

西维来司钠对实验性自身免疫性脑脊髓炎模型大鼠的保护作用

周游^{1*}, 张伶俐², 杨元¹, 张淑江¹, 李作孝^{1#} (1. 泸州医学院附属医院, 四川 泸州 646000; 2. 四川大学华西医院, 成都 610041)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0903-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.12

摘要 目的: 研究西维来司钠对实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型大鼠的保护作用。方法: 取Wistar大鼠60只, 随机分为正常对照(生理盐水)组、模型(生理盐水)组、阳性药物[醋酸泼尼松片5 mg/(kg·d)]组和西维来司钠低、中、高剂量[5、8、10 mg/(kg·d)]组, 每组10只。除正常对照组不作处理外, 其余各组大鼠均以全脊髓匀浆作为免疫抗原建立EAE模型, 建模当天开始ip给予相应药物, 连续16 d。对各组大鼠神经功能进行评分, 观察其脑和脊髓组织病理学变化, 检测其外周血中干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素4(IL-4)、巨噬细胞炎性蛋白1 α (CCL3)和调节活化正常T细胞表达与分泌的趋化因子(CCL5)的含量。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠的神经功能评分和IFN- γ 、CCL3、CCL5含量增加, IL-4含量降低($P < 0.01$), 组织呈现髓鞘脱失和炎性细胞浸润。与模型组比较, 阳性药物组和西维来司钠低、中、高剂量组大鼠的神经功能评分和CCL3、CCL5含量降低($P < 0.01$), 髓鞘改变和炎性细胞浸润均减轻, 阳性药物组和西维来司钠高剂量组大鼠的IFN- γ 含量降低, IL-4含量增加, 西维来司钠中剂量组大鼠IL-4含量增加($P < 0.01$), 其余各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述效果均呈剂量依赖性。结论: 西维来司钠能有效减轻EAE模型大鼠髓鞘脱失和炎症细胞浸润, 其机制可能与减少外周血中IFN- γ 含量、增加IL-4含量、抑制CCL3和CCL5表达有关。

关键词 西维来司钠; 实验性自身免疫性脑脊髓炎; 大鼠; 干扰素 γ ; 白细胞介素4; 巨噬细胞炎性蛋白1 α

Protective Effect of Sivelestat Sodium on Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Model Rats

ZHOU You¹, ZHANG Lingshu², YANG Yuan¹, ZHANG Shujiang¹, LI Zuoxiao¹ (1. The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of sivelestat sodium on experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model rats. METHODS: 60 Wistar rats were randomly divided into normal control group (normal saline), model group (normal saline), positive drug group [prednisone acetate tablets 5 mg/(kg·d)] and sivelestat sodium low-dose, middle-dose and high-dose groups [5, 8, 10 mg/(kg·d)] with 10 rats in each group. Except for normal control group, other groups were given guinea pig spinal cord homogenate as antigen to produce EAE model, and then given relevant medicine ip since the same day of modeling, for consecutive 16 d. The neurologic function of mice was scored, and pathological changes of brain and spinal cord were observed; the content of IFN- γ , IL-4, CCL3, chemotactic factor CCL5 regulating and activating normal T cell expression and secretion were determined. RESULTS: Compared with normal control group, neurological function score and the content of IFN- γ , CCL5 and CCL3 increased, while IL-4 content decreased ($P < 0.01$); myelinoclasia and inflammatory cell infiltration occurred. Compared with model group, neurological function score and the content of CCL3 and CCL5 decreased in positive drug group and sivelestat sodium low-concentration, medium-concentration and high-concentration groups ($P < 0.01$); both myelinoclasia and inflammatory cell infiltration relieved; the content of IFN- γ decreased, while IL-4 content increased in positive drug group and sivelestat sodium high-concentration group; IL-4 content increased in sivelestat sodium medium-concentration group ($P < 0.01$); there was no statistical significance in other groups ($P > 0.05$). Above effect depended on drug dose. CONCLUSIONS: Sivelestat sodium can relieve myelinoclasia and inflammatory cell infiltration, and the mechanism may be related to the decrease of IFN- γ content, the increase of IL-4 content, and inhibition of CCL3 and CCL5 expression in peripheral blood.

