

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА, АЦЕТАЛЬДЕГИДА И ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА ЭКСПРЕССИЮ МЕМБРАННЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ КОМПЛЕМЕНТА В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА HepG2**

Анна Владимировна БЕЛКОВЕЦ<sup>1,2</sup>, Игорь Леонидович БЫКОВ<sup>1</sup>, Сами ЮННИККАЛА<sup>1</sup>, Светлана Арсентьевна КУРИЛОВИЧ<sup>2</sup>, Сеппо Мери<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Университет г. Хельсинки  
Финляндия, г. Хельсинки, РО ВОХ 21

<sup>2</sup>НИИ терапии СО РАМН  
630089, г. Новосибирск, ул. Б. Богаткова, 175/1

Активация системы комплемента играет важную роль в развитии алкогольного поражения печени (АПП). В настоящем исследовании оценено влияние факторов, участвующих в патогенезе АПП (этанол, ацетальдегид и липополисахариды микробного происхождения (LPS)), на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента в клетках гепатомы человека HepG2 (модельная система для изучения функции гепатоцитов *in vitro*). Методами иммунофлуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии выявлен высокий базальный уровень экспрессии CD59, CD46 и, в меньшей степени, CD55 в клетках HepG2. Инкубация клеток в присутствии этанола (50 и 200 мМ; 48 час) дозозависимо повышала экспрессию всех изученных мембранных регуляторных белков. LPS (100 нг/мл; 48 часов) не влиял на экспрессию исследованных белков; ацетальдегид (100 мкМ; 48 часов) повышал экспрессию CD59 и CD55. Таким образом, в клетках HepG2 экспрессированы мембранные регуляторные белки комплемента. Повышение их экспрессии под действием факторов, играющих патогенетическую роль в становлении АПП (этанол, ацетальдегид), по-видимому, играет протективную роль при комплемент-опосредованном поражении печени, развивающемся на фоне алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** комплемент, регуляторные белки, этанол, ацетальдегид, липополисахарид.

В развитии алкогольного поражения печени (АПП) патогенетическую роль играют этанол, ацетальдегид, липополисахариды микробного происхождения (LPS), запускающие каскад реакций, опосредованных активацией клеток Купфера в печени, продукцией цитокинов, хемокинов, являющихся модуляторами экспрессии белков острой фазы и комплемента [1–3]. Об участии в патогенезе АПП системы комплемента, вовлеченной в регуляцию гуморального ответа, воспаления, опсонизации патогенов, элиминации иммунных комплексов, свидетельствует ее активация при алкогольной интоксикации [4]. Генерализованной активации системы комплемента, вызывающей повреждения клеток и тканей собственного организма, препятствует действие плазменных и мембранных регуляторных факторов, синтезируемых большинством клеток, включая гепатоциты [5–8]. К семейству мембранных регуляторных белков комплемента относятся фактор, ускоряющий диссоциацию C3-конвертазы (DAF, CD55), мембранный кофакторный белок (MCP, CD46), протектин (CD59). CD55 и CD46 функционируют на начальных, а протектин — на конечных этапах активации комплемента.

Однако, несмотря на ключевую роль мембранных регуляторных белков комплемента, их экспрессия в гепатоцитах и регуляция при различных патологических состояниях, включая АПП, практически не изучены.

В настоящей работе исследовано влияние патогенетических факторов, участвующих в развитии АПП (этанол, ацетальдегид и LPS) на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента в клетках гепатомы человека HepG2 (модельная система для изучения функции гепатоцитов *in vitro*).

**Материал и методы исследования**

В исследовании использовали культуру клеток гепатомы человека HepG2, полученную из коллекции клеточных культур АТТС (США). Клетки культивировали в монослое в пластиковых 24-луночных планшетах в увлажненной атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха при 37 °C в среде RPMI, содержащей глюкозу, L-глутамин, 10% телячьей сыворотку, пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Клетки инкубировали в течение 48 часов в культуральной среде, содержавшей этанол в конечных концентрациях 50 и 200 мМ либо ацетальдегид (100 мкМ) в присутствии или в отсутствие

