

Влияние экзогенного ситостерина на биосинтез экдистероидов в культуре клеток *Ajuga reptans* L.

© 2012. Л. И. Алексеева, к.б.н., с.н.с.,
В. Н. Орлова (Филиппова), к.б.н., н.с., С. О. Володина, к.б.н., с.н.с.,
Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН,
e-mail: alexeeva@ib.komisc.ru

Показано, что экзогенный ситостерин индуцирует синтез экдистероидов и цитохрома P450 в каллусной культуре клеток *Ajuga reptans* L. Определены индекс роста, содержание экдистероидов и цитохрома P450.

It is shown that exogenous sitosterol induces the synthesis of ecdysteroids and cytochrome P450 in callus cultures of *Ajuga reptans* L. The growth index, content of ecdysteroids and cytochrome P450 are determined.

Ключевые слова: *Ajuga reptans*, каллусная культура, цитохром P450, экдистероиды, ситостерин

Keywords: *Ajuga reptans*, callus cultures, cytochrome P450, ecdysteroids, sitosterol

Живучка ползучая (*Ajuga reptans* L., сем. Lamiaceae) является одним из перспективных источников фитоэкдистероидов, отличающихся большим разнообразием (рис. 1) химических структур [1]. Экдистероиды *Ajuga reptans* проявляют адаптогенное, тонизирующее, кардиотропное, иммуномодулирующее и ранозаживляющее действие [2]. Альтернативу природному источнику получения экдистероидов могут составить культуры растительных клеток *Ajuga reptans* [3]. К настоящему времени способы повышения уровня биосинтеза экдистероидов и роста культуры клеток ограничены воздействием фитогормонов, источниками азотного и углеводного питания, освещением красным светом [4, 5]. Известно, что увеличение уровня биосинтеза вторичных метаболитов в культурах растительных клеток возможно при введении предшественников этих соединений в питательную среду. Так, при выращивании каллусной и суспензионной культуры *Dioscorea deltoidea* в присутствии мевалонной кислоты или холестерина значительно увеличивается выход диосгенина [6].

Для бородчатых корней *Ajuga reptans* было установлено, что 20-гидроксиэкдизон (C_{27} -экдистероид) синтезируется из холестерина или латостерина (рис. 2А) [7, 8]. Предшественником 29-норциастерона (C_{28} -экдистероид) в бородчатых корнях *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* является C_{28} -стерин клеростерин (рис. 2Б) [9], который может синтезироваться из 24-метилхолестерина [10], а также 2-ацетат холестерина [11]. Од-

нако, известно, что холестерин не трансформируется в C_{28} - и C_{29} -экдистероиды [11]. Пути биосинтеза аюгалактона (C_{29} -экдистероид) не установлены. Предшественниками C_{27} - C_{29} -экдистероидов могут являться также Δ^{24} -алкилированные фитостерины, например, ситостерин, которые при деалкилировании превращаются в холестерин (рис. 2) [12]. Ферментные системы, участвующие в биосинтезе экдистероидов, изучены мало. Установлено лишь, что при биосинтезе экдистероидов гидроксирование стеринового ядра и боковой цепи холестерина осуществляется ферментом цитохром P450 [13]. Известно, что введение гидроксильных групп в положениях C_2 ядра, C_{20} , C_{22} , C_{25} боковой цепи катализируют ферменты, представляющие собой цитохром P450-зависимые монооксигеназы [14].

Целью данной работы является изучение влияния экзогенного ситостерина в среде для культивирования на рост каллусной культуры, цитохрома P450 и содержание экдистероидов в культуре клеток *Ajuga reptans*.