KEYWORDS Sivelestat sodium; Experimental autoimmune encephalomyelitis; Rat; IFN- γ ; IL-4; CCL3

多发性硬化(Multiple sclerosis, MS)是一种常见的以中枢神经系统(Central nervous system, CNS)炎性脱髓鞘病变为特征的自身免疫性疾病。实验性自身免疫性脑脊髓炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型是目前国内外公认研究MS的经典动物模型。

西维来司钠(Sivelestat sodium)是人工合成的低分子质量

* 硕士研究生。研究方向: 神经免疫。E-mail: 393616720@qq.com

通信作者: 主任医师。研究方向: 神经免疫。电话: 0830-3165660。E-mail: lzx3235@sina.com

的中性粒细胞弹性蛋白酶(Neutrophil elastase, NE)特异性抑制剂, 除了具有清除自由基、减轻炎症反应、抑制肿瘤发生的功能外, 近年来发现其可以通过抑制NE活性发挥明显的神经保护作用^[1]。目前已将其用于脑血管、脑外伤等病的治疗研究。本研究以全脊髓匀浆(Guinea pig spinal cord homogenate, GPSCH)作为免疫原诱发大鼠EAE模型, 观察西维来司钠对EAE模型大鼠的神经功能评分及外周血分泌干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素4(IL-4)、巨噬细胞炎性蛋白1 α (MIP-1 α , 又称CCL3)及调节活化正常T细胞表达与分泌的趋化因子(CCL5)的影响, 探讨其在EAE模型大鼠发病中的保护作用及其免疫学机制。

1 材料

1.1 仪器

TJ-6低温离心机(美国 Beckman 公司,离心半径:10 cm);倒置光学显微镜(日本 Olympus 光学仪器公司);722 光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 药品与试剂

西维来司钠冻干粉末(上海巨龙药物研究开发有限公司,批号:201677-61-4,规格:每瓶 100 mg);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:140146,规格:每片 5 mg);完全弗氏佐剂(CFA,美国 Sigma 公司;规格:每支 10 ml,含灭活结核杆菌 1 mg/ml);皮内注射用卡介苗(成都市生物制品研究所;批号:S20013057;规格:含卡介苗 0.5 mg);水合氯醛溶液(苏州正兴化工厂);大鼠 IL-4、IFN- γ 酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司);大鼠 CCL3、CCL5 ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems 公司)。

1.3 动物

SPF 级 Wistar 大鼠,♀,7~8 周龄,体质量 160~180 g;健康成年豚鼠 10 只,♀ ♂ 不分,体质量 400~450 g,均购自泸州医学院实验动物中心,实验动物使用许可证号:SCXK(川)2013-17。

2 方法

2.1 免疫抗原的制备

将豚鼠处死后,在无菌操作下,在冰上迅速剪开枕骨及椎管,剥出脊髓,去掉马尾与脊膜,称质量后,在冰浴中加入等量无菌冰生理盐水,用手动匀浆器将其制成 50% 的豚鼠 GPSCH。用两个 10 ml 的无菌玻璃注射器经三通管对接,用封口胶来回缠好。一个加入等量的 CFA 与卡介苗混合液(其中卡介苗含量为 5 mg/ml),另一个装 GPSCH,按 1:1 比例,各 5 ml。两人轮流推动注射器,一人推的时候另一个人就松开注射器,在冰上反复抽打约 1 h 至抗原乳液成 W/O 型,即为免疫抗原。将其置于 4 ℃ 的冰箱内保存并于 12 h 内用完。

