,66 ± 0,12	1,53 ± 0,25
20	8,47 ± 0,49	11,03 ± 0,43
100	15,41 ± 0,49	42,66 ± 2,27*
200	42,17 ± 2,03	63,11 ± 3,12*
IC_{50}	> 200	136,99 ± 11,60
HL-60 human promyelocytic leukemia cells		
4	5,44 ± 0,37	4,79 ± 0,18
20	10,82 ± 1,19	10,88 ± 1,75
100	17,42 ± 1,37	38,46 ± 2,47*
200	37,80 ± 3,81	96,35 ± 3,48*
IC_{50}	> 200	119,30 ± 5,45

**Statistically significant difference at $P < 0.05$.*

3.3.3. Evaluation of the protective effects of extracts on testicular cells

3.3.3.1. Effects of the extract on the improvement of spermatogenesis

The extract derived from suspension-cultured *Gynostemma pentaphyllum* cells significantly improved spermatogenesis occurring within the seminiferous tubules. The number of germ cells present in the lumen of the seminiferous tubules markedly increased (Figure 3.21d).

In the heat-treated mouse group, those administered the suspension-cultured *G. pentaphyllum* extract exhibited a serum testosterone concentration of 3.19 ± 2.65 ng/mL, which was higher than that observed in the heat-treated group administered the natural plant extract (1.57 ± 0.89 ng/mL).

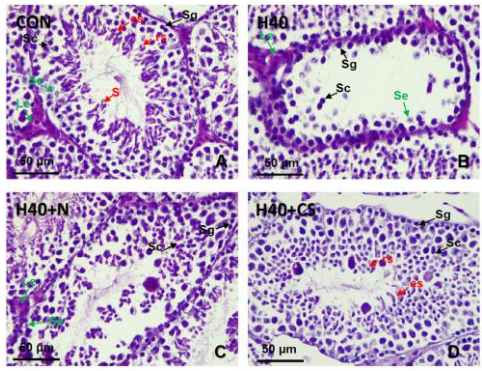


Figure 3.21. Effects of *Gynostemma pentaphyllum* extract on the microscopic structure of seminiferous tubules in mouse testicular tissue.

3.3.3.2. Effects of the extract on the improvement of blood testosterone levels

The extract of Gynostemma pentaphyllum restored the testosterone production capacity of heat-stressed mice. The extract derived from suspension cells demonstrated an improvement in testosterone levels in heat-stressed mice comparable to that of the natural plant extract.

CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS

CONCLUSION

1. The dissertation successfully established a *Gynostemma pentaphyllum* cell suspension culture system at the shake-flask scale and conducted an initial scale-up to a bioreactor system. Under optimized culture conditions, the suspension cells exhibited a high capacity for gypenoside accumulation (approximately 46.9 mg/g dry weight in shake flasks and approximately 40.1 mg/g dry weight in the bioreactor), demonstrating that cell suspension culture represents a feasible approach for generating a sustainable and controllable biomass source for gypenoside production.

2. Both individual and combined elicitors were able to induce enhanced gypenoside accumulation in suspension-cultured cells. In particular, single SA treatment increased gypenoside content to approximately 80 mg/g dry weight, whereas the combined application of MeJA, SA, and YE resulted in the highest gypenoside level, exceeding 100 mg/g dry weight. These results indicate the presence of synergistic effects among elicitors in regulating gypenoside biosynthesis.

3. Elicitors were able to modulate the expression of multiple genes belonging to the *CYP* and *UGT* families in suspension-cultured cells. Several *CYP* and *UGT* genes exhibited marked transcriptional upregulation (up to more than 10-fold compared with the control), demonstrating that the triterpenoid saponin biosynthetic pathway was activated at the molecular level. The concurrent increase in expression of genes involved in oxidation and glycosylation steps helps to explain the mechanistic basis of the observed enhancement in gypenoside accumulation.

4. The dissertation established a gypenoside enrichment procedure from the total extract through successive removal of low-polarity and hydrophobic impurities, yielding a gypenoside-rich fraction readily soluble in methanol and DMSO and suitable for HPLC analysis as well as biological assays. This procedure provides a basis

for subsequent standardization studies and the development of gypenoside-based preparations in the future.

5. Gypenosides and extracts derived from suspension-cultured *Gynostemma pentaphyllum* cells exhibited promising biological activities, in which gypenosides showed strong inhibitory effects against HepG2 liver cancer cells (IC_{50} approximately 86.7 μg/mL), while the extracts demonstrated protective effects on testicular cells, contributing to improved spermatogenesis and testosterone levels in a heat-stressed mouse model. These findings further confirm the potential application value of the cell suspension culture system in the field of medicinal plant biotechnology.

RECOMMENDATIONS

Further studies are required to optimize culture conditions and gypenoside production at the pilot scale in *Gynostemma pentaphyllum* suspension culture systems in order to evaluate growth stability, biomass productivity, and gypenoside accumulation capacity. The establishment and refinement of a pilot-scale process will provide a scientific and technological basis for the reliable production of gypenosides in large quantities with consistent quality for pharmaceutical applications.

In addition to gypenosides, future research should be expanded toward the biosynthesis and recovery of other classes of secondary metabolites, such as flavonoids, from *Gynostemma pentaphyllum* suspension cultures, thereby diversifying sources of bioactive compounds and enhancing the application value of plant cell culture technology in medicinal material production.