

# 新型金黄色葡萄球菌滤液对 NSCLC 细胞的毒性研究

李欣雨<sup>1</sup>, 周强<sup>1</sup>, 陈礼文<sup>2</sup>

(安徽医科大学第二附属医院<sup>1</sup> 检验科、<sup>2</sup> 输血科, 合肥 230601)

**摘要** 目的 探究一种新型不完全溶血型金黄色葡萄球菌(SIHP)的滤液对非小细胞肺癌 HCC827 细胞株的毒性及作用机制。方法 新型 SIHP 和完全溶血型金黄色葡萄球菌(SCHP)的滤液及其稀释液,分别同 1% 人红细胞和 HCC827 细胞共孵育。采用血蛋白释放量法检测红细胞毒性, CCK-8 法检测 HCC827 细胞活性, 离子选择电极法、比色法和免疫荧光法分别检测孵育上清液中  $K^+$ 、乳酸脱氢酶(LDH)和白细胞介素-6(IL-6)浓度。结果 新型 SIHP 滤液及其稀释液均能明显降低 HCC827 细胞活性,引起  $K^+$  和 LDH 外漏。新型 SIHP 滤液及其 1:3 稀释液,分别导致 HCC827 细胞的 IL-6 分泌量减少和增加。与 SCHP 相比,新型 SIHP 滤液及其稀释液的红细胞毒性更强, HCC827 细胞  $K^+$  外漏更严重。结论 新型 SIHP 滤液能够通过损伤细胞膜,引起内容物释放,杀伤非小细胞肺癌细胞,毒性强于 SCHP。

**关键词** 金黄色葡萄球菌;溶血型;滤液;非小细胞肺癌;细胞毒性;抗肿瘤活性

**中图分类号** R 734.2;R 378.1+1

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2024)09-1529-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.006

根据 2023 年全球癌症统计,肺癌分别占新发癌症总数和癌症死亡总数的 12%~13% 和 21%,其中最常见的是非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)<sup>[1]</sup>。既往研究<sup>[2-3]</sup>表明,癌症的发生、发展、疗效、生存率与金黄色葡萄球菌的感染密切相关。究其原因,可能与金黄色葡萄球菌分泌的多种外毒素、胞外酶或菌体表面相关毒力因子有关。Qiang et al<sup>[4]</sup>的研究表明,杀白细胞素(panton-valentine leukocidin, PVL)可以通过 p38/ERK MAPK 信号通路,诱导 A549 和 H460 细胞的周期阻滞和凋亡。然而, Hattar et al<sup>[5]</sup>发现脂磷壁酸能够在体外促进炎症因子的释放和肺癌细胞的增殖。因此,金黄色葡萄球菌与肺癌的关联有待深入研究。

金黄色葡萄球菌滤液提取物用于临床肿瘤患者的治疗已近 20 年,效果显著<sup>[6-7]</sup>。据报道,其效应成分是肠毒素(enterotoxin, SE),可以通过诱导细胞毒性 T 淋巴细胞的活化<sup>[8]</sup>,促进白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、IL-2、肿瘤坏死因子(tumour-nec-

rosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )等多种细胞因子的分泌,进而发挥抗肿瘤作用<sup>[9-10]</sup>。近年来,安徽医科大学第二附属医院检出一种新型不完全溶血型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with incomplete hemolytic phenotype, SIHP),现就这种新型 SIHP 的滤液对 NSCLC HCC827 细胞株的毒性及作用机制进行探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 菌株来源** 收集 2021 年 6 月-2023 年 7 月安徽医科大学第二附属医院住院患者和门诊患者的呼吸道、肠道、尿道、血液、皮肤和感染组织等(剔除同一患者相同部位的标本)标本,分离出 5 株未见报道的 SIHP,经过 VITEK 2 GP 鉴定卡、Microflex LT MALDI-TOF 质谱分析仪和 16S rRNA 扩增测序共同鉴定确认为金黄色葡萄球菌。随机选取 5 株同期分离到的完全溶血型金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* with complete hemolytic phenotype, SCHP)作为对照。HCC827 细胞株购自上海富恒生物技术有限公司。

**1.2 试剂与仪器** RPMI 1640 培养基和胎牛血清(美国 Gibco 公司);0.25% 胰酶消化液、1% 青-链霉素和 CCK-8 试剂(上海碧云天生物技术有限公司);LB(Luria-Bertani)肉汤和 PBS 溶液(上海生工生物工程股份有限公司);哥伦比亚绵羊血琼脂平板(columbia sheep blood agar plates, BAP)(合肥天

2024-08-27 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2023AH053170)

作者简介:李欣雨,女,硕士研究生;

周强,男,副教授,硕士生导师,主任技师,通信作者, E-mail: zhouqiang1973@163.com;

陈礼文,男,教授,博士生导师,主任技师,通信作者, E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn

