

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.

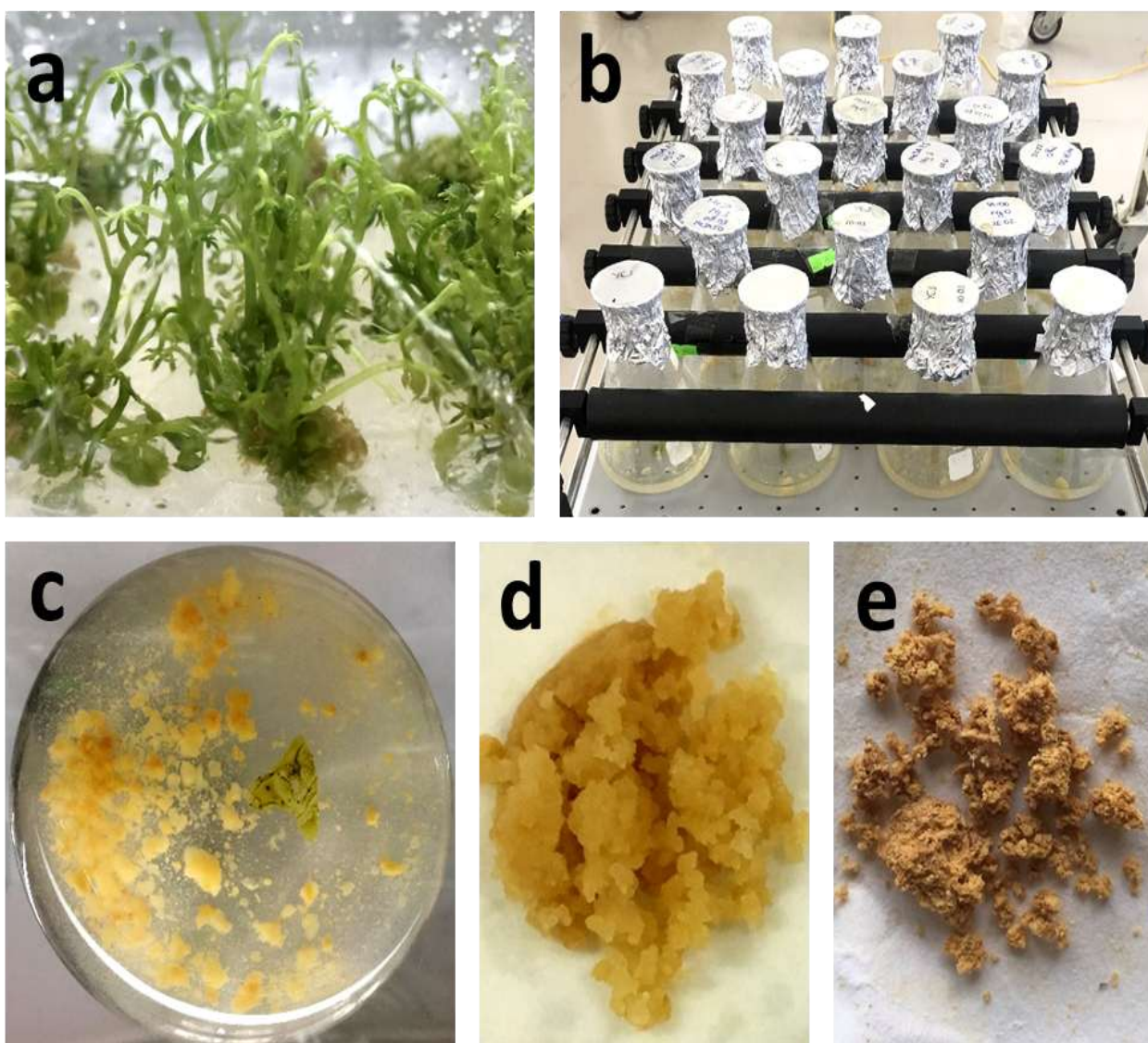


Figure 1: GpM biomass production by cell suspension culture.

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).