Материалы и методы

Каллусную культуру *Ajuga reptans* выращивали на модифицированной среде Мурасиге-Скуга с добавлением сахарозы – 30 г/л; 2,4-D – 1 мг/л; БАП – 0,2 мг/л; мезо-инозита – 100 мг/л; НУК – 1 мг/л; ПВП – 2 г/л и витаминов по Стаба (мг/л): фолиевая кислота и рибофлавин – по 0,5, биотин – 1, Са-пантотенат – 1, кобаламин – 0,0015 [3]. В среду Мурасиге-Скуга до-

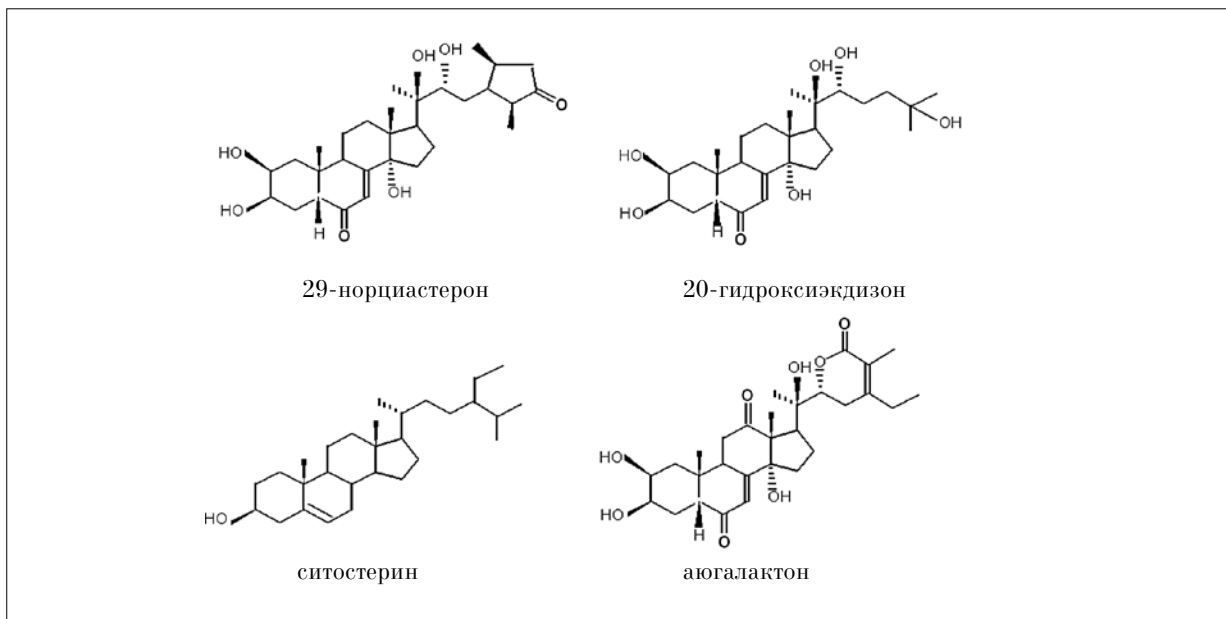


Рис. 1. Структурные формулы ситостерина и экдистероидов каллусной культуры *Ajuga reptans*