2.2 分组与给药

将 60 只大鼠随机分为 6 组:正常对照(生理盐水)组、模型(生理盐水)组、阳性药物[醋酸泼尼松片 5 mg/(kg·d)]组和西维来司钠低、中、高剂量[5、8、10 mg/(kg·d)]组,每组 10 只。在严格无菌条件下,从大鼠鼠爪的根部向趾尖处的足垫内皮下注射免疫抗原(0.2 ml/100 g)建立 EAE 模型,正常对照组注射等量生理盐水。在拔出针头前按压住针眼数分钟,防止乳剂外漏。各组大鼠自建模后第 1 天开始(建模当天记为第 1 天)分别 ip 等量相应药物,连续 16 d。

2.3 一般情况与神经功能评分

观察各组大鼠一般情况。大鼠免疫后(建模过程即为免疫过程,故建模成功即为大鼠免疫成功),每天同一时间(上午 9:00)由同一人对各组大鼠进行称质量及神经功能评分。具体评分标准:0 分,无明显异常;1 分,后肢不全瘫痪;2 分,后肢完全瘫痪;3 分,后肢全瘫伴前肢不全瘫;4 分,四肢全瘫或死亡。症状介于两条标准之间者以 ± 0.5 分计。

2.4 组织病理学变化

于大鼠发病高峰期(第 16 天)每组取 2 只大鼠,ip 10% 水合氯醛,待大鼠完全麻醉后打开胸腔,左心室灌注预冷生理盐水 20 ml,用 4% 中性甲醛灌注固定,解剖分离脑和脊髓组织,放入 4% 中性甲醛固定 24 h。石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色观察脑和脊髓组织炎性细胞浸润情况。

2.5 外周血中 IFN- γ 、IL-4、CCL3 和 CCL5 含量测定

于大鼠发病高峰期(第 16 天)取大鼠眼球血 4 ℃ 冰箱过夜,待血凝块收缩后,以离心半径为 10 cm、2 500 r/min 离心 10 min,吸取上层澄清的血清,所得血清-20 ℃ 保存,按相关 ELISA 试剂盒操作方法测定各组大鼠外周血中 IFN- γ 、IL-4、CCL3 和 CCL5 的含量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料采用百分比表示,对样本数先行方差齐性检验,方差齐时用 One-way ANOVA 检验;方差不齐时用 Kruskal-Wallis *H* 检验比较总体差异,Mann-Whitney *U* 检验进行两组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况与神经功能评分情况

正常对照组大鼠无明显异常,其余各组大鼠均发病,主要表现为精神萎靡、活动减少、体质量下降、摄食减少及注射部位皮肤红肿、破溃。注射抗原 12 d 后,模型组大鼠逐渐出现神经功能障碍症状,表现为双后肢或双后肢伴前肢不同程度的瘫痪,尿便失禁,甚至死亡。与模型组比较,阳性药物组和西维来司钠低、中、高剂量组大鼠上述症状均减轻,潜伏期相对较长,无死亡。

与正常对照组比较,模型组大鼠神经功能评分增加($P < 0.01$);与模型组比较,阳性药物组和西维来司钠低、中、高剂量组大鼠神经功能评分减少($P < 0.01$);与西维来司钠低剂量组比较,阳性药物组和西维来司钠高剂量组大鼠神经功能评分减少($P < 0.01$)。各组大鼠神经功能评分见表 1。

表 1 各组大鼠神经功能评分

Tab 1 Neurologic function score of rats in each group						
组别	<i>n</i>	1分,只	2分,只	3分,只	4分,只	神经功能评分
正常对照组	10	0	0	0	0	0
模型组	10	0	3	4	3	2.86 $\pm$ 0.31*
阳性药物组	10	7	1	2	0	0.31 $\pm$ 0.17** ^Δ
西维来司钠低剂量组	10	3	3	3	1	1.64 $\pm$ 0.22**
西维来司钠中剂量组	10	3	4	2	1	1.29 $\pm$ 0.48**
西维来司钠高剂量组	10	5	3	2	0	0.46 $\pm$ 0.13** ^Δ
<i>F</i>						84.37
<i>P</i>						<0.01