达诊断试剂有限公司);25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶、96 孔微孔板(美国康宁公司);0.22 μm 除菌滤器(美国密理博公司)。Microflex LT MALDI-TOF 质谱分析仪(德国布鲁克公司);麦氏比浊仪、VITEK-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏仪和 VITEK 2 GP 鉴定卡(法国生物梅里埃公司);Spectra max i3x 多功能酶标仪(美国美谷分子公司);ADVIA Chemistry XPT 生化仪(美国西门子公司);基蛋 Getein 1600 荧光免疫定量分析仪(南京基蛋生物科技股份有限公司)。

**1.3 红细胞毒性检测** 金黄色葡萄球菌菌株接种 LB 肉汤,35 ℃ 过夜培养。7 000 r/min 离心 10 min、滤过除菌,获取滤液。将各菌株 100 μl 滤液和 1:1 (滤液/PBS) 稀释液,依次加入 96 孔圆底无菌微孔板中。然后,加入 1% 洗涤人红细胞悬液,100 μl/孔,轻轻混匀。35 ℃ 孵育 15 h,通过离心分离出孵育上清液。将孵育上清液转移到一个新的 96 孔平底无菌微孔板中,100 μl/孔。使用美谷分子 Spectra max i3x 多功能酶标仪,在 570 nm/600 nm 双波长处测定各孔吸光度值(optical density, OD)。阴性对照孔加入 100 μl 生理盐水和 100 μl 1% 洗涤人红细胞悬液;阳性对照孔加入 100 μl 超纯水和 100 μl 1% 洗涤人红细胞悬液。每组设置 4 个复孔。

**1.4 肿瘤细胞活性检测** 使用 RPMI 1640 完全培养基,将 HCC827 细胞在 35 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h。调整细胞悬液浓度至 5 × 10<sup>4</sup> 个/ml,以每孔 100 μl 接种至 96 孔板中。将各菌株 100 μl 滤液、1:1 (滤液/RPMI 1640) 稀释液和 1:3 (滤液/RPMI 1640) 稀释液,依次加入 96 孔无菌微孔板中。每组设置 4 个复孔。35 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h,向每孔加入 20 μl CCK-8 试剂,避光孵育 1 h。使用 Spectra max i3x 多功能酶标仪,在 450 nm/600 nm 双波长处测定各孔 OD 值。

**1.5 肿瘤细胞毒性检测** 细胞毒性检测体系同 1.4 项所述。35 ℃、5% CO<sub>2</sub> 孵育 24 h 后,将 96 孔板置于倒置显微镜高倍镜视野下,观察孔内细胞并拍照。吸取上清液,并以 1 500 r/min 离心 10 min 去除残余细胞。分别使用离子选择电极法、比色法、免疫荧光法检测上清液中钾离子(K<sup>+</sup>)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)浓度。

**1.6 统计学处理** 统计学分析使用 SPSS 17.0 软件,计量资料以均值 ± 标准差表示。多组之间比较采用单因素方差分析,两组样本间比较采用 LSD 检验或独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有统计学

意义。

## 2 结果

**2.1 新型 SIHP 滤液的溶血毒性** 新型 SIHP 滤液对红细胞的溶血毒性明显强于 SCHP,差异有统计学意义(*t* = -13.292, *P* < 0.05),见图 1A。将二者的滤液用无菌 PBS 1:1 稀释后,新型 SIHP 对红细胞的溶血毒性仍然强于 SCHP(*t* = -29.769, *P* < 0.05),见图 1B。

**2.2 新型 SIHP 滤液可抑制 HCC827 细胞生长** SCHP 和新型 SIHP 的滤液(*F* = 183.97, *P* < 0.001)、1:1 稀释液(*F* = 27.06, *P* < 0.001)、1:3 稀释液(*F* = 13.86, *P* = 0.001)处理的细胞和对照组细胞之间活性存在差异。与对照组相比,新型 SIHP 滤液处理过后的细胞生存能力受到抑制,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2A。将二者的滤液用 RPMI 1640 1:1 稀释后,新型 SIHP 滤液的 1:1 稀释液处理过后的细胞生存受抑制程度强于对照组细胞(*P* < 0.05),见图 2B。将二者的滤液用 RPMI 1640 1:3 稀释后,新型 SIHP 滤液的 1:3 稀释液处理过后的细胞生存受抑制程度仍然强于对照组细胞(*P* < 0.05),见图 2C。

**2.3 新型 SIHP 滤液对 HCC827 细胞具有毒性作用** 如图 3 所示,新型 SIHP 滤液及其稀释液对 HCC827 细胞有很强的细胞毒性,且明显强于 SCHP 和 ATCC25923。正常情况下,HCC827 细胞应为贴壁生长状态(图 3 绿色箭头所示)。然而,由于受到金黄色葡萄球菌滤液中多种代谢产物和毒素的影响,HCC827 细胞呈现不同程度的损伤,表现为:① 细胞轻度损伤,不贴壁、悬浮生长(图 3 蓝色箭头所示);② 细胞中度损伤,内容物部分释放,胞膜气球样变(图 3 黄色箭头所示);③ 细胞重度损伤,内容物完全释放,细胞裸核样变(图 3 红色箭头所示)。与对照组细胞相比,不同溶血表型金黄色葡萄球菌滤液对 HCC827 细胞均表现出一定的细胞毒性。其中,新型 SIHP 滤液及其稀释液对 HCC827 细胞的毒性明显强于 SCHP 和 ATCC25923,使绝大多数细胞呈现出裸核样变。相比之下,SCHP 处理 HCC827 细胞,大多呈现气球样变。ATCC25923 处理 HCC827 细胞,大多呈现气球样变和不贴壁、悬浮生长状态,见图 3。