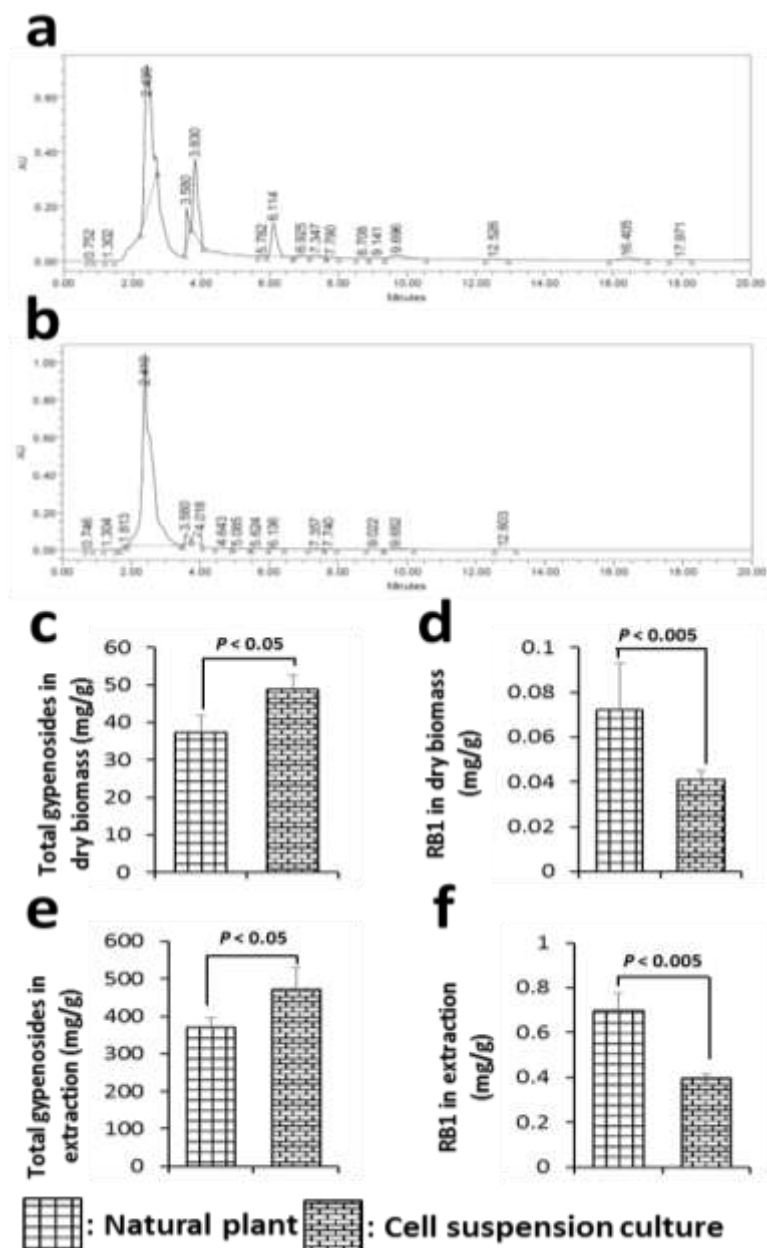


Figure 2: Bioactive compounds analysis of GpM biomass.