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.01$;与西维来司钠低剂量组比较,^Δ $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.01$; vs. sivelestat sodium low-dose group, ^Δ $P < 0.01$

3.2 组织病理学变化

正常对照组大鼠脑和脊髓无异常。模型组大鼠发病高峰期可见组织疏松肿胀;血管周围主要是小静脉周围可见大量炎性细胞浸润,主要为单个核细胞,呈典型“袖套”样改变,血管周围白质明显脱髓鞘改变。西维来司钠低、高剂量组大鼠脱髓鞘改变及炎性细胞浸润较模型组明显减轻,且高剂量组病理改变程度最轻。这证明 EAE 建模成功,西维来司钠可减轻 EAE 模型大鼠的病理损害,且效果与剂量有关。各组大鼠脑组织病理学变化见图 1。

3.3 外周血中 IFN- γ 、IL-4、CCL3 和 CCL5 含量比较

与正常对照组比较,模型组大鼠外周血中 IFN- γ 、CCL3、CCL5 含量增加,IL-4 含量降低($P < 0.01$)。与模型组比较,阳性药物组和西维来司钠低、中、高剂量组大鼠外周血中 CCL3、CCL5 含量降低($P < 0.01$),阳性药物组和西维来司钠高剂量组大鼠外周血中 IFN- γ 含量降低、IL-4 含量增加,西维来司钠中剂量组大鼠外周血中 IL-4 含量增加($P < 0.01$),与西维来司钠剂

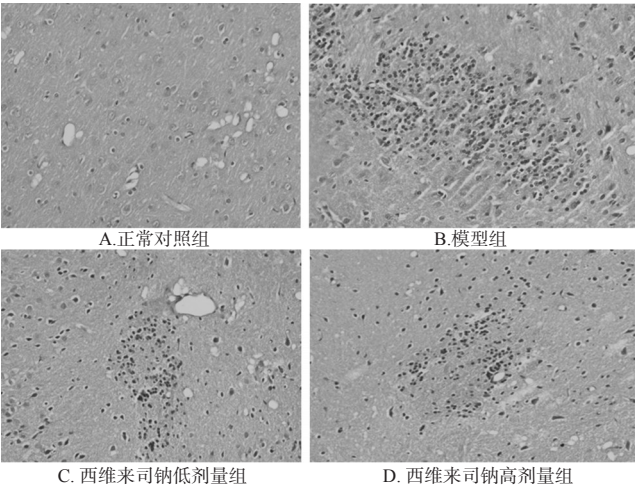


图1 各组大鼠脑组织病理学变化(×400)

Fig 1 Histopathological change of cerebral tissue of rats in each group(×400)

量组比较,西维来司高剂量组大鼠上述指标改善效果更明显($P<0.01$),其余各组差异无统计学意义($P>0.05$)。上述效果均呈剂量依赖性。各组大鼠外周血中IFN- γ 、IL-4、CCL3和CCL5含量比较见表2。

表2 各组大鼠外周血中IFN- γ 、IL-4、CCL3和CCL5含量比较($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/ml}$)

Tab 2 Comparison of the contents of IFN- γ , IL-4, CCL3 and CCL5 in peripheral blood of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=10, \text{ng/ml}$)

