

网络出版时间: 2018-6-22 17:51 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.009.html

## 弗氏佐剂诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-10 降低的机制研究

宋阳<sup>1,2,3</sup>, 李俊<sup>1,3</sup>, 解丹<sup>1,3</sup>, 周德喜<sup>1,3</sup>, 林珍<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨弗氏佐剂诱导大鼠腹腔巨噬细胞(PM $\Phi$ )分泌白介素-10(IL-10)降低的可能机制。方法 大鼠关节炎模型由完全弗氏佐剂(CFA)诱导;取大鼠 PM $\Phi$  用 5-氮杂胞苷(5-azaC)处理;运用 RT-PCR 法检测 IL-10 表达情况;ELISA 法分析大鼠 PM $\Phi$  上清液中 IL-10 分泌量变化情况;甲基化特异性 PCR(MSP)实验分析大鼠 PM $\Phi$  中 IL-10 启动子区甲基化情况;用 RT-PCR 法和 Western blot 法分析大鼠 PM $\Phi$  中 DNMT1 的基因和蛋白表达变化情况。结果 FCA 作用大鼠关节 结果显示第 28 天肿胀度显著增加,达高峰;PM $\Phi$  分泌 IL-10 减少;应用 5-azaC 可促进 IL-10 增加;MSP 结果显示关节炎大鼠(AA)大鼠 PM $\Phi$  中 IL-10 启动子区域发生甲基化;进一步显示关节炎大鼠中甲基转移酶 1(DNMT1)的基因与蛋白表达明显增加,5-azaC 可降低其表达。结论 在佐剂性关节炎病程中,IL-10 基因 CpG 岛发生甲基化, DNMT1 可能促进 AA 大鼠 PM $\Phi$  中 IL-10 发生甲基化分泌减少。

**关键词** 佐剂性关节炎;腹腔巨噬细胞;白细胞介素-10;DNA 甲基化;甲基转移酶 1

**中图分类号** R 392.12; R 593.22

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2018)08-1197-06

2018-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473268)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药学院,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院疼痛科,合肥 230022

<sup>3</sup>重大自身免疫性疾病安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:宋阳,男,博士,副主任医师;

李俊,男,教授,博士,责任作者, E-mail:lj@ahmu.edu.cn

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.009

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)其主要病理特征是关节滑膜的慢性、进行性、侵袭性炎症,促使血管翳的形成以及软骨与骨组织的破坏,致关节病变,是人类致残的主要原因之一。作为炎症相关性疾病,RA 发病机制还未完全阐明,研究<sup>[1]</sup>报道 RA 发病过程中,炎性细胞包括腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM $\Phi$ )的激活,引起细胞因子分泌不平衡,如白细胞介素-1(interleukin-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )明显增多,IL-10 显著减少,是 RA 形成的主要机制之一。Xie et al<sup>[2]</sup> 研究报道,IL-10 可抑制单核巨噬细胞的激活、相关炎症因子的合成、分泌,减轻全身及关节局部炎症反应。但在 RA 发病过程中 IL-10 分泌减少机制尚不清楚。Karouzakis et al<sup>[3]</sup> 研究 RA 患者的滑膜细胞发现,基因启动子甲基化异常参与了 RA 的病程。Cifuentes-Zuniga et al<sup>[4]</sup> 研究发现,巨噬细胞中 IL-10 的表达变化可能与 DNMT 密切相关。上述研究提示, DNMT 促进 IL-10 甲基化沉默,可能是 RA 发病机制之一。该实验以完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)诱导大鼠 PM $\Phi$  为研究对象,探讨 IL-10 表达降低的可能机制,为 RA 防治提供思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物 Sprague Dawley (SD)大鼠,安徽医