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

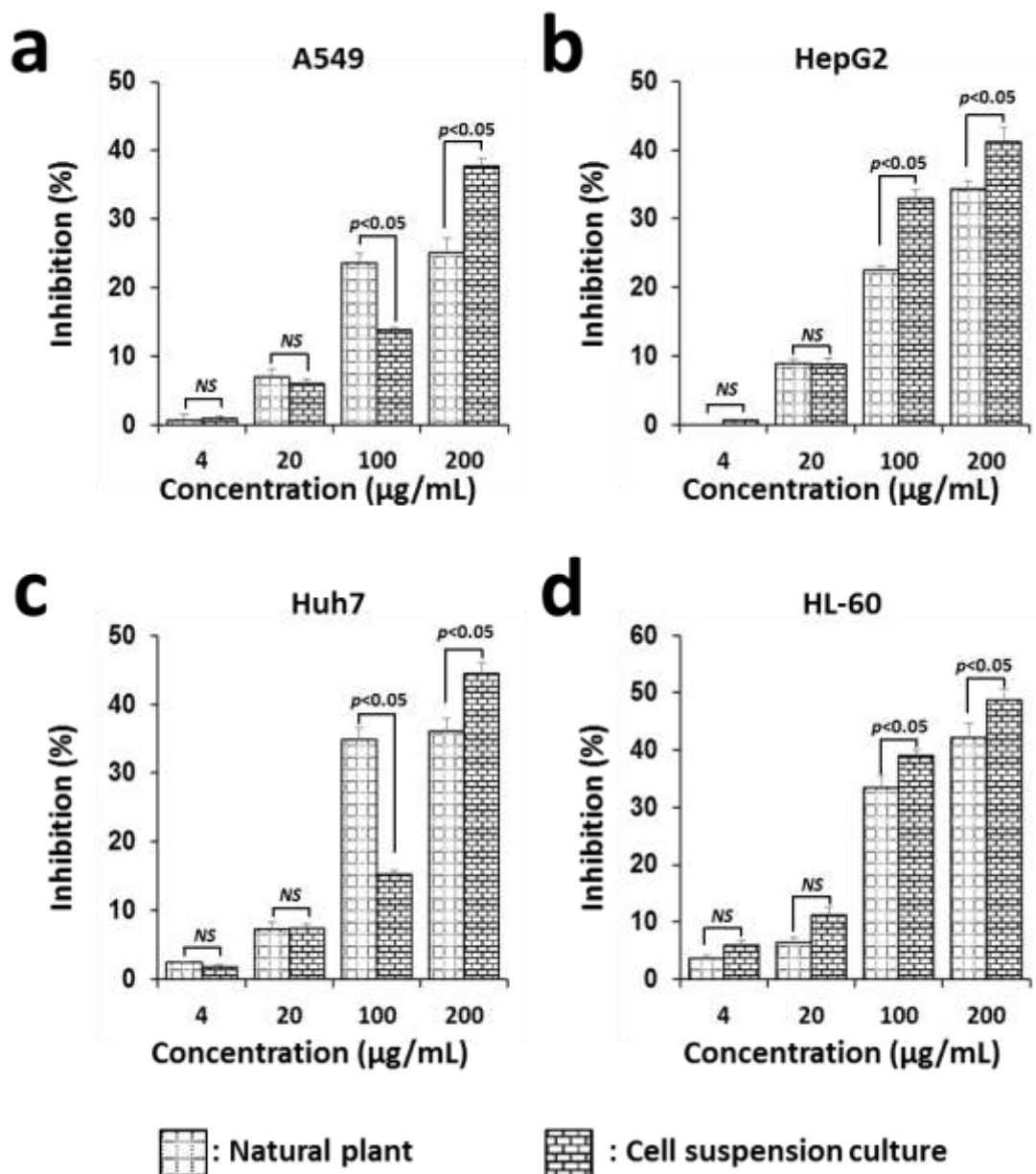


Figure 3: The effects of natural GpM and plant cell suspension culture on proliferation of human cancer cell lines. a. Human lung carcinoma cell line (A549). b. Human hepatoma cell line (HepG2). c. Human hepatoma cell line (Huh7). d. Human leukemia cell line (HL-60). $p < 0.05$: Significant; NS: Non-significant

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., Hajiaghah 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



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/>).

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

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.