分组	IFN- γ	IL-4	CCL3	CCL5
正常对照组	0.22 $\pm$ 0.02	20.27 $\pm$ 0.95	118.21 $\pm$ 11.27	151.19 $\pm$ 9.51
模型组	0.39 $\pm$ 0.03*	11.69 $\pm$ 0.94*	264.38 $\pm$ 15.23*	321.52 $\pm$ 11.37*
阳性药物组	0.24 $\pm$ 0.10 [#] Δ	18.53 $\pm$ 0.77 [#] Δ	143.26 $\pm$ 21.53 [#] Δ	203.87 $\pm$ 13.91 [#] Δ
西维来司钠低剂量组	0.33 $\pm$ 0.02*	14.45 $\pm$ 0.44*	159.21 $\pm$ 8.82 [#]	229.27 $\pm$ 13.35 [#]
西维来司钠中剂量组	0.34 $\pm$ 0.05*	16.43 $\pm$ 0.82 [#]	179.82 $\pm$ 6.91 [#]	241.29 $\pm$ 18.54 [#]
西维来司钠高剂量组	0.27 $\pm$ 0.02 [#] Δ	18.37 $\pm$ 0.61 [#] Δ	199.34 $\pm$ 9.36 [#] Δ	267.25 $\pm$ 11.24 [#] Δ
F	104.75	253.77	100.35	243.51
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.05

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与西维来司钠低剂量组比较, Δ $P<0.01$

Note: vs. blank control group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$; vs. sivelestat sodium low-dose group, Δ $P<0.01$

4 讨论

目前认为MS是多种因素作用下免疫系统异常而出现的CNS自身免疫性脱髓鞘疾病,主要由CD4⁺T细胞介导。其特征为CNS的小血管周围出现单个核细胞浸润及髓鞘脱失^[2]。而EAE因与MS在发病机制、临床表现及免疫学特点等方面极为相似,因此EAE是目前公认研究MS的最为理想的动物模型。由于EAE的发病机制目前被认为是免疫因素介导的炎症性病变,故以糖皮质激素为主要药物的免疫抑制治疗是治疗EAE的经典方案,因此本研究以标准剂量泼尼松作为阳性药物用以评价研究药物的治疗效果。

NE是一种主要由中性粒细胞释放的弹性蛋白酶,一方面其能够影响炎症细胞的黏附和迁移,另一方面能够诱导多种细胞因子的分泌从而促进炎症反应的发展^[3]。由于EAE是一种由免疫因素介导的炎症反应,有研究表明NE也参与了EAE的发病过程。西维来司钠是一种NE的特异性抑制剂,近年来,越来越多的学者关注到其对中枢神经系统的保护作用。

Saadoun S等^[4]的研究表明西维来司钠可抑制NE,减少中性粒细胞的聚集活化,减轻视神经脊髓炎的中性粒细胞浸润,从而减轻其急性期的CNS损伤。EAE模型是一种获得性的髓鞘脱失的动物模型,是由特异性的CD4⁺T细胞为主介导的中枢神经系统小血管周围淋巴细胞浸润以及髓鞘脱失的自身免疫性病变。CD4⁺T细胞主要分为Th1细胞和Th2细胞两类。IFN- γ 主要由Th1细胞分泌,调节中性粒细胞募集到CNS,由于其可破坏血脑屏障(BBB)和产生活性氧,被认为可促进EAE的发展^[5]。IL-4是由Th2细胞分泌,抑制IFN- γ 的分泌,发挥强大的抗炎作用^[6]。目前认为EAE的发生发展与Th1/Th2细胞比例失衡有关。本研究结果发现,模型组大鼠外周血中IFN- γ 含量较正常对照组明显增加,而IL-4含量明显降低,这也证实炎症反应参与了MS的发病过程。通过西维来司钠对EAE模型大鼠的干预发现,高剂量能明显降低IFN- γ 含量,中、高剂量能增加IL-4含量,且这一现象呈剂量依赖性,表明西维来司钠对抑制EAE模型大鼠炎症介质的释放和促进抗炎因子的释放均具有良好的作用。此外,通过与干预后各组大鼠一般情况及神经功能评分比较,各组大鼠外周血中IFN- γ 、IL-4含量变化趋势与神经功能评分变化呈一定相关性,由此笔者推测,IFN- γ 、IL-4平衡的紊乱可能参与了MS发病过程。