models of renal ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** Rats were anesthetized with chloral hydrate (100 mg/kg) intraperitoneally, and then randomly divided into 5 groups ( $n = 20$  in each group) as follows: the Sham group, IRI group, Ru-30 group, and Ru-60 group. Blood and kidney samples were obtained for analysis after 48 h of reperfusion. **Results** The levels of blood BUN and Cr levels increased significantly, while the renal functions impaired severely in the IRI and NS groups, comparing with the Sham group ( $P < 0.01$ ). In addition, treating with 30 mg/kg and 60 mg/kg Ru evidently decreased renal MDA, serum BUN, Cr and NO levels, but increased renal SOD level, comparing with the IRI and NS groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** This study confirms that rutaecarpin exerts extensive anti-oxidative effects in IRI rat models. The mechanisms could be related to various physiopathological links of IRI. Ru may resist lipid peroxidation, and eliminate free radicals to alleviate renal ischemia reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress injury. Therefore, these findings demonstrate that rutaecarpin may be used as a compound to prevent or treat renal IRI.

**Key words** rutaecarpin; renal ischemia reperfusion injury; protective effects

科大学实验动物中心提供,清洁级,雌性,体质量(230 ± 20) g,动物合格证号:皖医实动准字 01 号。动物饲养环境模拟自然昼夜条件,自由饮水、进食,室温 18 ~ 22 °C,湿度 40% ~ 60%。

**1.2 主要药物与试剂** CFA、5-氮杂胞苷(5-azaC)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司;IL-10、甲基转移酶 1(DNMT1)、β-actin 引物序列由中国上海生工生物工程技术有限公司合成;甲基化特异性 PCR(MSP)引物序列由中国上海希匹吉生物工程公司合成;MSP 转化试剂盒购自德国 QIAGEN 公司;DNMT1、β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根酶抗山羊 IgG(H + L)、辣根酶山羊抗小鼠 IgG(H + L)购自北京中杉公司。

**1.3 实验方法**

**1.3.1 佐剂性关节炎(AA)模型大鼠建立** SD 大鼠使用足趾容积仪测定左、右后踝关节以下容积(ml)后,随机分为正常组、模型组。模型组使用 CFA(0.1 ml)注射于左后足趾皮内,正常组注射相同剂量 PBS。

**1.3.2 AA 模型大鼠鉴定**

**1.3.2.1 足爪肿胀度变化的测定** 致炎第 17 天、第 21 天、第 24 天、第 28 天后 检测继发侧大鼠关节足肿胀度程度(Δml = 致炎后容积 - 致炎前容积)。

**1.3.2.2 多发性关节炎指数(polyarthritis index, PI)评分** 记录第 17 天、第 21 天、第 24 天、第 28 天大鼠全身关节病变程度,按 5 级评分法计算 PI。0:无变化;1:足小趾关节红肿;2:趾关节、足跖出现红肿;3:踝关节以下出现红肿;4:包括踝关节均呈现红肿状态。根据大鼠关节红肿程度(不包括左后足)累计积分,计算出各只大鼠关节炎指数评分。

**1.3.2.3 大鼠膝关节滑膜组织病理检查** 注射 CFA 28 d 后,取大鼠膝关节进行常规石蜡包埋切片,HE 染色观察。

**1.3.3 PMΦ 的提取** 大鼠常规麻醉后,股动脉放血法处死,用新洁尔灭溶液浸泡消毒 5 min,腹腔注射 PBS(10 ml,4 °C),仰卧、平放、轻揉大鼠腹部。

静置 5 min 后吸取腹腔中液体。4 °C、1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;PBS 清洗,DMED 培养液重悬,加入 6 孔板,每孔 1 ml(2 × 10<sup>6</sup>/ml),于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 2 h,弃上清液, PBS 清洗,巨噬细胞为贴壁细胞。

**1.3.4 5-azaC 作用浓度与时间的确定** 将正常组与模型组细胞接种于 24 孔板后,进行细胞实验分组。正常组:对照组大鼠 PMΦ,加无血清培养基;模型组:AA 大鼠 PMΦ 加 LPS(2 μg/ml)刺激;5-azaC 作用模型组细胞 24 h 与 48 h 浓度梯度组:AA 大鼠 PMΦ 加 LPS(2 μg/ml)刺激,同时给予 5-azaC(1、5、10 μmol/L)作用 24 h 与 48 h;体积(1 ml/孔),平行孔(3 个/组),ELISA 法检测各组细胞上清液 IL-10 的表达,分析 5-azaC 作用的最佳浓度和时间。