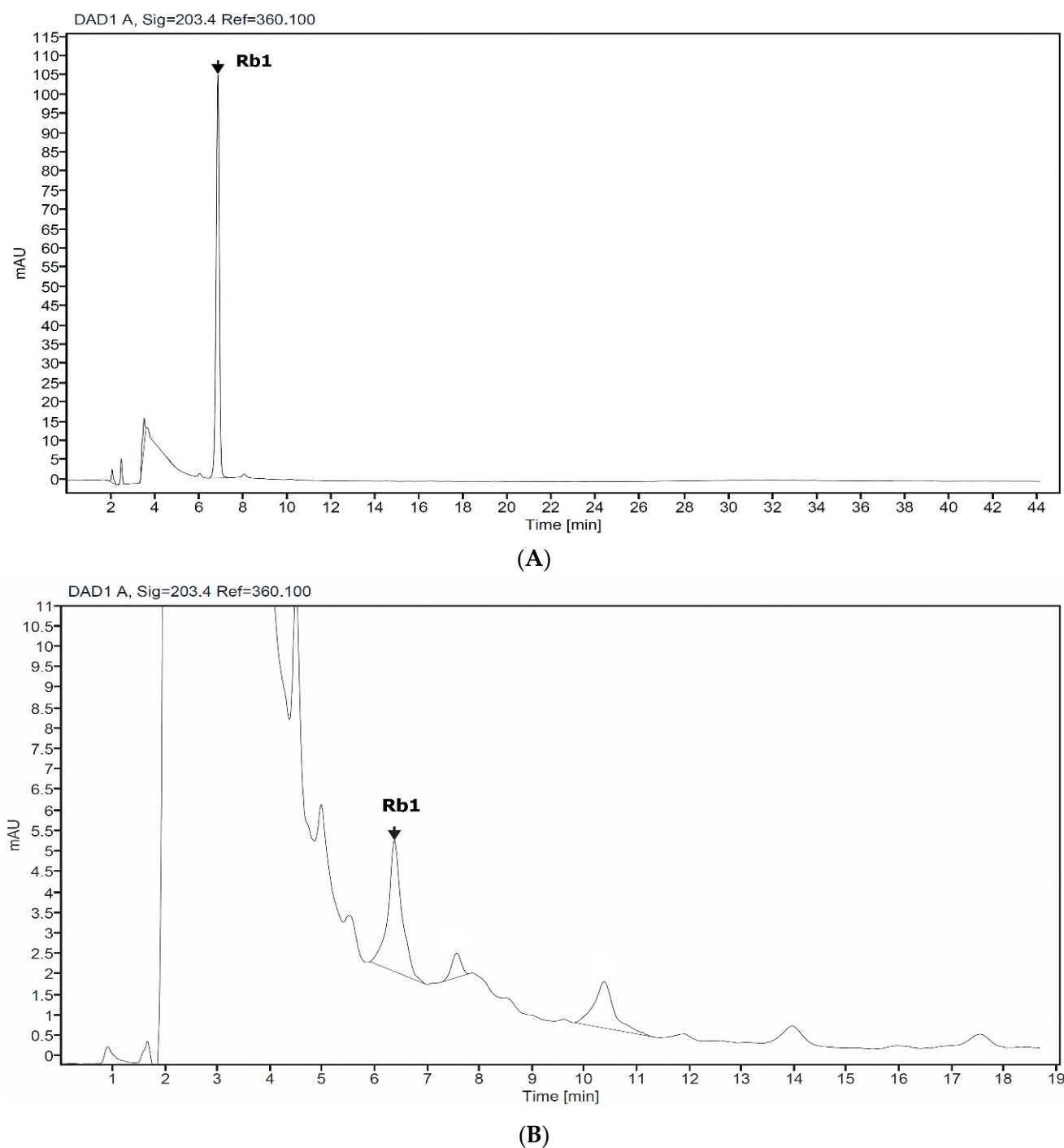


Figure 1. HPLC chromatogram profile of standard Rb1 (A) and suspension cell of *Giao co lam* (B).

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, $p < 0.05$).

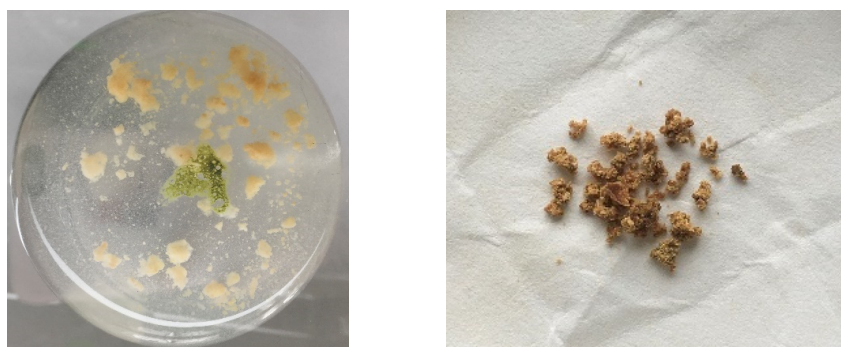


Figure 2. Suspension cells and dry biomass of *Giao co lam*, elicited with 100 μ M SA after 6 days of culture.

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 triquetrifolium* 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 μ m 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

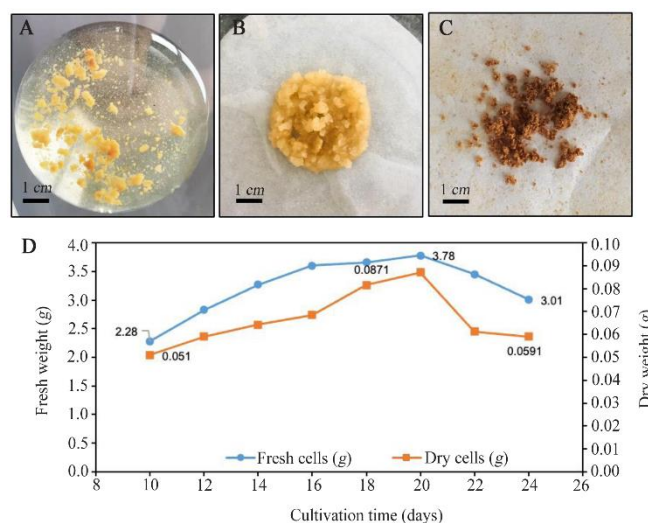


Figure 1. Cell growth kinetics and biomass accumulation of *Gynostemma pentaphyllum* using cell suspension culture.