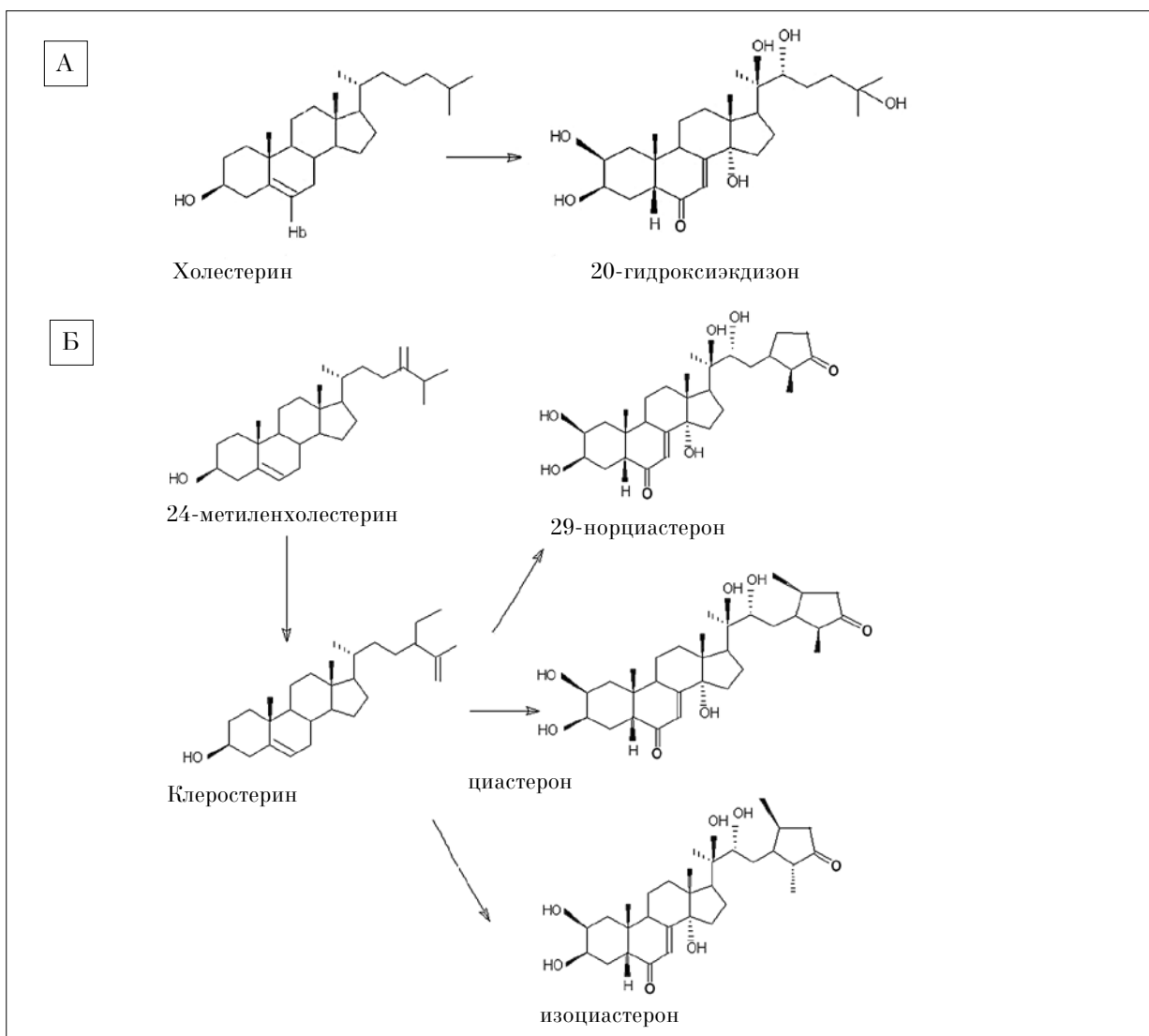


Рис. 2. Биосинтез 20-гидроксиэкдизона (А) и экдистероидов циастерона, изоциастерона и 29-норциастерона [7, 8] (Б) в бородчатых корнях *Ajuga reptans* var. *atropurpurea*

полнительно добавляли ситостерин с концентрацией 5, 25 и 50 мг/л.

Выделение цитохрома Р-450 из культуры клеток *Ajuga reptans* L. осуществляли следующим образом [13]. Культуры клеток (25 г) гомогенизировали в 50 мл 0,1М К-фосфатного буфера (рН 7,5) с добавлением 20% глицерина, 50мМ аскорбиновой кислоты, 1мМ ДТТ и 1% твина-80. Гомогенат центрифугировали при 6000 g в течение 20 мин. на центрифуге MPW-210 (Польша). Все операции по выделению цитохрома Р-450 проводили при 4 °С. Определение содержания белков осуществляли фотоколориметрическим методом, предложенным Бредфорд [15]. Количественное определение цитохрома Р 450 и его денатурированной формы – цитохрома Р 420 – проводили по дифференциальным спектрам поглощения карбонильного комплекса, восстановленного дитионитом натрия образца гемопротейна (СО-спектр), используя коэффициенты молярного поглощения, равные 91 и 114 мм⁻¹см⁻¹ при 450 и 420 нм соответственно, по формуле, предложенной Омура и Сато [16]. Спектральные измерения проводили на спектрофотометре SPECORD M40 (Германия).

