# 高聚金葡素对非小细胞肺癌细胞株A549的生长抑制及其治疗恶性胸腔积液的效果观察*

柯　军[1**]，葛海燕[2***]

([1]江苏省姜堰市人民医院肿瘤科，姜堰 225500；[2]南通大学附属医院呼吸科)

[摘　要]　目的：观察生物调节剂高聚金葡素(high agglomerative staphylococoin，HAS)对非小细胞肺癌细胞株A549的体外生长抑制，并观察HAS治疗肺癌恶性胸腔积液的临床疗效。方法：培养非小细胞肺癌细胞株A549，根据处理方法不同，分为对照组、顺铂(cisplatin，DDP)组、HAS、HAS联合DPP 4组，应用CCK8法测定药物的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition，$IC_{50}$)值及细胞存活率，倒置显微镜下观察各组细胞形态改变。收集非小细胞肺癌胸腔积液患者的胸膜腔积液，并应用HAS、DDP或两者联合进行治疗，观察其临床疗效和不良反应。结果：HAS能抑制肺癌细胞株的生长，并且呈时间剂量依赖性，HAS联合DDP治疗较DDP单独治疗$IC_{50}$值明显降低。在对临床恶性胸腔积液患者的治疗观察中，HAS治疗有效率为72.2%，DDP组治疗有效率为50.0%，HAS联合DDP治疗有效率为86.1%，且HAS组发生胃肠道反应和骨髓抑制的比例要小于DDP组。结论：HAS对非小细胞肺癌具有生长抑制作用，局部应用HAS不良反应小，能有效促进恶性胸腔积液的吸收。

[关键词]　非小细胞肺癌；胸腔积液；高聚金葡素；顺铂

[中图分类号]　R734.205　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1674-7887(2011)04-0248-04

## Effect of HAS on the growth of NSCLC cell line A549 and malignant pleural effusion*

*KE Jun*[1**], *GE Haiyan*[2***]　([1]Department of Oncology, Jiangyan People's Hospital, Jiangyan 225500; [2]Department of Respiratory Medicine, the Affiliated Hospital of Nantong University)

**[Abstract]**　*Objective*: To investigate the effects of high agglomerative staphylococoin(HAS) on the growth of non-small cell lung cancer cell line A549, and to evaluate the effect of HAS in the treatment of malignant pleural effusion. *Methods*: A549 cells were incubated in F12-K medium containing 10% fetal bovine serum, 2.5 μg/mL fungizone and 100 U/mL streptomycin/penicillin, then they were treated with different concentration of HAS and DDP. CCK-8 assay was used to measure the inhibitory rate. Phase contrast microscope was used to observe the morphological changes of A549 cells treated with HAS. One hundred and eight lung cancer patients with malignant pleural effusion were randomly divided into three groups, and treated with DDP, HAS, DDP and HAS, respectively. *Results*: Both HAS and DDP could inhibit A549 cell proliferation in time-dependent and dose-dependent manners. Treating with HAS and DDP together decreased the $IC_{50}$ of DDP than treating with DDP alone. The overall response of HAS group was 72.2%, which was higher than that of DDP group($P<0.05$). *Conclusions*: HAS, which is less toxic than DDP, can inhibit proliferation of A549 cells. Therapy of HAS can effectively control the malignant pleural effusion and improve life quality of the lung cancer patients.

**[Key words]**　non-small cell lung cancer; pleural effusion; high agglomerative staphylococoin; cisplatin

近年来肺癌的发生率逐年上升，由于早期症状不典型，加之一些病理类型的肺癌容易发生早期转移，许多患者发现时已处于IIIb期或IV期，错失手术机会[1]。恶性胸腔积液是恶性肿瘤晚期常见并发症之一，确诊后平均生存期仅为6个月。为了提高患者生活质量，延长生存时间，必须予以积极治疗消除胸水[2]。目前临床上已有较多药物用于胸腔内注入控制胸水生长，但因疗效有限而且副作用较大备受争议。高聚金葡素(high agglomerative staphylococoin，HAS)是从高效低毒的金葡菌代谢产物中提取出来的细菌性生物反应调节剂，具有增强免疫功能、抗癌、提高化疗疗效、减轻化疗副反应等作用[3]。因此，我们从细胞水平研究了HAS对非小细胞肺癌细胞株A549的生长抑制作用。同时，我们收集了2008年1月-2010年12月在我科住院的恶性胸腔积液患者，分别应用HAS、顺铂(cisplatin，DDP)以及两者联用对其疗效及不良反应进行了观察。