**1.3.5 RT-PCR 法分析大鼠 PMΦ 中 IL-10、DNMT1 基因表达情况** TRIzol 法提取各组细胞总 RNA,参照试剂盒说明逆转录合成 cDNA,引物序列见表 1。PCR 反应产物由 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,各扩增产物对 β-actin 光密度值的比值表示目的基因的相对表达量。

**1.3.6 Western blot 法检测 DNMT1 蛋白水平** 各瓶细胞加入含 PMSF 的细胞裂解液 400 μl 于冰上裂解 30 min,后 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min。BCA 法测定蛋白浓度,以含 30 μg 蛋白的溶液体积为上样量(浓缩胶电泳 80 V,分离胶电泳 120 V),转膜 250 mA 4 h,封闭,漂洗后加入一抗 4 °C 过夜,加入二抗,60 min 轻摇,显影,分析条带吸光值(以 β-actin 为内参)。

**1.3.7 MSP 检测 IL-10 启动子区甲基化状态** 按试剂盒说明提取 DNA,亚硫酸氢钠处理,进行 MSP 检测,引物序列见表 2。1.5% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物混合上样缓冲液(恒压 160 V、60 min),凝胶图像分析系统进行图像分析。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 One-Way ANOVA 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 引物序列和 PCR 产物长度

基因	检索号	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
IL-10	NM_012854.2	F:GATTGCATCCGGGCTGACAA	252
		R:GATTCTGGGCCATGTTCTCTG	
DNMT1	NM_053354.3	F:GGAAAGGAGGAGACTACTAC	275
		R:TCTCACTTGGCCACCCACACA	
β-actin	NM_007393.3	F:TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC	350
		R:ACGCAGCTCAGTAACAGTCCC	

表2 MSP引物序列和产物长度

基因		引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
IL-10	methylated sequence	F: TTTTAAGTTTGGGACGTTATAAAAC R: CTCGTAATCACAATAACGTACATAA	411
	unmethylated sequence	F: TTTTTTAAAGTTTGGGATGTTATAAAAT R: CACTCATAAATCACAATAACATACATAAA	

## 2 结果

### 2.1 AA模型大鼠的建立及评价

**2.1.1 AA模型大鼠整体评价** 正常组大鼠四肢状态正常, 食饮如常, 皮毛光泽。模型组大鼠体重降低, 因关节红肿不便爬行, 轻度脱毛且毛色黯淡无光。注射CFA后第14天, 观察到关节红肿, 部分大鼠耳、尾可见炎性结节和红斑; 第17天, 部分大鼠关节负重能力减弱; 第24天~第28天左右, 部分大鼠关节出现畸形, 严重影响四肢活动及进食, 关节炎肿胀达到高峰。

**2.1.2 AA模型大鼠继发性足肿胀变化** 大鼠造模第17天后, 可见关节肿胀度显著增加, 并日趋严重, 在第28天肿胀最为显著, 与正常组比较, 差异具有统计学意义(表3)。

表3 大鼠足肿胀度变化情况( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	足肿胀体积( $\Delta$ ml)			
	第17天	第21天	第24天	第28天
正常	0.21 ± 0.04	0.25 ± 0.10	0.27 ± 0.06	0.30 ± 0.03
模型	0.67 ± 0.07**	0.79 ± 0.18**	0.87 ± 0.16**	0.86 ± 0.20**

与正常组比较: \*\* $P < 0.01$

**2.1.3 AA大鼠多发性关节炎足爪评分** 造模第17天后, 实验通过多发性关节炎足爪评分显示, AA模型大鼠未注射CFA的其余3个肢体关节, 出现了红肿、变形、行动不便; 第28天达到最高峰, 结果见图1。后期实验以造模28d为研究对象。