Экдистероиды определяли в культуре клеток *Ajuga reptans*, высушенных при 60 °С. Экстракцию экдистероидов осуществляли метанолом из расчета 20 мл/г сухой массы при 50 °С в течение часа. Полученные экстракты пропускали через концентрирующий патрон Диасорб С16 (ЗАО «БиоХимМак», Россия). Экдистероиды элюировали с патрона 3 мл 60% метанола. Содержание экдизона и 20-гидроксиэкдизона определяли методом обращённо-фазовой ВЭЖХ на оборудовании производства Чехословакии: насос НРР 4001, детектор UV-VIS LCD 2536, λ = 254 нм с использованием колонки Диасорб С16, 6 мкм (150 x 4 мм) (ЗАО «БиоХимМак», Россия), элюента вода–ацетонитрил–тетрагидрофуран (100:16:4) при скорости элюирования 0,7 мл/мин. Содержание экдистероидов в исследуемых растворах рассчитывали методом абсолютной калибровки, сравнивая время удерживания исследуемых компонентов с временем удерживания стан-

дартных образцов экдистероидов.

Результаты и их обсуждение

Проведённые исследования показали, что добавление в среду для выращивания каллусной культуры ситостерина приводит к увеличению индекса роста каллусной культуры *Ajuga reptans* по сырой массе (табл. 1), которое не связано с оводнением каллуса. Качественный состав экдистероидов каллусной культуры *Ajuga reptans* не изменяется при изменении состава питательной среды, однако при добавлении в среду ситостерина происходит увеличение концентрации 20-гидроксиэкдизона, 29-норциастерона и аюгалактона (табл. 2). При добавлении в среду 50мг/мл ситостерина содержание аюгалактона в каллусной культуре превышает его содержание в растении *Ajuga reptans* [17]. Дальнейшее повышение экзогенного ситостерина в среде для выращивания культуры клеток ограничено его растворимостью в воде. Одновременно с увеличением экдистероидов при добавлении ситостерина (50мг/мл) в среду для культивирования каллусной культуры *Ajuga reptans* происходит увеличение содержания цитохрома Р450 от 0,31 (контроль) до 0,65 нмоль/мг белка.

Таким образом, при добавлении в среду для культивирования каллусной культуры *Ajuga reptans* C₂₉-стерина происходит увеличение как C₂₉-экдистероидов, так и C₂₇-, C₂₈-экдистероидов. Повышение содержания аюгалактона в культуре клеток *Ajuga reptans* (табл. 2) позволяет предположить, что ситостерин является одним из предшественников аюгалактона, при этом цитохром Р450 участвует в процессе гидроксилирования стеринового ядра и боковой цепи при биосинтезе экдистероидов трансформацией ситостерина в каллусной культуре *Ajuga reptans*.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы интеграционных проектов (проект № 12-И-4-2072: «Ресурсный и биотехнологический потенциал растений Урала и сопредельной территории европейского

Таблица 1

Характеристика каллусной культуры *Ajuga reptans*

Концентрация ситостерина в среде, мг/л	Индекс роста по сырой массе	Доля сухих веществ, %
Контроль (0)	8,58 ± 0,87	3,06 ± 0,12
5	7,36 ± 0,52	3,03 ± 0,26
25	10,18 ± 0,76	2,66 ± 0,12
50	12,00 ± 0,78	2,82 ± 0,24

Влияние ситостерина на содержание экидистероидов и цитохрома P450 в каллусной культуре *Ajuga reptans*

Концентрация ситостерина в среде, мг/л	Содержание цитохрома P450, нмоль/мг белка	Содержание экидистероидов, %			
		20-гидрокси-экидизон	29-норциастерон	аюгалактон	сумма экидистероидов
Контроль (0)	0,31	0,0293 ± 0,0010	0,0031 ± 0,0001	0,0096 ± 0,0010	0,0420
5	0,38	0,0250 ± 0,0010	0,0031 ± 0,0001	0,0233 ± 0,0047	0,0514
25	0,46	0,1041 ± 0,0031	0,0567 ± 0,0044	0,0527 ± 0,0023	0,2135
50	0,65	0,1228 ± 0,0047	0,0166 ± 0,0007	0,1058 ± 0,0089	0,2452

северо-востока России – подцентов важнейших групп биологически активных веществ»).