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

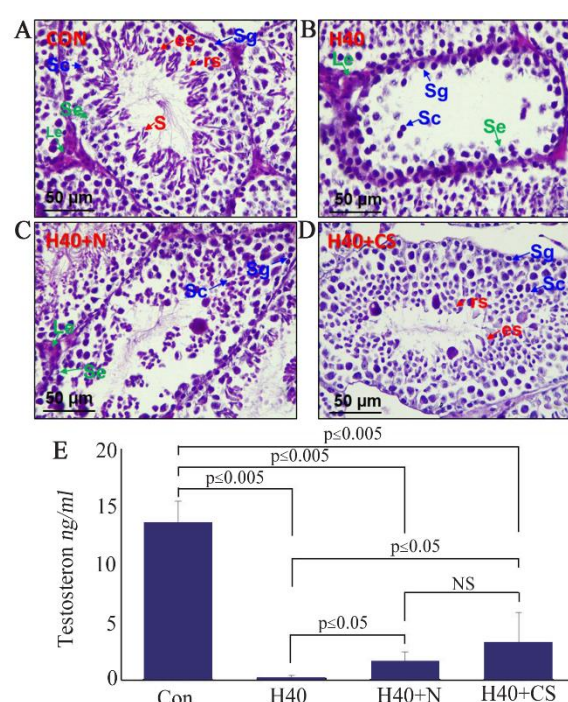


Figure 2. Attenuation of heat-stress-induced spermatogenesis complications by GP extract in mice. A) Normal spermatogenesis in the seminiferous tubules in the testes of the control group (CON). B) Spermatogenesis in seminiferous tubules disruption in heat stress-induced mice at 40°C (H40). C) Extraction 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 *Gynostemma*

- 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

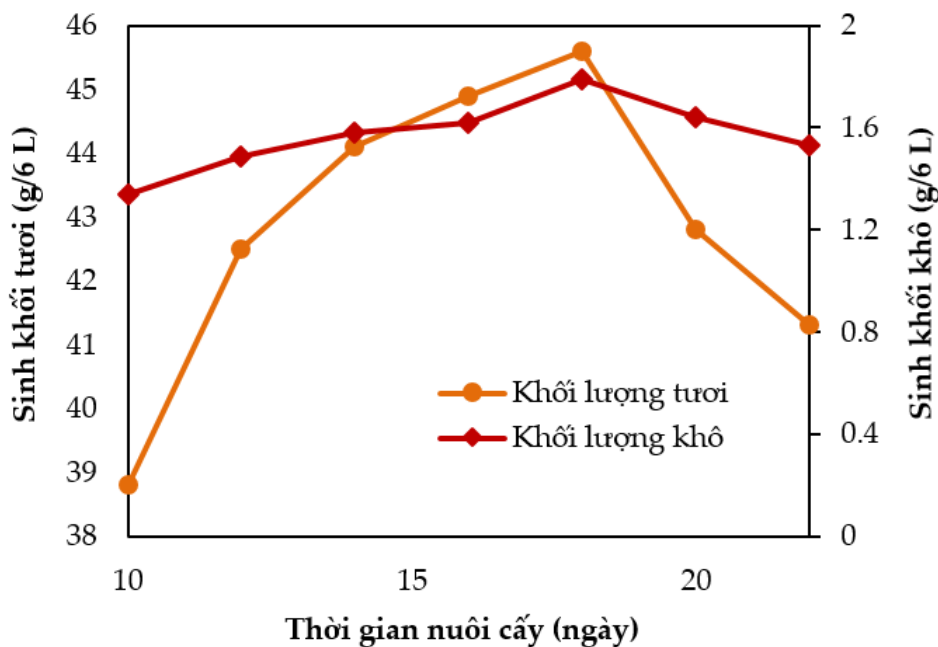
Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các trung bình mẫu với $p < 0,05$ (Duncan's test).

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].