## 1　材料与方法

1.1　细胞培养　A549细胞株购自中科院上海细胞

*[基金项目]　南通市社会发展项目(S2008017)

**[作者简介]　柯军，男，汉族，生于1971年12月，江苏省姜堰市人，副主任医师，研究方向：胸部肿瘤放化疗。

***[通信作者]　葛海燕，电话：13611671369，E-mail:haiyange@hotmail.com

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

库。按照 $1\times10^5$/mL 接种于 25 $cm^2$ 的培养瓶中，应用 F12K 培养基培养(含 10%的胎牛血清和 1%的青、链霉素)，放置于 37 ℃、5%$CO_2$ 培养箱中培养，至细胞约 80%融合时，用 0.25%胰蛋白酶与 0.02%乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid，EDTA)混合液消化后，按 1∶3 的比例进行传代培养。

1.2 CCK8 检测 对数生长期的 A549 细胞经消化后，调整细胞密度为 $5\times10^3$/mL，接种于 96 孔板中，每孔 100 μL，待细胞贴壁后，弃去培养液，加含有不同药物浓度的培养液，每孔 100 μL，分别培养 12、24、48、72 h 后加入 CCK8 每孔 10 μL，继续培养 2 h，酶联免疫检测仪检测 450 nm 波长 OD 值，结果取 3 个复孔的平均值，重复 3 次，计算细胞存活率以及 $IC_{50}$。生长抑制率/%=(对照组 OD 均值−实验组 OD 均值)/对照组 OD 均值×100%。$LgIC_{50}=Xm-I[P-(3-Pm-Pn)/4]$，其中 Xm：Lg 最大剂量；I：Lg(最大剂量/相邻剂量)；P：抑制率之和；Pm：最大抑制率；Pn：最小抑制率。

1.3 细胞形态观察 将 A549 细胞培养于 6 孔板中，待增长至 60%~70%融合时，分别按照 DDP、HAS、DDP+HAS 进行处理，对照组加入等体积的 DMSO，培养 48 h 后各组细胞在 Lecia 倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

1.4 临床病例 108 例恶性胸腔积液患者，男 63 例，女 45 例，年龄 43~76 岁，平均(61±7.9) 岁。所有患者均经细胞病理学诊断为恶性胸腔积液。其中腺癌 73 例，小细胞肺癌 27 例，鳞癌 8 例。各组患者年龄、性别、临床分期、卡氏评分等比较差异均无统计学意义。

1.5 分组与治疗方法 所有患者均予以全身化疗，化疗方案为非小细胞肺癌 GP21 d 方案(吉西他滨按 1 000 mg/$m^2$ 第 1 天和第 8 天用药，DDP 按 60 mg/$m^2$ 第 1 天用药)。患者予以胸腔置管以抽取胸腔积液及局部应用药物，DDP 组应用 40 mg DDP 溶于 40 mL 生理盐水中注入胸腔，HAS 组采用 3 000 U HAS 溶于 40 mL 生理盐水中注入胸腔，联用组采用 3 000 U HAS 和 40 mg DDP 溶于 40 mL 生理盐水中注入胸腔。为减轻胸膜反应，在注射药物前向胸腔内注入 2%利多卡因 100 mg，术后嘱患者多次变换体位，以利于药物广泛与胸膜接触，每周 1 次，连用 4 周，治疗 4 周后评价疗效和毒副反应。

1.6 疗效评价及不良反应评价 根据世界卫生组织(WHO)规定的标准[4]将疗效分为：完全缓解(CR)：胸水消失，症状缓解并至少维持 4 周以上；部分缓解(PR)：胸水显著减少达 50%以上，症状缓解并维持 4 周以上；稳定(SD)：胸水减少不足 50%，症状部分缓解；无效(NC)：胸腔积液较原来无减少，或减少后又复增，30 d 内需要再次抽液。不良反应评价：评价各组患者出现发热、胸痛、消化道症状、骨髓移植等不良反应的发生率。

1.7 统计学方法 应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析。数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用方差分析和 $t$ 检验，组间两两比较采用 $q$ 检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