Белковец А.В. — н.с. лаборатории гастроэнтерологии, e-mail: belkovets@gmx.de

Быков И.Л. — д.м.н., н.с. отдела бактериологии и иммунологии, e-mail: bykovil@netscape.net

Юнниккала Сами — н.с. отдела бактериологии и иммунологии, e-mail: bykovil@netscape.net

Курилович С.А. — зав. лабораторией гастроэнтерологии, e-mail: kurilovich@yandex.ru

Мери Сеппо — зав. отделом бактериологии и иммунологии, e-mail: seppo.meri@helsinki.fi

LPS (*Escherichia coli*, Serotype 0111:B4 (Sigma, США)) в конечной концентрации 100 нг/мл). Окисление ацетальдегида блокировали цианамидом (0,2 мМ) — ингибитором альдегиддегидрогеназы. Концентрацию этанола и ацетальдегида в культуральной среде, а также скорость их окисления клетками в процессе инкубации определяли методом газовой хроматографии на хроматографе Perkin Elmer Sigma 2000 (США).

Жизнеспособность инкубированных клеток, оцениваемая по включению в цитозоль трипанового синего, была выше 95% при всех экспериментальных воздействиях. Кроме того, для контроля цитотоксичности этанола, ацетальдегида и LPS в процессе инкубации в культуральной среде определяли активность лактатдегидрогеназы спектрофотометрическим методом при  $\lambda$ -340 нм на микропланшетном анализаторе Multiskan RS (Labsystems, Финляндия) в среде определения, содержащей 9,76 мМ пирувата, 0,2 мМ NADH и 81,3 мМ TRIS/203,3 мМ NaCl. Активность фермента в среде инкубации при всех экспериментальных воздействиях составляла менее 8% от максимальной активности, регистрируемой при полном лизисе (Triton X-100) всех культивированных клеток, что свидетельствует об оптимальных условиях инкубации и отсутствии выраженного цитотоксического эффекта этанола, ацетальдегида и LPS в использованных концентрациях.

Базальную экспрессию изучаемых белков исследовали методом иммунофлюоресцентной микроскопии. Перенесенные на покровные стекла клетки фиксировали в течение 5 мин в ацетоне при  $-20^{\circ}\text{C}$ , промывали 0,5% раствором бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере (BSA/PBS) и инкубировали при  $+22^{\circ}\text{C}$  в течение 20 мин с первичными моноклональными антителами (Bric 229 mAb (CD59); Jn 46 mAb (CD46) и Bric 230 mAb (CD55)) в конечной концентрации 5 мкг/мл). После трехкратной отмывки раствором PBS клетки инкубировали с вторичными FITC-конъюгированными антителами, меченными зеленым флуоресцеином Alexa Fluor 488 (Molecular Probes Inc., США). В контрольных экспериментах для исключения неспецифичного связывания клетки инкубировали в культуральной среде, не содержащей первичных антител. Иммунофлюоресцентный анализ проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX-50 (Япония), оснащенном цифровой камерой Hamamatsu Orca Him CCD-camera (Hamamatsu Photonics КК, Япония) и программным обеспечением для обработки изображений (Openlab software, Improvion Corporation, США).

Влияние этанола, ацетальдегида и LPS на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента исследовали методом проточной цитометрии. Ресуспендированные в 0,5% BSA/PBS клетки ( $1 \times 10^6$  клеток/мл) инкубировали в течение 15 минут с первичными антителами. После отмывки клетки инкубировали в течение 15 мин с вторичными FITC-конъюгированными антителами, меченными Alexa Fluor 488, отмывали в 0,5% BSA/PBS и анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACScan 440 (San Jose, CA, USA), оснащенным аргонным лазером ( $\lambda$ -488 нм). Для обработки результатов цитометрии использовали пакет программ Lysis II (Becton Dickinson, США).