**2.1.4 AA模型大鼠膝关节组织病理学检查** 病

理检查显示, 正常组大鼠关节囊滑膜细胞有2~3层, 且细胞排列规则, 未见滑膜组织增生和形成的血管翳(图2A)。与正常大鼠比较, 模型组大鼠发生炎性细胞浸润, 可见滑膜层变厚, 与滑膜细胞呈乳头状突起增生, 且细胞排列紊乱有关, 亦可见滑膜下层纤维组织增生, 血管翳形成(图2B、2C)。

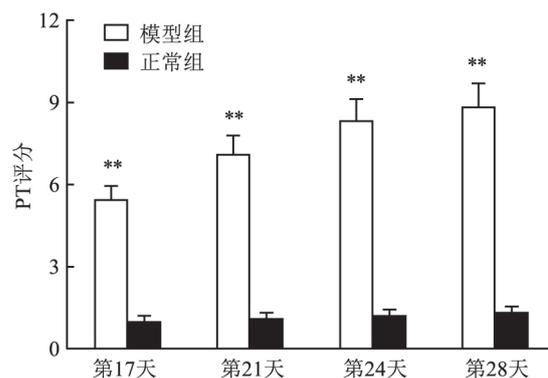


图1 大鼠PI评分  
与正常组比较: \*\* $P < 0.01$

### 2.2 AA模型大鼠PMΦ中IL-10表达的变化及机制

**2.2.1 5-azaC对AA模型大鼠PMΦ分泌IL-10的影响** ELISA检测显示, 与正常组PMΦ分泌IL-10比较, AA组PMΦ IL-10含量明显降低, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与AA组比较, 用浓度分别为1、5、10  $\mu\text{mol/L}$ 的5-azaC刺激AA组PMΦ细胞24h和48h, 可不同程度提高IL-10的含量; 5  $\mu\text{mol/L}$ 作用48h促进IL-10升高最为显著( $P < 0.01$ )(表4)。5  $\mu\text{mol/L}$ 、48h作为后期实验浓度和时间。