SCHP 和新型 SIHP 的滤液(*F* = 305.54, *P* < 0.001)、1:1 稀释液(*F* = 102.52, *P* < 0.001)、1:3 稀释液(*F* = 69.52, *P* < 0.001)处理的细胞以及对

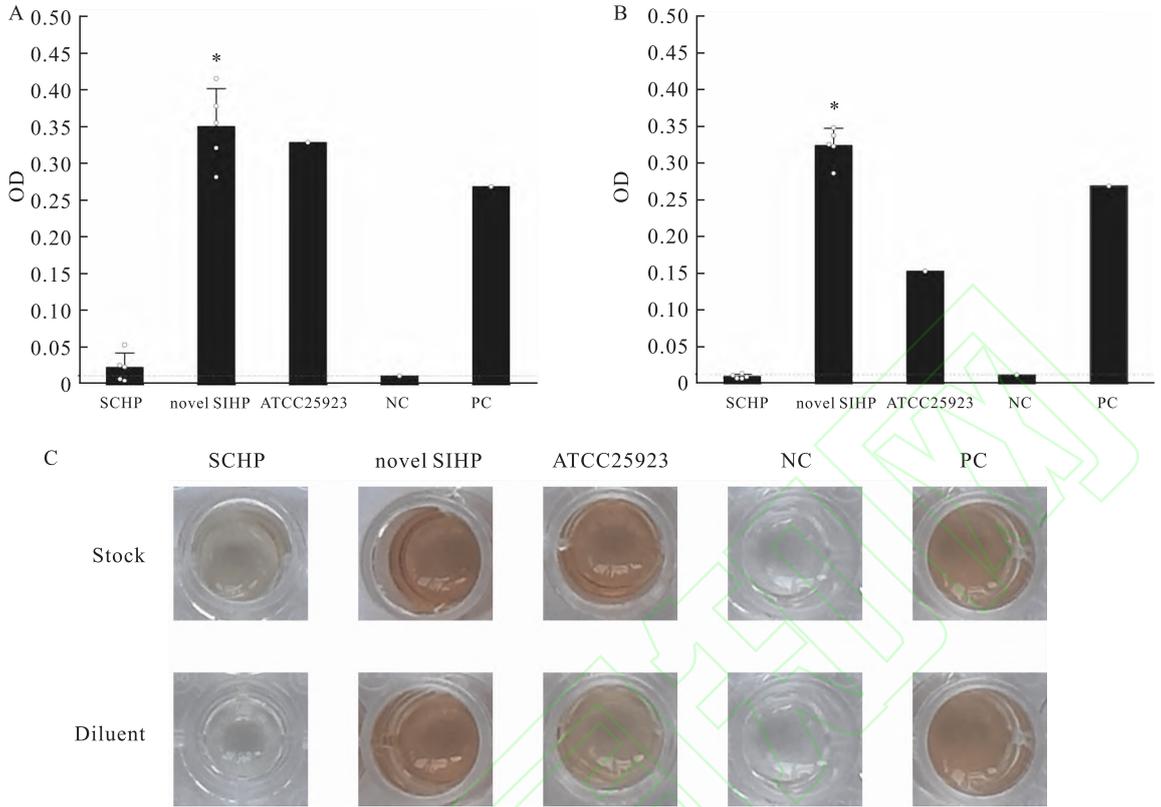


图1 金黄色葡萄球菌滤液及其稀释液对人红细胞的溶血毒性

Fig.1 Hemolytic toxicity of the stock and diluent of *Staphylococcus aureus* filtrate to human red blood cells

A: Hemolytic toxicity of the stock of *Staphylococcus aureus* filtrate to human red blood cells; B: Hemolytic toxicity of the diluent (1:1) of *Staphylococcus aureus* filtrate to human red blood cells; C: The comparison of hemolytic toxicity of the stock and diluent (1:1) of *Staphylococcus aureus* filtrate to human red blood cells; NC, Negative control; PC: Positive control; \*  $P < 0.05$  vs SCHP.