Для статистической обработки результатов исследований использовали программу GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, США). Вычисляли среднее арифметическое значение ( $M$ ), ошибку среднего арифметического значения ( $m$ ), различия между средними значениями показателей оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента и считали значимыми при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

В гепатоцитах синтезируется большинство белков системы комплемента, включая регуляторные, биосинтез которых существенно повышается в период реакций острой фазы в результате действия провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 [9]. В настоящем исследовании изучено влияние этанола, ацетальдегида и LPS на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента (CD46, CD55 и CD59) в клетках гепатомы человека HepG2, наиболее полно отражающих функциональный фенотип гепатоцитов и экспрессирующих ряд генов, включая гены белков системы комплемента [10]. CD46 является гликопротеином с трансмембранным доменом, экспрессирован на клетках различных тканей и действует как кофактор для фактора I, обеспечивая инактивацию C3b и C4b [11]. CD55 — гликопротеин, фиксирован в клеточной мембране гликозил-фосфатидил-инозитольным остатком, представлен на большинстве клеток, включая эритроциты, ускоряет диссоциацию C3-конвертаз, вытесняя фрагменты C2a и Bb [12]. CD59 — мембранный гликопротеин, экспрессирован на клетках крови, эндотелия, эпителия, блокирует образование лизирующей мембрану комплекса, препятствуя внедрению C9 в липидный бислой мембраны [13].

Иммунофлюоресцентный анализ клеток HepG2 выявил высокий уровень базальной экспрессии мембранных регуляторных белков

комплемента CD46, CD55 и CD59. Средняя интенсивность флюоресценции была наивысшей для CD59 (948 ЕД) и значительно ниже у CD46 (305 ЕД) и CD55 (23 ЕД), с максимальной интенсивностью флюоресценции в местах межклеточных контактов. Аналогичная закономерность в уровне экспрессии изученных белков была подтверждена методом проточной цитометрии (данные не приведены).

Следует отметить, что в клетках HepG2, фенотипически схожих с гепатоцитами, синтезируются многие белки плазмы крови, однако экспрессия и активность алкогольдегидрогеназы и, соответственно, скорость окисления этанола в них очень низка. Нами выявлен дозозависимый эффект этанола на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента CD59, CD46 и CD55 (таблица), а также обна-

ружено отсутствие аддитивности эффекта при совместной инкубации LPS с этанолом, причем в отсутствие этанола LPS также не влиял на экспрессию исследованных белков.

В отличие от алкогольдегидрогеназы, в клетках HepG2 экспрессирована альдегиддегидрогеназа, окисляющая ацетальдегид до ацетата и CO<sub>2</sub>, что объясняет обнаруженные в предварительных экспериментах низкие концентрации ацетальдегида в среде инкубации (менее 10% от первоначальных). Для блокирования окисления ацетальдегида и снижения его концентрации в культуральной среде во время инкубации в настоящем исследовании альдегиддегидрогеназу ингибировали цианамидом. Повышение экспрессии CD55 и CD59 при инкубации клеток HepG2 с ацетальдегидом в присутствии цианамида свидетельствует об

Таблица

Результаты исследования влияния LPS, этанола и ацетальдегида на экспрессию мембранных регуляторных белков комплемента CD46, CD55 и CD59 в клетках гепатомы человека HepG2

	CD 46 (n = 6)	CD55 (n = 6)	CD59 (n = 6)
<b>LPS</b>			
Контроль	100 ± 7	100 ± 6	100 ± 3
LPS, 100 нг/мл	98 ± 7	102 ± 4	97 ± 8
<b>Этанол</b>			
Контроль	100 ± 7	100 ± 8	100 ± 3
Этанол, 50 мМ	110 ± 5	115 ± 4	90 ± 10
Этанол, 50 мМ + LPS, 100 нг/мл	115 ± 4	108 ± 5	98 ± 5
Этанол, 200 мМ	130 ± 9 *#	145 ± 7 *#	121 ± 6 *#
Этанол, 200 мМ + LPS, 100 нг/мл	140 ± 7 *	140 ± 6 *	130 ± 11 *
<b>Ацетальдегид</b>			
Контроль	100 ± 4	100 ± 4	100 ± 6
Ацетальдегид, 100 мкМ	112 ± 6	104 ± 4	89 ± 2
Цианамид, 0,2 мМ	102 ± 3	101 ± 5	108 ± 7
Ацетальдегид, 100 мкМ + цианамид, 0,2 мМ	98 ± 4	134 ± 7 *&	137 ± 5 *&

Примечание: результаты представлены в виде % от средних контрольных значений, М ± т; n — количество экспериментов; \* — p<0,05 по отношению к группе соответствующего контроля, # — p<0,05 по отношению к группе «Этанол, 50 мМ»; & — P < 0,05 по отношению к группе «Ацетальдегид, 100 мкМ».