以往认为,中性粒细胞在MS和EAE的发生发展中作用较小,然而,Thiele S等^[7]在BALB/c小鼠的EAE模型中发现星形胶质细胞可表达趋化因子CCL3和CCL5,诱导刺激大量中性粒细胞迁移至CNS,产生类似Th1细胞的炎症作用,下调Th2细胞表达,从而参与EAE的发生发展。此外,目前认为CCL3和CCL5与体内多种炎症性疾病关系密切^[8-9]。作为趋化因子的一种,CCL3和CCL5能调节并活化正常T细胞的表达与分泌,从而参与机体的免疫过程。另外,Wu F等^[10]在C57BL/6小鼠的EAE模型发病高峰期的脱髓鞘和轴突变性病灶中检测到大量中性粒细胞,由此认为在EAE急性期中性粒细胞可能有助于脱髓鞘和轴突变性,在EAE发病机制中发挥比以前认为的更大的作用。本研究通过观察各组大鼠外周血CCL3和CCL5含量发现,上述趋化因子在EAE模型组中明显升高提示CCL3和CCL5可能参与了EAE的发病过程,而这一过程可继续引发中性粒细胞等炎症细胞的聚集。而在西维来司钠干预后,CCL3和CCL5呈下降趋势且呈剂量依赖性,提示西维来司钠可能在源头抑制EAE的炎症反应。

综上所述,西维来司钠对EAE有一定的改善作用,可减轻CNS的炎症细胞浸润、髓鞘脱失和轴突损伤,其机制可能与减少外周血中IFN- γ 含量、增加IL-4含量、抑制CCL3和CCL5表达有关。

参考文献

[1] 马铁军,高宗科,王毅,等.新型弹性蛋白酶抑制剂——西维来司钠的神经保护作用[J].国际神经病学神经外科学杂志,2011,38(04):378.

[2] 苏宁.白细胞介素7及其受体通路异常在多发性硬化症自然杀伤细胞中的研究[D].天津:天津医科大学,2014.

[3] 黄艳,王波,董志,等.西维来司钠对脑出血模型大鼠脑组织损伤的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(41):3879.

[4] Saadoun S, Waters P, MacDonald C, et al. Neutrophil protease inhibition reduces neuromyelitis optica-immunoglobulin G-induced damage in mouse brain[J]. Ann Neurol, 2012, 71(3):323.

[5] Miller NM, Wang J, Tan Y, et al. Anti-inflammatory mechanisms of IFN- γ studied in experimental autoimmune

注射用胸腺法新对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响

杨兆辉^{1*}, 段瑞祥², 杨 晶³, 熊姝妮¹, 郎建敏¹ (1. 青岛经济技术开发区第一人民医院呼吸科, 山东 青岛 266555; 2. 山东省医学科学院糖尿病医院外科, 济南 250014; 3. 枣庄矿业集团枣庄医院外五科, 山东 枣庄 277100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)07-0906-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.07.13

摘要 目的: 研究注射用胸腺法新对人肺癌 A549 细胞凋亡的影响。方法: 以 0 (空白对照)、25、50、100、200、400 mg/L 注射用胸腺法新作用于肺癌 A549 细胞 24、48、72 h 后, 用 MTT 法检测并计算细胞增殖抑制率。以 0 (空白对照)、50、100 mg/L 注射用胸腺法新作用于肺癌 A549 细胞 48 h 后, 用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况, 用 Western blot 法检测凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达和蛋白激酶 B (Akt) 的磷酸化水平。结果: 与空白对照比较, 注射用胸腺法新作用后 A549 细胞的增殖抑制率增加, 与浓度和作用时间呈正相关 ($P < 0.05$); 50、100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞的凋亡率增加 ($P < 0.05$); 100 mg/L 的注射用胸腺法新作用 48 h 后 A549 细胞中 Caspase-3 表达增强、Bcl-2/Bax 和 Akt 磷酸化水平降低 ($P < 0.05$)。结论: 注射用胸腺法新可通过激活 Caspase-3、下调 Bcl-2/Bax 比例、抑制 Akt 信号通路来抑制 A549 细胞增殖, 并促进其凋亡。
关键词 注射用胸腺法新; 人肺癌 A549 细胞; 增殖; 凋亡; Akt 信号通路