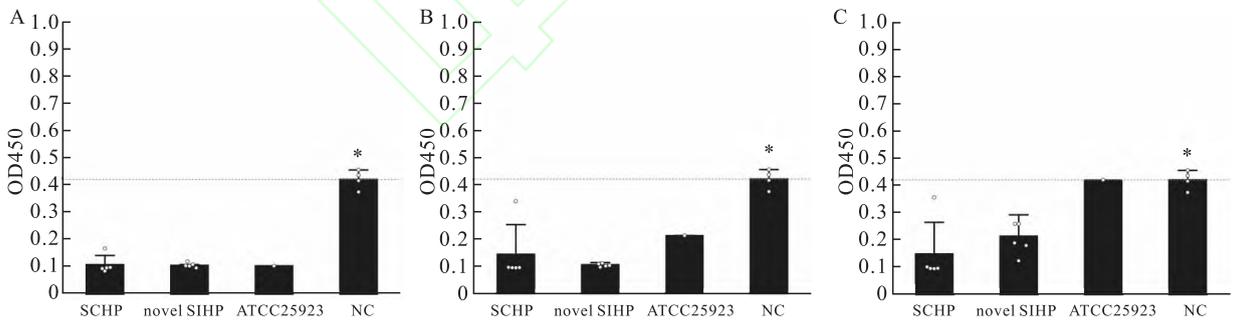


图2 金黄色葡萄球菌滤液及其稀释液对 HCC827 细胞生长的抑制

Fig.2 Inhibition of HCC827 cells growth by the stock and diluent of *Staphylococcus aureus* filtrate

A: Inhibition of HCC827 cells growth by the stock of *Staphylococcus aureus* filtrate; B: Inhibition of HCC827 cells growth by the diluent (1:1) of *Staphylococcus aureus* filtrate; C: Inhibition of HCC827 cells growth by the diluent (1:3) of *Staphylococcus aureus* filtrate; NC: Negative control; \*  $P < 0.05$  vs NC.

对照组细胞之间  $K^+$  外漏程度存在差异; SCHP 和新型 SIHP 的滤液 ( $F = 30.71$ ,  $P < 0.001$ )、1:1 稀释液 ( $F = 17.99$ ,  $P < 0.001$ )、1:3 稀释液 ( $F = 7.90$ ,  $P = 0.007$ ) 处理的细胞以及对照组细胞之间 LDH 外漏程度存在差异; SCHP 和新型 SIHP 的滤液 ( $F = 23.66$ ,  $P < 0.001$ )、1:3 稀释液 ( $F = 17.08$ ,  $P <$

0.001) 处理的细胞以及对照组细胞之间 IL-6 分泌程度存在差异。同细胞对照和 SCHP 相比, 新型 SIHP 滤液、1:1 稀释液以及 1:3 稀释液处理过后的细胞  $K^+$  外漏程度较强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 4A-4C; 与细胞对照相比, 新型 SIHP 滤液及其 1:1 稀释液处理过后的细胞 LDH 外漏程

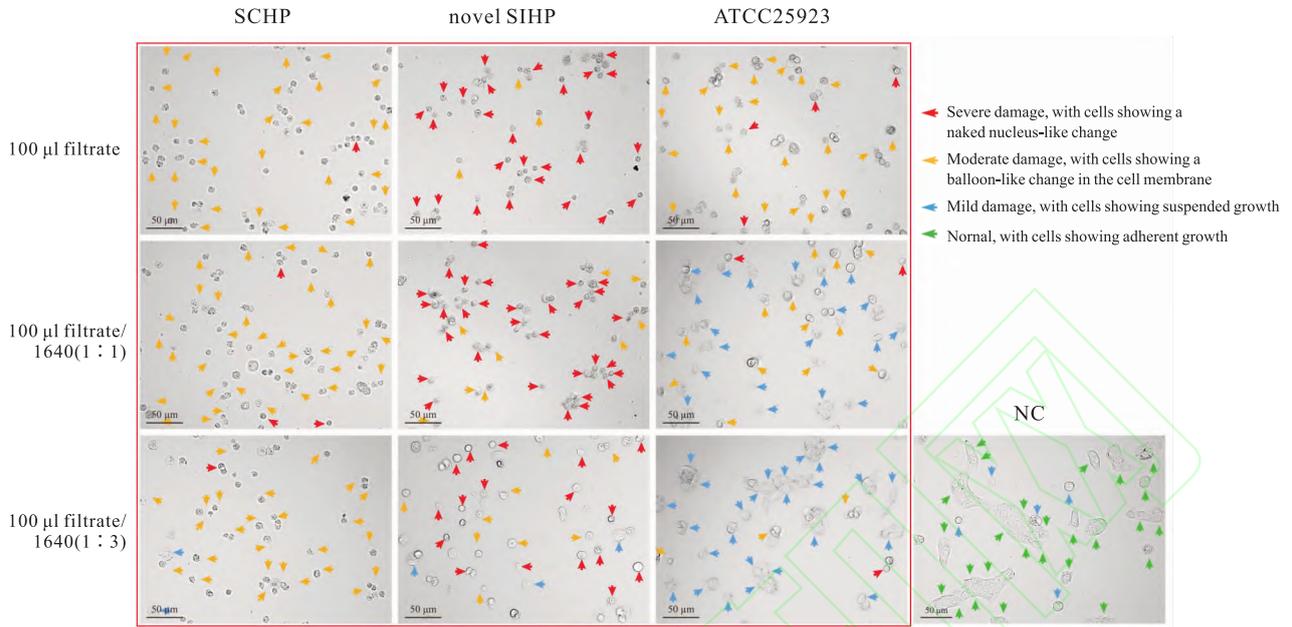


图3 金黄色葡萄球菌滤液及其稀释液对 HCC827 细胞形态的影响 ×400

Fig. 3 The impact of the stock and diluent of *Staphylococcus aureus* filtrate on the morphology of HCC827 cells ×400