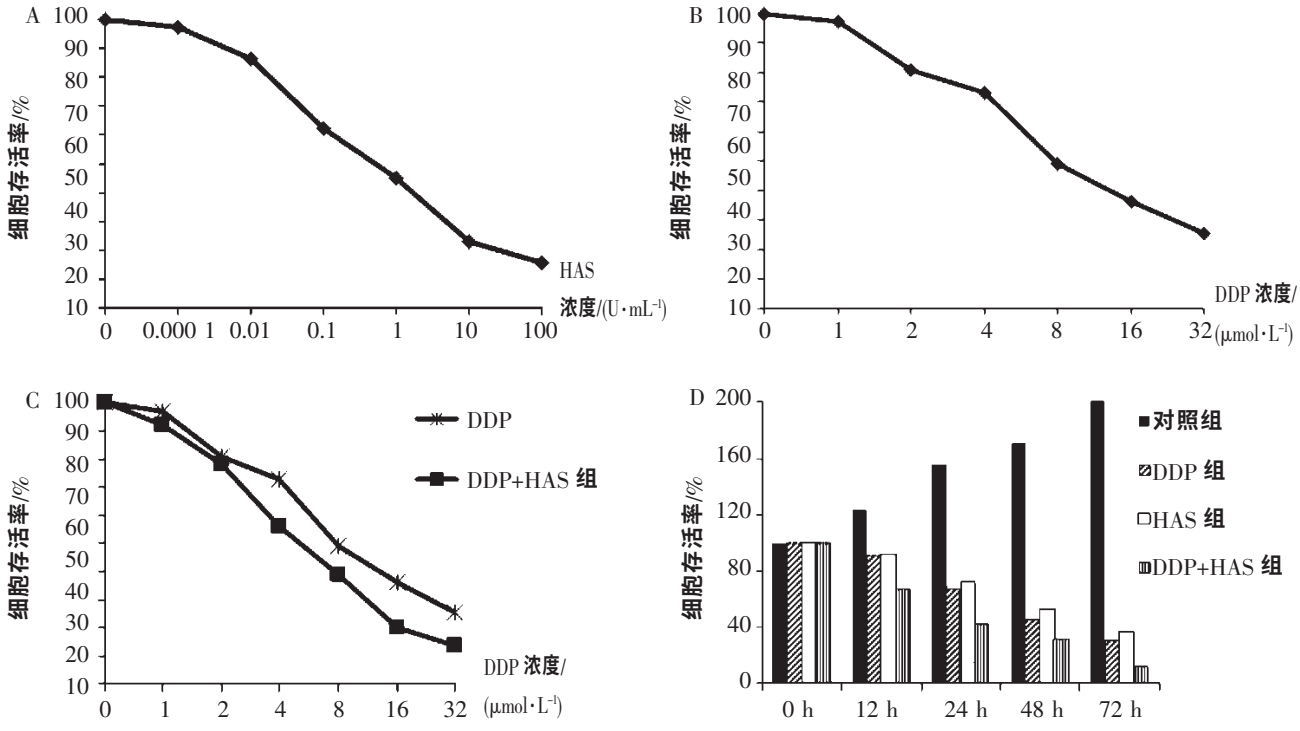
2.1 HAS 可抑制非小细胞肺癌细胞株 A549 的生长 应用不同浓度梯度的 HAS 作用于 A549 细胞，48 h 后经 CCK8 检测结果发现随着 HAS 浓度梯度的增加，细胞的存活率逐渐下降 (图 1A)，HAS 的 $IC_{50}$ 值 0.45 U/mL。应用不同浓度梯度的 DDP 作用于 A549 细胞，48 h 后经CCK8 检测结果发现随着 DDP 浓度梯度的增加，细胞的存活率逐渐下降(图 1B)，DDP 的 $IC_{50}$ 值 9.07 μmol/L。而按照 HAS 0.45 U/mL 的剂量处理细胞后，DDP 的 $IC_{50}$ 值为 5.63 μmol/L (图 1C)。分别按照对照组(等体积的 DMSO)，DDP 组(9 μmol/L)，HAS 组(0.45 U/mL)，DDP(6 μmol/L)联合 HAS(0.45 U/mL)4 种不同的处理因素分组，取 0、12、24、48、72 h CCK8 结果分析细胞存活率，发现 HAS 和 DDP 联合应用可显著抑制细胞生长，与单用 DDP 组和单用 HAS 组比较差异具有统计学意义。由此可知，HAS 能抑制肺癌细胞株的生长，并且呈时间剂量依赖性，HAS 联合 DDP 治疗较 DDP 单独治疗 $IC_{50}$ 值明显降低。

2.2 HAS 应用对非小细胞肺癌细胞株 A549 形态的影响 镜下可见：对照组细胞生长状态良好，成多边形，细胞融合成片状。经 HAS 处理后，可见细胞皱缩变圆，核固缩，与周围细胞黏附力减弱，脱落，悬浮细胞增多(图 2，见封二)，提示 HAS 能够抑制 A549 细胞生长并引起细胞损伤。随着作用时间的增加，上述现象更加明显，对 A549 细胞的增生抑制作用更加显著。