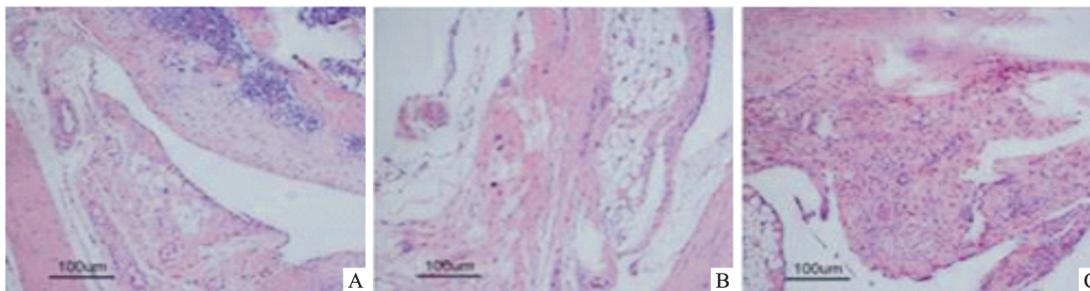


图2 大鼠膝关节组织学检查  $\times 10$   
A 正常组; B、C: 模型组

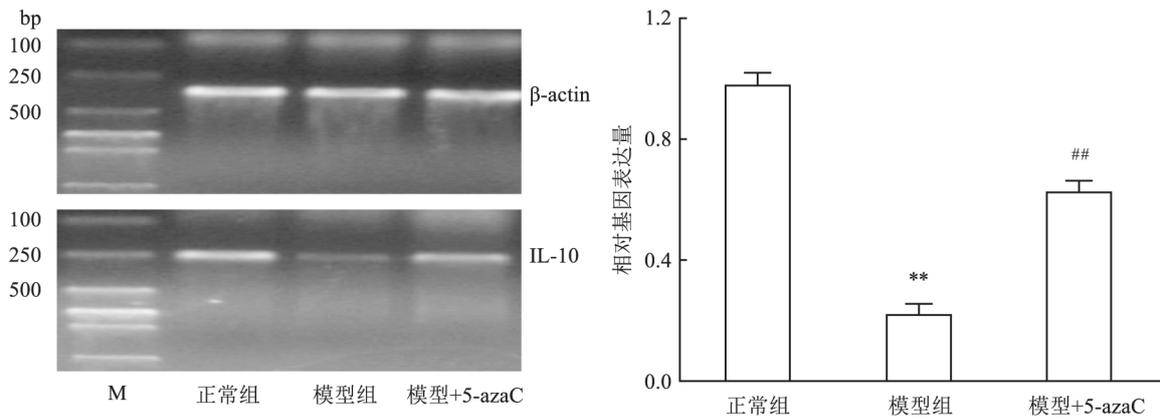


图3 RT-PCR法检测AA大鼠PMΦ中IL-10基因表达情况  
M:Marker;与正常组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较:## $P < 0.01$

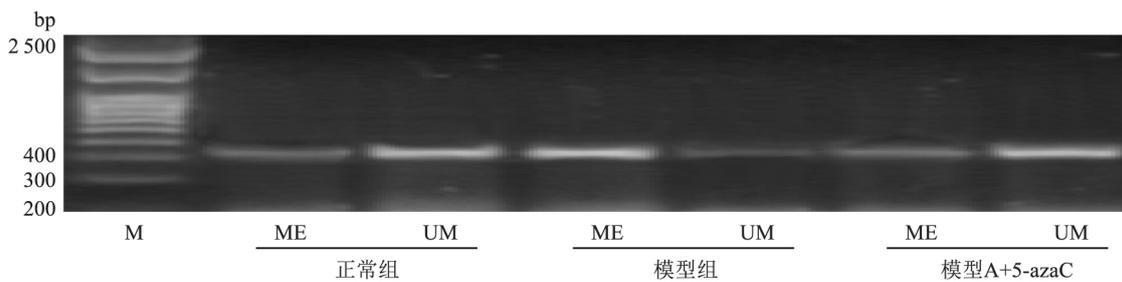


图4 MSP法分析AA大鼠PMΦ中IL-10启动子甲基化状态  
M:Marker; ME:甲基化扩增;UM:非甲基化扩增

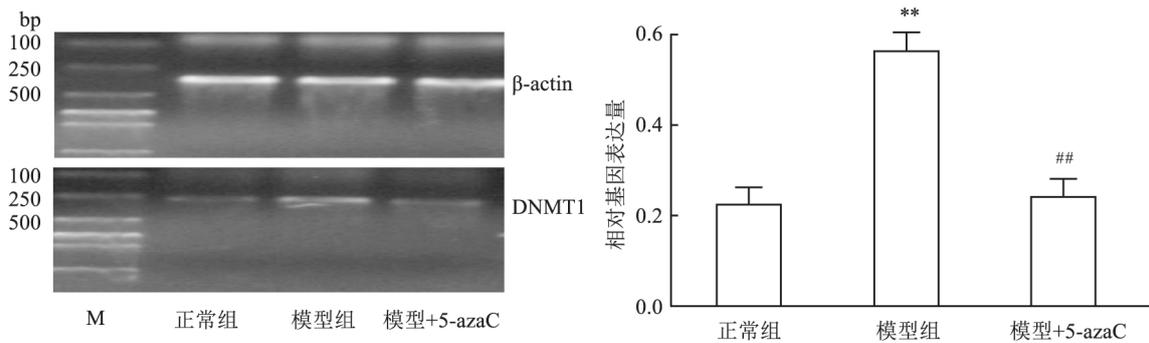


图5 RT-PCR法检测AA大鼠PMΦ中DNMT1基因表达情况  
M:Marker;与正常组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较:## $P < 0.01$

2.2.2 5-azaC对AA模型大鼠PMΦ产生IL-10 mRNA的影响 应用RT-PCR检测大鼠PMΦ中IL-10基因表达变化显示,与正常组比较,模型组大鼠PMΦ细胞中IL-10的mRNA表达明显降低;给予5-azaC(5 μmol/L)干预后,与模型组比较,IL-10的mRNA表达明显升高(图3)。提示模型组大鼠PMΦ细胞中IL-10表达降低可能与甲基化有关。