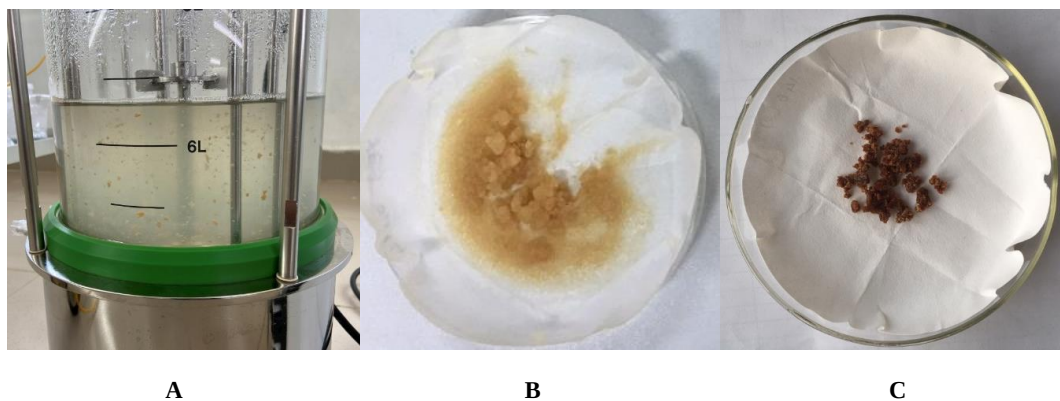
Thử nghiệm nuôi cấy tế bào trong bioreactor

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.

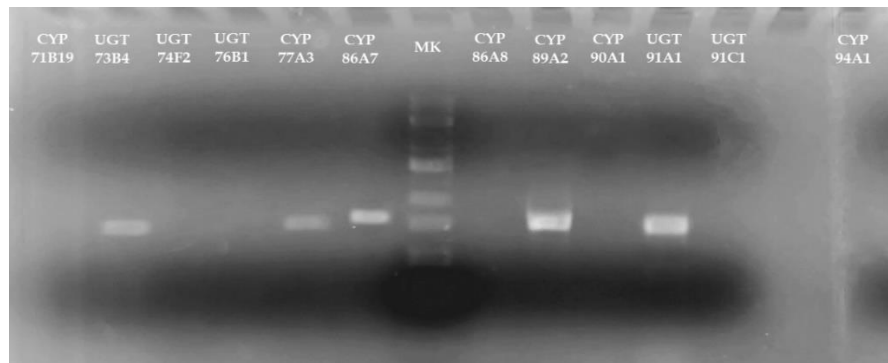
Mồi	Trình tự (5'-3')	Tài liệu tham khảo
RT-CYP89A2	5'-CCCTTCCAAACTCACAAAAC-3' 5'-AATGGAGATTGCGAAGAGTT-3'	(Zhang <i>et al.</i> , 2021)
GP-18sRNA	5'-ACGATGCCGACCAGGGATT-3' 5'-TTCAGCCTTGCGACCATACTC-3'	(Wang <i>et al.</i> , 2018)

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.



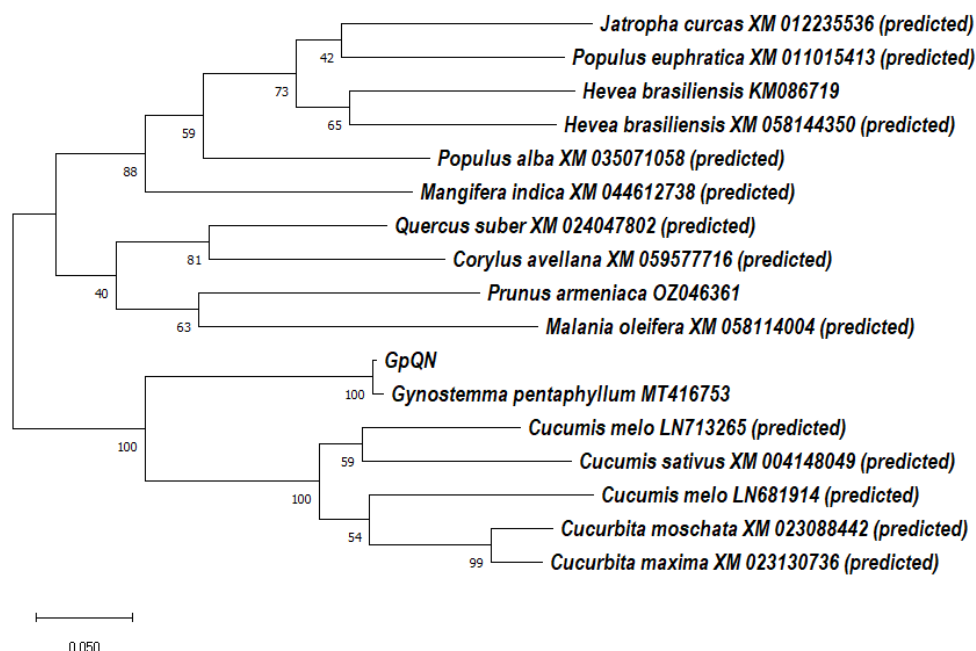
Hình 2. Điện di sản phẩm PCR 12 gene *CYP* và *UGT*. MK: thang chuẩn kích thước DNA (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Thermo Scientific, Mỹ).