Литература

- Alexeeva L.I., Lafont R., Volodin V.V., Luksha V.G. Ecdysteroids from *Ajuga reptans* // Rus. J. Plant Physiol. 1998. V. 45. № 3. P. 372–377.
- Саатов Э., Сыров В., Маматханов А.У., Абубакиров Н.К. Фитоэкидистероиды растений рода *Ajuga* и их биологическая активность // Химия природных соединений. 1994. № 2. С. 152–155.
- Володин В.В. Экидистероиды в интактных растениях и клеточных культурах: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 1999. 52 с.
- Mboma N., Cellebaut A., Motte J. Phytoecdysones in plants, callus and cell suspension cultures // Acta Bot. Neerland. 1986. V. 35. № 1. P. 48.
- Ануфриева Э.Н. Ростовые и биосинтетические характеристики культур клеток *Serratula coronata* и *Ajuga reptans* – продуцентов экидистероидов: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М. 1997. 24 с.
- Васильева И.С., Пасишнеченко В.А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диаскорей, их метаболизм и биологическая активность // Усп. биол. химии. 2000. Т. 40. С. 153–204.
- Nagakari M., Kushiro T., Yagi T. et al. 3β-Hydroxy-5α-cholest-7-en-6-one as an intermediate of 20-hydroxyecdysone biosynthesis in a hairy root culture of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* // J. Chem. Soc. Chem. P. 1994. V. 15. P. 1761–1762.
- Ohyama K., Kushiro T., Nakamura K., Fujimoto Y. Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga hairy roots*: fate of 6α- and 6β-hydrogens of lathosterol // Bioorgan. Med. Chem. 1999. № 7. P. 2925–2930.
- Okuzumi K., Harra N., Fujimoto Y. et al. Biosynthesis of phytoecdysteroids in *Ajuga hairy roots*: clerosterol as a precursor of cyasterone, isocyasterone and 29-norcyasterone // Tetrahedron Lett. 2003. V. 44. № 2. P. 323–326.
- Fujimoto Y., Ohyama K., Nomura K. et al. Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in *Ajuga hairy roots* // Lipids. 2000. V. 35. № 3. P. 279–288.
- Nagakari M., Kushiro T., Matsumoto T. et al. Incorporation of acetate and cholesterol into 20-hydroxyecdysone by hairy root clone of *Ajuga reptans* var. *atropurpurea* // Phytochem. 1994. V. 36. № 4. P. 907–910.
- Rees H.H. Pathways of biosynthesis of ecdysone // Ecdysone: from chemistry to mode of action / Ed. by J. Koolman. N.-Y.: Thieme Med. Publ., 1989. P. 1952–1960.
- Grebenok R.J., Galbraith D.W., Benveniste I., Feyereisen R. Ecdysone 20-monoxygenase, a cytochrome P450 enzyme from spinach *Spinacia oleracea* // Phytochem. 1996. V. 42. № 4. P. 927–933.
- Kappler C., Kabbouh M., Hetru C. et al. Characterization of three hydroxylases involved in the final steps of biosynthesis of the steroid hormone ecdysone in *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera) // J. Steroid Biochem. 1988. V. 31. № 6. P. 891–898.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248–254.
- Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2379–2385.
- Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В., Володин В.В., Колегова Н.А. Динамика содержания экидистероидов у *Ajuga reptans* L. на северной границе ее ареала // Растительные ресурсы. 1998. Вып. 4. С. 56–62.