2.2.3 5-azaC对AA模型大鼠PMΦ的IL-10启动子甲基化的影响 实验进一步通过MSP检测,在AA模型大鼠PMΦ中,IL-10启动子区发生高甲基化改变,而正常组大鼠PMΦ中,IL-10启动子区则处于低甲基化状态;应用5-azaC处理可降低AA模

型大鼠PMΦ中IL-10启动子区高甲基化状态(图4)。提示AA模型大鼠PMΦ中IL-10表达降低与其启动子发生甲基化有关。

2.3 AA模型大鼠PMΦ的DNMT1的mRNA变化 为了进一步探讨IL-10发生甲基化的机制,应用RT-PCR检测DNMT1的基因表达变化。结果显示,与正常组比较,模型组大鼠PMΦ中DNMT1的mRNA表达明显上升,差异有统计学意义;给予5-azaC(5 μmol/L)干预显示,与模型组比较,5-azaC可明显降低DNMT1的mRNA表达(图5)。

2.4 AA大鼠PMΦ的DNMT1的蛋白表达变化 应用Western blot检测AA大鼠PMΦ中DNMT1的

蛋白表达变化,结果显示模型组大鼠 PMΦ 中 DNMT1 蛋白的表达明显上升,与正常组比较差异有统计学意义;与模型组比较,5-azaC (5 μmol/L) 刺激后 DNMT1 蛋白表达明显降低(图 6)。上述结果表明 IL-10 发生甲基化的同时, DNMT1 的表达同样呈现显著性变化,IL-10 的甲基化可能与 DNMT1 相关。

表 4 5-azaC 在不同浓度和时间刺激细胞后的 IL-10 的表达变化 (n=6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (LPS 2 μg/ml)	IL-10 (pg/ml)	F 值
正常	-	400.96 ± 21.82	35.6
模型	+	291.53 ± 22.48**	
24 h			
模型 + 5-azaC			
5-azaC(1 μmol/L)	+	328.24 ± 30.30#	66.9
5-azaC(5 μmol/L)	+	362.75 ± 35.12##	33.8
5-azaC(10 μmol/L)	+	372.93 ± 21.86##	23.4
48 h			
模型 + 5-azaC			
5-azaC(1 μmol/L)	+	362.93 ± 36.81##	43.2
5-azaC(5 μmol/L)	+	373.50 ± 33.21##	40.1
5-azaC(10 μmol/L)	+	369.18 ± 28.99##	38.5