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.

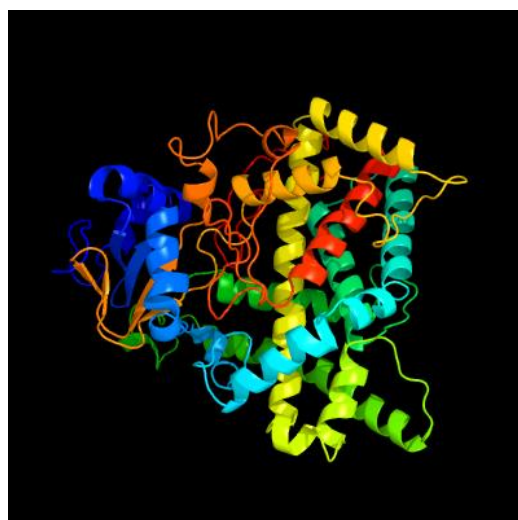
Dự đoán cấu trúc không gian và đặc điểm hóa lý của enzyme

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%.

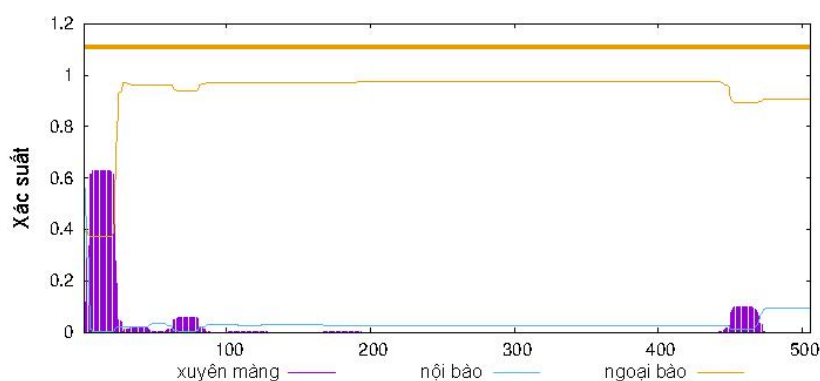
Vùng bảo tồn được dự đoán bằng chương trình SMART cho thấy enzyme có 13 domain hiện diện là PRM, CBM_X, PX, PLCXc, HSF, GLUCA, BRICHOS, BACK, HPT, KNOX2, TPK_B1_binding,

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).

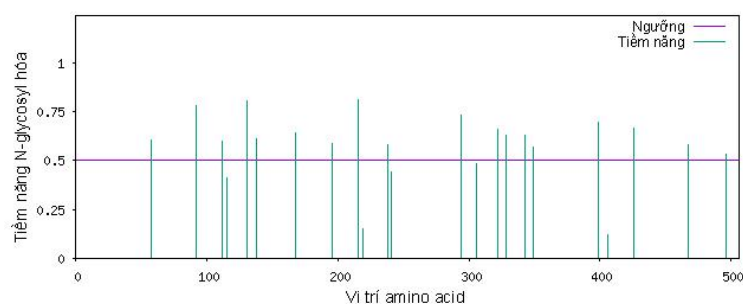
Đối với *CYP89A2*, trình tự mRNA có chiều dài 1.521 bp và mã hóa trình tự polypeptide dài 506 amino acid, enzyme có khối lượng phân tử là 58,44 kDa, điểm đẳng điện (pI) là 7,06. Kết quả dự đoán khả năng chịu nhiệt của *CYP89A2* bằng công cụ Tm Predictor cho thấy enzyme có khả năng chịu nhiệt độ từ 55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