NC: Negative control

度较强,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4D、4E;与细胞对照相比,新型 SIHP 滤液处理过后的细胞分泌 IL-6 减低,而新型 SIHP 滤液的 1:3 稀释液处理过后的细胞分泌 IL-6 增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 4G、4I。

### 3 讨论

肺癌虽然可以通过免疫、分子靶向、放疗或非侵入性手术切除等手段治疗缓解,但是依然需要开辟新的治疗途径<sup>[11]</sup>。高聚金葡素是由我国科学家从金黄色葡萄球菌滤液中提取并应用于临床治疗的一种超抗原抗肿瘤生物制剂。临床研究显示,高聚金葡素除了本身具有抗肿瘤活性,还能够增强紫杉醇、顺铂、长春瑞滨等药物的疗效,尤其是针对中晚期 NSCLC<sup>[7, 12]</sup>。金黄色葡萄球菌滤液中的主要活性成分,肠毒素不仅可以通过活化细胞免疫、促进多种细胞因子分泌杀伤肿瘤细胞,还能提高机体免疫力,延长患者生存期<sup>[12-13]</sup>。金黄色葡萄球菌滤液中除了上述肠毒素,还有诸如溶血素、PVL、毒性休克综合征毒素 1 (toxic shock syndrome toxin-1, TSST-1) 等已知或未知毒性物质。既往研究表明,α-溶血素可作用于肿瘤细胞的线粒体,诱导凋亡<sup>[14]</sup>;PVL 能够通过 P38/ERK 丝裂原活化蛋白激酶信号通路,引发 NSCLC 细胞的周期阻滞和凋亡<sup>[4]</sup>;TSST-1 可诱导细胞毒性 T 细胞活化,杀伤肿瘤细胞<sup>[15]</sup>。不同金黄色

葡萄球菌菌株的代谢产物差异显著,会导致滤液中抗肿瘤活性物质的种类和数量存在较大差异。因此,抗肿瘤活性物质高表达菌株的发掘具有十分重要的科学意义和临床价值。

已有文献<sup>[16-18]</sup>报道,亚治疗剂量抗生素能够影响金黄色葡萄球菌多种溶血素基因的表达,从而导致 SIHP 的出现,其菌株低表达 α-溶血素、高表达 β-溶血素,能够诱导 TNF-α、白细胞介素-1β (interleukin-1, IL-1β)、IL-6 和白细胞介素-12 (interleukin-1, IL-12) 等炎性细胞因子的分泌<sup>[19-20]</sup>。其中,IL-6 是肿瘤微环境中关键因子,能够调节免疫反应,驱动炎症,并促进肿瘤细胞增殖与转移<sup>[21-23]</sup>。据此,可以推测,抗生素可能会影响金黄色葡萄球菌其他毒力因子的表达,甚至引起某些基因的突变,进而赋予新型 SIHP 抗肿瘤活性。本课题组的前期研究结果显示,与经典的 SCHP 相比,新型 SIHP 高表达 γ-溶血素、低表达 δ-溶血素;二者 α-溶血素和 β-溶血素的表达量并无差异。目前,尚无 γ-溶血素对肿瘤细胞活性影响的报道,值得后续探索。此外,新型 SIHP 的血浆凝固酶活性和生物膜形成能力更强,对数期生长更快。本研究结果显示,新型 SIHP 滤液的细胞毒性明显强于 SCHP,能够浓度依赖性地损伤 HCC827 细胞胞膜,导致细胞中、重度损伤,内容物释放, K<sup>+</sup> 和 LDH 外漏,胞膜气球样变或细胞呈现出裸核样变。值得注意的是,新型 SIHP 滤液及 1:1