与正常组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05, ## P <

0.01

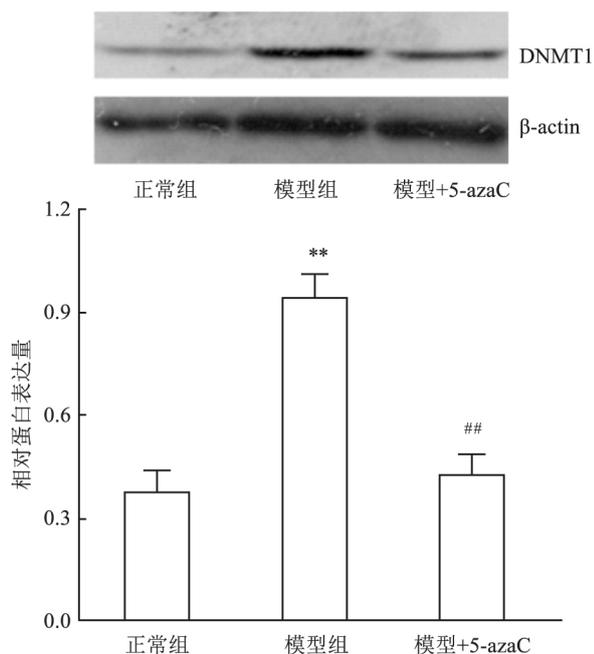


图 6 Western blot 法检测 AA 大鼠 PMΦ DNMT1 蛋白表达情况

与正常组比较: \*\* P < 0.01; 与模型组比较: ## P < 0.01

### 3 讨论

RA 的主要病理特征是炎性细胞浸润促进了滑

膜组织增生,引起骨和软骨破坏。RA 是影响关节功能的主要疾病之一,探讨其发病机制,为临床寻找可能的作用靶点,是亟待解决的问题。合适的动物模型是研究 RA 发病机制的重要参考。以 CFA 诱导大鼠,炎性细胞浸润、滑膜增厚、足肿胀显著、骨及软骨的侵蚀等病理特征与 RA 相似<sup>[5]</sup>,已作为研究 RA 发病的主要的动物模型。本实验通过注射 CFA 诱导 AA 模型,结果显示,与正常组比较,AA 大鼠膝关节显著红肿、爬行困难,且大鼠足肿胀度、PI 显著高于正常组;病理检查显示,大鼠膝关节滑膜组织存在明显的炎性细胞浸润及血管翳形成,关节囊滑膜增生呈乳头状突起,滑膜下层纤维组织明显增厚,提示 AA 模型建立成功。

RA 发病机制复杂,研究<sup>[3,6]</sup>报道,在 RA 的病理过程中,巨噬细胞作为参与炎症反应的始动细胞,释放多种炎症因子,使得细胞因子平衡被打破,促进了 RA 的发生和发展。调节 RA 发病过程中紊乱的细胞因子可能为防治 RA 提供思路。抑炎因子 IL-10 具有广泛的生物学活性,参与炎症性肠病、系统性红斑狼疮(SLE)等多种疾病病程。文献<sup>[7-8]</sup>报道,IL-10 亦参与了 RA 的病程,在 RA 患者中,存在着 IL-10 表达降低。本实验以大鼠 PMΦ 为研究对象,结果亦显示,大鼠 PMΦ 中 IL-10 mRNA 及其分泌的 IL-10 蛋白表达显著减少,表明 IL-10 的缺失可能是细胞因子网络功能紊乱的一个重要原因。但 IL-10 表达减少其机制还不明确。

近期有研究<sup>[9-10]</sup>证实,表观遗传修饰参与了炎症免疫性疾病(包括 RA)的发生发展过程。DNA 甲基化作为表观遗传修饰方式的一种,S-腺苷甲硫氨酸是其甲基供体,由 DNA 甲基转移酶(DNMT)将的甲基化基团催化转移到 DNA 分子中,形成 5-甲基胞嘧啶(5-mC),从而引起相关基因突变和转录沉默。多种的疾病的发生过程中均出现 IL-10 发生甲基化<sup>[11]</sup>。为了探明 IL-10 表达减少机制,实验应用去甲基化试剂 5-azaC 处理大鼠 PMΦ,结果显示,5-azaC 可明显增加 IL-10 的 mRNA 表达与蛋白分泌,提示 AA 大鼠 PMΦ 中 IL-10 降低,可能与其启动子区域发生甲基化有关。进一步应用 MSP 研究显示,在 AA 大鼠 PMΦ 中 IL-10 启动子区域发生了高甲基化。表明 IL-10 表达降低与其启动子区域高甲基化密切相关。DNMT1 为催化并维持 DNA 甲基化的重要蛋白。本实验亦观察了其表达变化,结果显示,AA 大鼠 PMΦ 中,与正常组比较,伴随着 IL-10 下降, DNMT1 mRNA 和蛋白表达明显升高,表明在 AA

大鼠中 IL-10 表达降低与其启动子甲基化有关,而 DNMT1 可能是促进其发生甲基化的原因之一。

以上实验结果提示,IL-10 可能参与 RA 发病过程中炎症因子失衡,IL-10 表达的降低与其启动子区域高甲基化状态有关, DNMT1 可能参与了 IL-10 的高甲基化形成。