ацетальдегид-опосредованной индукции мембранных регуляторных белков комплемента при алкогольной интоксикации (таблица).

Известно, что биосинтез белков системы комплемента индуцируется цитокинами, белками острой фазы, липополисахаридами. Обнаруженное в настоящем эксперименте отсутствие эффекта LPS в отношении экспрессии мембранных регуляторных белков комплемента клетками HepG2 может быть обусловлено кратковременностью действия LPS или биохимическими особенностями данной линии клеток. К примеру, в клетках эндометрия и эндотелия человека LPS увеличивал экспрессию факторов регуляции комплемента и провоспалительных цитокинов с максимальным эффектом в короткие сроки опыта (6 часов) и возвращением к базальным значениям уже через 24 часа [14].

Установлено, что цитокины TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-4 не влияют на экспрессию CD46, а LPS, IL-1 $\beta$  и IL-4 повышают экспрессию CD55 в клетках сосудистого эндотелия, тогда как TNF- $\alpha$  индуцирует, а IL-1 $\beta$  снижает экспрессию CD59 [15]. В то же время при совместной инкубации TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-6 в течение 3 дней отмечалось увеличение экспрессии мРНК CD55 и CD59 и снижение экспрессии мРНК CD46 в клетках HepG2 [16].

Механизмы регуляции экспрессии мембранных белков комплемента до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Ряд данных свидетельствует о вовлечении протеинкиназного пути, что подтверждается индукцией регуляторных белков комплемента активаторами протеинкиназы C (форбол-12-миристат-13-ацетат) и протеинкиназы A (дibuтирил-С-аденозин монофосфат) [17].

Таким образом, в клетках гепатомы человека HepG2 экспрессированы мембранные регуляторные белки комплемента. Повышение их экспрессии под действием факторов, играющих патогенетическую роль в развитии АПП (этанол, ацетальдегид), по-видимому, играет протективную роль при комплемент-опосредованном поражении печени, развивающемся на фоне алкогольной интоксикации.

Работа выполнена при поддержке гранта Академии наук Финляндии.

#### Литература

1. McClain C.J., Song Z, Barve S.S. et al. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2004. 287 (3). G497–G502.

2. Tsukamoto K, Lu S.C. Current concepts in the pathogenesis of alcoholic liver injury // *FASEB J.* 2001. 15 (8). 1335–1349.

3. Stewart S., Jones D., Day C.P. Alcoholic liver disease: new insights into mechanisms and preventative strategies // *Trends Mol. Med.* 2001. 7 (9). 408–413.

4. Jarvelainen H.A., Vakeva A. Lindros K.O. et al. Activation of complement components and reduced regulator expression in alcohol-induced liver injury in the rat // *Clin. Immunol.* 2002. 105. 57–63.

5. Qin X., Goldfine A., Krumrei N. et al. Glycation inactivation of the complement regulatory protein CD59: A possible role in the pathogenesis of the vascular complications of human diabetes // *Diabetes.* 2004. 53 (10). 2653–2661.

6. Yamada K., Miwa T., Liu J. et al. Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59 // *J. Immunol.* 2004. 172 (6). 3869–3875.

7. Mead R.J., Neal J.W., Griffiths M.R. et al. Deficiency of the complement regulator CD59a enhances disease severity, demyelination and axonal injury in murine acute experimental allergic encephalomyelitis // *Lab. Invest.* 2002. 84 (1). 21–28.

8. Lin F., Salant D.J., Meyerson H. et al. Respective roles of decay-accelerating factor and CD59 in circumventing glomerular injury in acute nephrotoxic serum nephritis // *J. Immunol.* 2004. 172 (4). 2636–2642.

9. Ramadori G., Christ B. Cytokines and hepatic acute-phase response // *Semin. Liver Dis.* 1999. 19. 141–155.

10. Wenger R.H., Rolfs A., Marti H.H. et al. Hypoxia, a novel inducer of acute phase gene expression in a human hepatoma cell line // *J. Biol. Chem.* 1995. 270 (46). 27865–27870.