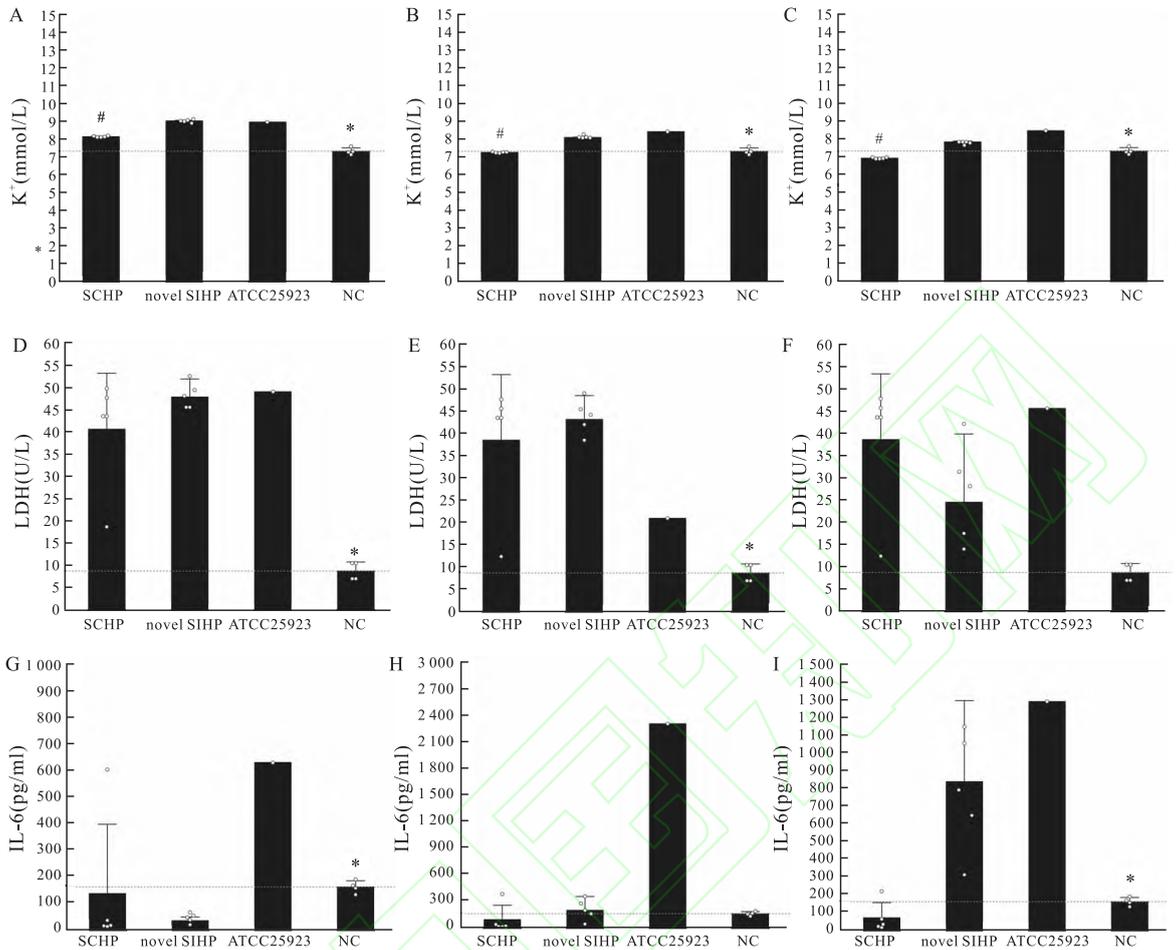


图4 金黄色葡萄球菌滤液及其稀释液与 HCC827 细胞共孵育上清液中 K<sup>+</sup>、LDH、IL-6 的浓度

Fig.4 The concentration of K<sup>+</sup>, LDH, and IL-6 in the supernatant after co-incubation of the stock and diluent of *Staphylococcus aureus* filtrate with HCC827 cells.

A - C: The concentration of K<sup>+</sup> in the supernatant after co-incubation of the stock and diluent (1 : 1, 1 : 3) of *Staphylococcus aureus* filtrate with HCC827 cells; D - F: The concentration of LDH in the supernatant after co-incubation of the stock and diluent (1 : 1, 1 : 3) of *Staphylococcus aureus* filtrate with HCC827 cells; G - I: The concentration of IL-6 in the supernatant after co-incubation of the stock and diluent (1 : 1, 1 : 3) of *Staphylococcus aureus* filtrate with HCC827 cells; NC: Negative control; \*  $P < 0.05$  vs NC; #  $P < 0.05$  vs SChP.

稀释液对 HCC827 细胞的损伤严重,镜下细胞数显著减少、状态很差,这很可能是其上清液 IL-6 含量明显降低的原因。相比之下,新型 SIHP 滤液的 1 : 3 稀释液处理组中部分 HCC827 细胞仅表现为悬浮生长,损伤较轻。可能是由于这部分细胞受到滤液中的活性物质刺激,引发 IL-6 大量分泌,从而导致上清液 IL-6 含量明显升高。因此,新型 SIHP 对肿瘤细胞的活性同样具有双面性。然而,其滤液中抗肿瘤活性物质的抑瘤作用远超某些因子通过诱导 IL-6 分泌,进而激活 JAK-STAT3 信号通路的促瘤作用<sup>[24]</sup>。

#### 参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Wagle N S, et al. Cancer statistics, 2023

[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73 (1) : 17 - 48. doi:10. 3322/caac. 21763.

[2] Li Z Q, Zhuang H M, Wang G N, et al. Prevalence, predictors, and mortality of bloodstream infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with malignancy: Systemic review and meta-analysis [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21 (1) : 74. doi: 10. 1186/s12879 - 021 - 05763 - y.

[3] Wei Y N, Sandhu E, Yang X, et al. Bidirectional functional effects of *Staphylococcus* carcinogenesis [J]. Microorganisms, 2022, 10 (12) : 2353. doi:10. 3390/microorganisms10122353.

[4] Qiang Y W, Ma F, Wang Z R, et al. LukS-PV induces cell cycle arrest and apoptosis through p38/ERK MAPK signaling pathway in NSCLC cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 521 (4) : 846 - 52. doi:10. 1016/j. bbr. 2019. 10. 181.

[5] Hattar K, Reinert C P, Sibelius U, et al. Lipoteichoic acids from *Staphylococcus aureus* stimulate proliferation of human non-small-cell lung cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Immunol Immunother, 2017, 66 (6) : 799 - 809. doi:10. 1007/s00262 - 017 - 1980 - 4.