### 参考文献

- [1] McInnes I B, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis[J]. *Lancet* 2017, 389(10086):2328-37.
- [2] Xie L, Fu Q, Ortega T M, et al. Overexpression of IL-10 in C2D macrophages promotes a macrophage phenotypic switch in adipose tissue environments[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86541.
- [3] Karouzakis E, Neidhart M, Gay R E, et al. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction[J]. *Immunol Lett* 2006, 106(1):8-13.
- [4] Cifuentes-Zuniga F, Arroyo-Jousse V S, Ito-Carrasco G, et al. IL-10 expression in macrophages from neonates born from obese mothers is suppressed by IL-4 and LPS/INFgamma[J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(12):3693-701.
- [5] Chandrasekar R, Kumar B L, Jayakumar R, et al. Evaluation of clinical and cytogenetic parameters in rheumatoid arthritis patients for effective diagnosis[J]. *Clin Chim Acta* 2015, 439:77-83.
- [6] Ren D Y, Xu T, Li R, et al. 5,7,3'-Triacetyl hesperetin suppresses adjuvant-induced arthritis in rats through modulating JAK2/STAT3 pathway[J]. *Am J Chin Med* 2013, 41(3):601-14.
- [7] Guggino G, Giardina A, Ferrante A, et al. The in vitro addition of methotrexate and/or methylprednisolone determines peripheral reduction in Th17 and expansion of conventional Treg and of IL-10 producing Th17 lymphocytes in patients with early rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatol Int* 2015, 35(1):171-5.
- [8] Li N, Ma T, Han J, et al. Increased apoptosis induction in CD4+CD25+Foxp3+ T cells contributes to enhanced disease activity in patients with rheumatoid arthritis through IL-10 regulation[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014, 18(1):78-85.
- [9] Miao C G, Yang Y Y, He X, et al. New advances of DNA methylation and histone modifications in rheumatoid arthritis, with special emphasis on MeCP2[J]. *Cell Signal* 2013, 25(4):875-82.
- [10] Miao C G, Huang C, Huang Y, et al. MeCP2 modulates the canonical Wnt pathway activation by targeting SFRP4 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes in rats[J]. *Cell Signal* 2013, 25(3):598-608.
- [11] Viana M B, Cardoso F P, Diniz M G, et al. Methylation pattern of IFN-gamma and IL-10 genes in periodontal tissues[J]. *Immunobiology* 2011, 216(8):936-41.

## The methylation of IL-10 promoters in peritoneal macrophage from rats of adjuvant-induced arthritis

Song Yang<sup>1,2,3</sup>, Li Jun<sup>1,3</sup>, Xie Dan<sup>1,3</sup> et al

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Pain, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>3</sup>The Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Anhui Province, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To evaluate the methylation status of IL-10 on peritoneal macrophages (PM $\Phi$ ) in adjuvant-induced arthritis (AA) rats. **Methods** Complete Freund's adjuvant (CFA) was used to induce AA in rats. Peritoneal macrophages (PM $\Phi$ ) from healthy controls and AA rats were isolated. The PM $\Phi$  from AA rats were stimulated with 5-azaC. The expressions of IL-10, DNMT1 mRNA were detected by RT-PCR analysis. Detected the expression of IL-10 in PM $\Phi$  culture supernatant by ELISA. The methylation status of IL-10 promoter was determined by methylation specific polymerase chain reaction (MSP). The expression of protein of DNMT1 was measured by Western blot analysis. **Results** Under standard growth conditions, IL-10 expression was significantly decreased and its promoter was methylation with the rise of DNMT1 in PM $\Phi$  from AA rats. 5-azaC treatment reverse the methylation of IL-10 promoters and up-regulated its expression in these two cells, which downregulated mRNA and protein levels of DNMT1. **Conclusion** The CpG island in the IL-10 gene promoter is specifically methylated to down-modulate the expression of IL-10 protein in PM $\Phi$  from AA rats. It may plays a role in the pathogenesis of RA.

**Key words** adjuvant arthritis; peritoneal macrophages; IL-10; DNA methylation; DNMT1