2.3 HAS 治疗的效果评价 3 组患者治疗后胸水疗效评价如表 1 所示。DDP 治疗组的总有效率 (PR+CR) 为 50%，HAS 组 72.2%，DDP+HAS 治疗组为 86.1%。3 组差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 HAS 治疗的不良反应评价 各组患者应用不同的胸腔积液的处理方法见表 2。HAS 组出现发热等副作用的例数多于其他组，体温 37.3~38.5 ℃，多

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net




注：A：按照不同浓度梯度的 HAS 处理 A549 细胞，计算细胞存活率和 $IC_{50}$；B：按照不同浓度梯度的 DDP 处理 A549 细胞，计算细胞存活率和 $IC_{50}$；C：比较单用 DDP 和应用 DDP 联合 HAS 两组的细胞存活率和 $IC_{50}$；D：按照 0、12、24、48、72 h 不同时间点测定 CCK8 结果，评价各组的细胞存活率。

图 1　HAS 抑制非小细胞肺癌细胞株 A549 的生长

表 1　HAS 联合顺铂与单药治疗恶性胸腔积液疗效比较($n$)

| 组别 | $n$ | CR | PR | SD | NC | PR+CR/% |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DDP 组 | 36 | 7 | 11 | 13 | 5 | 50.0 |
| HAS 组 | 36 | 9 | 17 | 8 | 2 | 72.2 |
| DDP+HAS 组 | 36 | 12 | 19 | 4 | 1 | 86.1 |

可在 6 h 内自行缓解。HAS 组发生胃肠道反应和骨髓抑制的比例要低于 DDP 组。两者联合应用不良反应发生率大大增高。

表 2　HAS 联合 DDP 与单药治疗恶性胸腔积液不良反应比较($n$)

| 组别 | $n$ | 发热 | 胸痛 | 消化道反应 | 骨髓抑制 |
|---|---|---|---|---|---|
| DDP 组 | 36 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| HAS 组 | 36 | 6 | 1 | 0 | 0 |
| DDP+HAS 组 | 36 | 6 | 2 | 3 | 4 |

## 3　讨　论

肺癌并发恶性胸腔积液是肺癌晚期常见的并发症[5]。由于胸腔积液生长迅速且持续存在，往往因大量积液的压迫而引起严重的呼吸困难等症状，甚至导致死亡，而反复胸腔穿刺抽液，可导致蛋白质大量丢失，增加感染机会，使全身情况恶化，因此及时进行合理有效的治疗，对缓解症状，减轻痛苦，提高生存质量，延长生命有着重要意义[6-7]。目前临床上多采用全身化疗结合胸腔内局部化疗治疗恶性胸水[8]，全身化疗后大多数患者会出现食欲下降，骨髓抑制，一般情况差，在此基础上再予胸腔内化疗，会加重化疗的毒副作用，且治疗胸水的有效率也仅为 40%~50%。

HAS 是从金葡菌的代谢产物中提取的生物反应调节剂，具有抗肿瘤及免疫调节的双重作用，HAS 能够激活巨噬细胞核中性粒细胞，诱导自然杀伤细胞活化和 T 细胞的分化增殖，显著提高机体免疫力；能诱导产生大量细胞因子如白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子、粒细胞集落刺激因子等，升高白细胞，减轻、放化疗的毒副反应。所以，我们在研究中选择 HAS 与 DDP 分别单独使用，以及联合使用进行对比，观察治疗的疗效和不良反应情况。

我们选择了非小细胞肺癌细胞株 A549 进行细胞水平研究[9]，应用不同浓度梯度的 HAS 作用于 A549 细胞并取不同时间点的细胞进行检测分析，发现 HAS 和 DDP 联合应用可以显著抑制细胞生长，较单用 DDP 组和单用 HAS 组差异具有统计学意义，且呈时间-剂量依赖性。

我们在对患者进行全身化疗的基础上，胸腔内注射 HAS，恶性胸水能够得到　(下转第 253 页)

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

量激素和免疫抑制剂无法维持,血小板数目仍<$20\times10^9$/L,处于出血范围,临床上有出血表现。因此,儿童ITP与成人ITP的病因与临床经过有很大的差别。