- [6] 宣小山. 金黄色葡萄球菌滤液在晚期癌症综合治疗中的作用[J]. 中国基层医药, 2011,18(2):46-7.
- [6] Xuan X S. The role of *Staphylococcus aureus* filtrate in the comprehensive treatment of advanced cancer [J]. *Chin J Prim Med Pharm*, 2011,18(2):46-7. doi:10.3760/cma.j.issn.1008-6706.2011.s2.026.
- [7] 徐立栋, 李伟栋, 张军, 等. 高聚金葡素联合 TP 方案治疗中晚期非小细胞肺癌的效果研究[J]. 中国高等医学教育, 2019(3):136,138.
- [7] Xu L D, Li W D, Zhang J, et al. The efficacy study of polystaphylococcal enterotoxin B (PSEB) combined with TP regimen in the treatment of middle to late-stage non-small cell lung cancer [J]. *Chinese Higher Medical Education*, 2019(3):136,138. doi:10.3969/j.issn.1002-1701.2019.03.069.
- [8] Spaulding A R, Salgado-Pabón W, Kohler P L, et al. Staphylococcal and streptococcal superantigen exotoxins [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2013,26(3):422-47. doi:10.1128/CMR.00104-12.
- [9] Perabo F G, Willert P L, Würger A, et al. Preclinical evaluation of superantigen (staphylococcal enterotoxin B) in the intravesical immunotherapy of superficial bladder cancer [J]. *Int J Cancer*, 2005,115(4):591-8. doi:10.1002/ijc.20941.
- [10] Yu Q T, Meng Z B. Treatment of advanced breast cancer with a combination of highly agglutinative staphylococci and vinorelbine-based chemotherapy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016,20(16):3465-8.
- [11] Liu J H, Li C, Cao L, et al. Cucurbitacin B regulates lung cancer cell proliferation and apoptosis via inhibiting the IL-6/STAT3 pathway through the lncRNA XIST/miR-let-7c axis [J]. *Pharm Biol*, 2022,60(1):154-62. doi:10.1080/13880209.2021.2016866.
- [12] 何亚南, 孙钰棕, 任雅坤, 等. 金黄色葡萄球菌类肠毒素 K 对 T 淋巴细胞活化特点及抗肿瘤活性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021,37(11):1281-5,1291.
- [12] He Y N, Sun Y L, Ren Y K, et al. Characteristics study of T lymphocyte activation and antitumor activity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin-like K [J]. *Chin J Immunol*, 2021,37(11):1281-5,1291. doi:10.3969/j.issn.1000-484X.2021.11.001.
- [13] 马海英, 由健. 金黄色葡萄球菌滤液制剂对机体免疫功能的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2006,15(5):320-3.
- [13] Ma H Y, You J. Effects of the filter preparation of *Staphylococcus aureus* on organism immunity function [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2006,15(5):320-3. doi:10.3969/j.issn.1007-4406.2006.05.019.
- [14] Johansson D, Johansson A, Behnam-Motlagh P. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus* overcomes acquired cisplatin-resistance in malignant mesothelioma cells [J]. *Cancer Lett*, 2008,265(1):67-75. doi:10.1016/j.canlet.2008.02.007.
- [15] Wang W, Sun X, Lu L, et al. Cytotoxicity of lymphocytes activated by superantigen toxic-shock-syndrome toxin-1 against colorectal cancer LoVo cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013,376(1-2):1-9. doi:10.1007/s11010-013-1561-6.
- [16] Worlitzsch D, Kaygin H, Steinhuber A, et al. Effects of amoxicillin, gentamicin, and moxifloxacin on the hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001,45(1):196-202. doi:10.1128/AAC.45.1.196-202.2001.
- [17] Goerke C, Köller J, Wolz C. Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006,50(1):171-7. doi:10.1128/AAC.50.1.171-177.2006.
- [18] Rohmer C, Wolz C. The role of *hlyB*-converting bacteriophages in *Staphylococcus aureus* host adaptation [J]. *Microb Physiol*, 2021,31(2):109-22. doi:10.1159/000516645.
- [19] Zhang H, Zheng Y, Gao H, et al. Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* strains with an incomplete hemolytic phenotype [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016,6:146. doi:10.3389/fcimb.2016.00146.
- [20] Xu X, Zhou T, Fang X, et al. Biological characteristics and pathogenicity of a *Staphylococcus aureus* strain with an incomplete hemolytic phenotype isolated from bovine milk [J]. *Microbiol Immunol*, 2024,68(1):6-14. doi:10.1111/1348-0421.13102.
- [21] Hirata A, Ogawa S, Kometani T, et al. ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase [J]. *Cancer Res*, 2002,62(9):2554-60.
- [22] Huang S M, Li J, Armstrong E A, et al. Modulation of radiation response and tumor-induced angiogenesis after epidermal growth factor receptor inhibition by ZD1839 (Iressa) [J]. *Cancer Res*, 2002,62(15):4300-6.
- [23] Lee J K, Hahn S, Kim D W, et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors vs conventional chemotherapy in non-small cell lung cancer harboring wild-type epidermal growth factor receptor: a meta-analysis [J]. *JAMA*, 2014,311(14):1430-7. doi:10.1001/jama.2014.3314.
- [24] Hailemichael Y, Johnson D H, Abdel-Wahab N, et al. Interleukin-6 blockade abrogates immunotherapy toxicity and promotes tumor immunity [J]. *Cancer Cell*, 2022,40(5):509-23. e6. doi:10.1016/j.ccell.2022.04.004.