Effects of Thymalfasin for Injection on the Apoptosis of Humun Lung Cancer A549 Cells
YANG Zhaohui¹, DUAN Ruixiang², YANG Jing³, XIONG Dani¹, LANG Jianmin¹ (1. Dept. of Respiratory Medicine, Qingdao Economic and Technological Development Area First People's Hospital, Shandong Qingdao 266555, China; 2. Dept. of Surgery, Diabetes Hospital, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250014, China; 3. Fifth Surgical Department, Zaozhuang Mining Group Zaozhuang Hospital, Shandong Zaozhuang 277100, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the effects of Thymalfasin for injection on the apoptosis of human lung cancer A549 cells. **METHODS:** After treated with 0 (blank control), 25, 50, 100, 200 and 400 mg/L Thymalfasin for injection for 24, 48 and 72 h, the cell proliferation inhibitory rate was analyzed with MTT and calculated. After treated with 0 (blank control), 50 and 100 mg/L Thymalfasin for injection for 48 h, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and the expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax and the phosphorylation level of Akt were detected by Western blot. **RESULTS:** Compared with blank control group, proliferation inhibitory rate of A549 cells increased after treated with Thymalfasin for injection, in concentration and time-dependent manner ($P < 0.05$). The apoptotic rate of A549 cells increased after treated with Thymalfasin for injection 50, 100 mg/L for 48 h ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 increased while the Bcl-2/Bax and phosphorylation level of Akt decreased in A549 cells after treated with Thymalfasin for injection 100 mg/L ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** Thymalfasin for injection can inhibit the proliferation of A549 cells by activating Caspase-3, decreasing Bcl-2/Bax ratio, inhibiting Akt signal pathway and induce the apoptosis of A549 cells. **KEYWORDS** Thymalfasin for injection; Human lung cancer A549 cells; Proliferation; Apoptosis; Akt signal pathway



encephalomyelitis reveal neutrophils as a potential target in multiple sclerosis[J]. *Front Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.0028.

[6] Bustamante MF, Morcillo-Suarez C, Malhotra S, *et al*. Pharmacogenomic study in patients with multiple sclerosis: responders and nonresponders to IFN-beta[J]. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2015, 2(5):e154.

[7] Thiele S, Rosenkilde MM. Interaction of chemokines with their receptors: from initial chemokine binding to receptor activating steps[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(31):3 594.

[8] Chen XZ, Mao XH, Zhu KJ, *et al*. Toll like receptor ago-

nists augment HPV 11 E7-specific T cell responses by modulating monocyte-derived dendritic cells[J]. *Arch Dermatol Res*, 2010, 302(1):57.

[9] Herges K, de Jong BA, Kolkowitz I, *et al*. Protective effect of an elastase inhibitor in a neuromyelitis optica-like disease driven by a peptide of myelin oligodendroglial glycoprotein[J]. *Mult Scler*, 2012, 18(4):398.

[10] Wu F, Cao W, Yang Y, *et al*. Extensive infiltration of neutrophils in the acute phase of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice[J]. *Histochem Cell Biol*, 2010, 133(3):313.

* 主治医师, 硕士。研究方向: 肺部感染性疾病、肺癌、胸膜疾病、肺介入诊疗。电话: 0532-86977085。E-mail: sdysh0917@126.com
(收稿日期: 2015-11-16 修回日期: 2015-12-21)
(编辑: 邹丽娟)