11. Seya T., Turner J.R., Atkinson J.P. Purification and characterization of a membrane protein (gp45-70) that is a cofactor for cleavage of C3b and C4b // *J. Exp. Med.* 1986. 163 (4). 837–855.

12. Kinoshita T. Biology of complement: the overture // *Immunol. Today* 1991. 12 (9). 291–295.

13. Meri S., Waldmann H., Lachmann P.J. Distribution of protectin (CD59), a complement membrane attack inhibitor, in normal human tissues // *Lab. Invest.* 1991. 65 (5). 532–537.

14. Iborra A., Mayorga M., Llobet N. et al. Expression of complement regulatory proteins [membrane cofactor protein (CD46), decay accelerating factor (CD55), and protectin (CD59)] in endometrial stressed cells // *Cell. Immunol.* 2003. 223 (1). 46–51.

15. Moutabarrik A., Nakanishi I., Namiki M. et al. Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells // *Lymphokine Cytokine Res.* 1993. 12 (3). 167–172.

16. Spiller O.B., Criado-Garcia O., Rodriguez De Cordoba S. et al. Cytokine-mediated up-regulation of CD55 and CD59 protects human hepatoma cells from complement attack // *Clin. Exp. Immunol.* 2000. 121 (2). 234–241.

17. Meri S., Manila P., Renkonen R. Regulation of CD59 expression on the human endothelial cell line EA.hy 926 // *Eur. J. Immunol.* 1993. 23 (10). 2511–2516.

## THE EFFECT OF ETHANOL, ACETALDEHYDE AND LPS ON MEMBRANE COMPLEMENT REGULATORY PROTEINS EXPRESSION IN HUMAN HEPATOMA HEPG2 CELLS

Anna Vladimirovna BELKOVETS<sup>1,2</sup>, Igor Leonidovich BYKOV<sup>1</sup>, Sami JUNNIKKALA<sup>1</sup>, Svetlana Arsentyevna KURILOVICH<sup>2</sup>, Seppo MERI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Haartman Institute, University of Helsinki,  
PO BOX 21, Helsinki, Finland*

<sup>2</sup>*SRI of Internal Medicine SB RAMS  
175/1, Boris Bogatkov st., Novosibirsk, 630089*

---

The complement system activation plays an important role in pathogenesis of the alcohol liver disease (ALD). The aim of this study was to evaluate the effects of ethanol, acetaldehyde and lipopolysaccharide (LPS) on the expression of the membrane complement regulatory proteins by human hepatoma cell line HepG2, that retain many hepatocytes functions. Treated cells were processed for immunofluorescence microscopy and flow cytometry analysis (FACS). HepG2 cells strongly expressed the complement membrane attack inhibitor CD59, and to a lesser extent CD46 and CD55. Ethanol exposure resulted in dose dependent (50, 200 mM; 48 hrs) increase of the expression of all complement regulators tested. The LPS (100 ng/ml; 48 hrs) did not change significantly the expression of CD59 and CD55 nor of CD46. There was no synergistic effect of ethanol and LPS on CD55, CD59 and CD46. Acetaldehyde (100 uM; 48 hrs) had no effect on CD46 expression but increased CD55 and CD59. Thus, our data demonstrate that factors, involved in the developing of ALD can modulate the expression of complement regulatory proteins on HepG2 cells. This might be relevant in the protection of hepatocytes from complement activation in chronic alcohol consumption.

---

**Key words:** complement, regulatory proteins, ethanol, acetaldehyde, lipopolysaccharide.

*Belkovets A.V. — scientific researcher of Gastroenterological Laboratory, e-mail: belkovets@gmx.de*

*Bykov I.L. — MD, PhD, scientific researcher of bacteriology and immunology department, e-mail: bykovil@netscape.net*

*Sami Junnikkala — PhD, scientific researcher of bacteriology and immunology, e-mail: sami.junnikkala@helsinki.fi*

*Kurilovich S.A. — MD, PhD, professor, chief of the gastroenterology, e-mail: kurilovich@yandex.ru*

*Seppo Meri — PhD, head of of bacteriology and immunology, e-mail: seppo.meri@helsinki.fi*