## Cytotoxicity of novel *Staphylococcus aureus* filtrate on non-small cell lung cancer cell

Li Xinyu<sup>1</sup>, Zhou Qiang<sup>1</sup>, Chen Liwen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Laboratory, <sup>2</sup>Dept of Blood Transfusion,

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To investigate the toxicity and mechanism of a novel *Staphylococcus aureus* with incomplete hemolytic phenotype (SIHP) filtrate on non-small cell lung cancer (NSCLC) HCC 827 cell line. **Methods** The

# 新型不完全溶血表型金黄色葡萄球菌的微生物学特征

唐伟<sup>1,2</sup>, 冷贵云<sup>1</sup>, 高菊<sup>1</sup>, 王亚武<sup>1</sup>, 姚杰<sup>1</sup>, 周强<sup>1</sup>, 徐元宏<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601;

<sup>2</sup> 安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022)

**摘要** 目的 探讨一种新型不完全溶血表型金黄色葡萄球菌(SIHP)的微生物学特征。方法 采用三点接种法检测溶血表型,共纳入11株新型SIHP和33株随机匹配的完全溶血表型金黄色葡萄球菌(SCHP)。采用微量肉汤稀释法检测新型SIHP和SCHP的耐药特征,冻干兔血浆检测凝固酶活性,玻片法检测触酶活性,实时荧光定量PCR检测溶血素基因mRNA水平,微孔板法检测红细胞毒性,微孔板成膜结晶紫染色法检测生物膜形成能力,微量培养法监测生长曲线。结果 与SCHP相比,新型SIHP的hla、hly、hlc和hld四种溶血素基因表达谱不同;新型SIHP对青霉素、苯唑西林、庆大霉素、喹诺酮类、克林霉素和复方新诺明的耐药率更高;新型SIHP不仅具有更强的溶血毒性、血浆凝固酶活性和生物膜形成能力,而且对数期生长更快。结论 新型SIHP的微生物学特征有别于SCHP,耐药性和致病性更强,应引起临床重视。

**关键词** 金黄色葡萄球菌;溶血素;溶血表型;微生物学特征;耐药性;致病性

**中图分类号** R 378.1

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1535-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.007

金黄色葡萄球菌在自然界中分布广泛,可栖息

在皮肤或机体与外界相通的腔道,是一种十分重要的条件致病菌,常引起局部化脓性或全身性感染。金黄色葡萄球菌分泌的外毒素能够导致食物中毒、烫伤样皮肤综合征或毒性休克综合征。金黄色葡萄球菌连续多年都是分离率最高的革兰阳性病原菌<sup>[1-2]</sup>。根据全国细菌耐药监测网(China Antimicrobial Resistance Surveillance System, CARSS, <http://www.carss.cn>)公布的数据,金黄色葡萄球菌

2024-07-12 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82102460)

作者简介:唐伟,男,博士研究生;

周强,男,副教授,硕士生导师,主任技师,通信作者,E-mail:zhouqiang1973@163.com;

徐元宏,男,教授,博士生导师,主任技师,通信作者,E-mail:xyhong1964@163.com

filtrates and diluents of novel SIHP and *Staphylococcus aureus* with complete hemolytic phenotype (SCHP) were co-incubated with 1% human red blood cells and HCC827 cells. Hemoglobin release method was used to detect red blood cell toxicity, CCK-8 method was used to detect HCC827 cell activity. Ion selective electrode method, colorimetric method and immunofluorescence method were used to detect potassium ( $K^+$ ), lactate dehydrogenase (LDH) and interleukin-6 (IL-6) concentrations in the incubation supernatants. **Results** The filtrate and diluent of novel SIHP could significantly damage the activity of HCC827 cells, causing  $K^+$  and LDH leakage. The filtrate and 1:3 diluent of novel SIHP resulted in a decrease and an increase in IL-6 secretion in HCC827 cells, respectively. Compared with SCHP, the filtrate and diluent of novel SIHP had stronger red blood cell toxicity and more severe  $K^+$  leakage in HCC827 cells. **Conclusion** The filtrate of novel SIHP can damage the cell membrane, lead to content release and kill NSCLC cells, with a stronger toxicity than SCHP.

**Key words** *Staphylococcus aureus*; hemolytic phenotype; filtrate; non-small cell lung cancer; cytotoxicity; anti-tumor activity

**Fund program** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee(No. 2023AH053170)

**Corresponding authors** Zhou Qiang, E-mail:zhouqiang1973@163.com; Chen Liwen, E-mail:chenliwen@ahmu.edu.cn