本文结果显示,儿童ITP患者的Th1、TH17异常升高,Th1、Th17细胞活化,而导致自身免疫反应的发生,产生血小板抗体。而Th2、Treg细胞表达异常,Th2、Treg细胞功能抑制,失去维持自身免疫耐受性,也导致自身免疫性疾病,是ITP发病的初步免疫机制。但是,我们发现,大部分儿童aITP的疗效好且病程短,短期内即停药恢复,是如何自我调节呢?而儿童ITP还有极少部分转化为RITP的机制又是如何呢?临床上对皮质激素、免疫抑制剂治疗无效,出现病情多次反复,治疗困惑,仍有待深入研究。调整与补充新的免疫指标,增加有关基因的定量分析,同时要进一步改进治疗方法提高治疗效果,需要动态观察儿童ITP疾病不同时期、不同转归时的免疫变化,以及多角度分析儿童与成人ITP不同起因和临床经过的免疫调控机制。

[参考文献]


[1] Wang T, Zhao H, Ren H, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura[J]. Haematologica, 2005, 90(7):914-923.

[2] Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, et al. The role of T helper 17(Th17) and regulatory T cells(Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease[J]. Clin Exp Immunol, 2007, 148(1):32-46.

[3] Corthay A. How do regulatory T cells work?[J]. Scan J Immunol, 2009, 70(4):326-336.

[4] Huter EN, Stummvoll GH, DiPaolo RJ, et al. Cutting edge: antigen-specific TGF beta-induced regulatory T cells suppress Th17-mediated autoimmune disease[J]. J Immunol, 2008, 181(12):8209-8213.

[5] Vila J, Isaacs JD, Anderson AE. Regulatory T cells and autoimmunity[J]. Curr Opin Hematol, 2009, 16(4):274-279.

[6] Zhang J, Ma D, Zhu X, et al. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura[J]. Haematologica, 2009, 94(9):1326-1329.

[7] 杨仁池. 特发性血小板减少性紫癜治疗中应该注意的几个问题[J]. 国际输血及血液学杂志, 2007, 30(6):484-486.


[收稿日期] 2011-05-18

(上接第250页)有效控制,有效率为72.7%,与单用DDP组的有效率50.0%相比较,差异具有统计学意义。联用HAS和DDP有效率有所提高,为86.1%,但同时也增加了患者出现胃肠道反应及骨髓抑制的不良反应发生率,导致患者全身情况恶化等诸多弊端。研究结果还显示局部应用HAS主要不良反应是发热,大多数是一过性发热,无需治疗,4~6 h能自行缓解。

综上所述,HAS对A549细胞增生具有明显的抑制作用,且呈时间-剂量依赖性。HAS局部胸腔内注射能够促进胸腔积液的吸收,且不良反应较DDP小,具有临床应用价值。

[参考文献]


[1] Qi Y, Schild SE, Mandrekar SJ, et al. Pretreatment quality of life is an independent prognostic factor for overall survival in patients with advanced stage non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2009, 4(9):1075-1082.

[2] Duysinx B, Corhay JL, Larock MP, et al. Prognostic value of metabolic imaging in non-small cell lung cancers with neoplasic pleural effusion[J]. Nucl Med Commun, 2008, 29(11):982-986.

[3] 刘清. 高聚金葡素联合顺铂治疗恶性胸腔积液临床观察[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(16):1700-1701.

[4] Marom EM, Palmer SM, Erasmus JJ, et al. Pleural effusions in lung transplant recipients: image-quided small-bore catheter drainage[J]. Radiology, 2003, 228(1):241-245.

[5] 郭建雄, 张荣侠. 晚期非小细胞肺癌合并肺结核26例临床分析[J]. 南通大学学报:医学版, 2008, 28(6):488-489.

[6] Neragi-Miandoab S. Malignant pleural effusion,current and evolving approaches for its diagnosis and management[J]. Lung Cancer, 2006, 54(1):1-9.

[7] Masago K, Fujita S, Togashi Y, et al. Clinical significance of pretreatment C-reactive protein in patients with advanced nonsquamous, non-small cell lung cancer who received cefitinib[J]. Oncology, 2011, 79(5-6):355-362.

[8] Weber F, Siska P, Kramer M, et al. Combining an FPTase inhibitor with cisplatin facilitates induction of apoptosis in human A549 lung cancer cells[J]. J Exp Ther Oncol, 2011, 9(1):53-65.

[9] 邢丽华, 樊再雯, 刘剑波. 核因子-κB抑制剂联合顺铂对A549细胞株的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2005, 4(3):203-205.


[收稿日期] 2011-05-10

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

李成，等. 血管回声跟踪技术诊断动脉粥样硬化价值的研究 (正文见第 240 页)

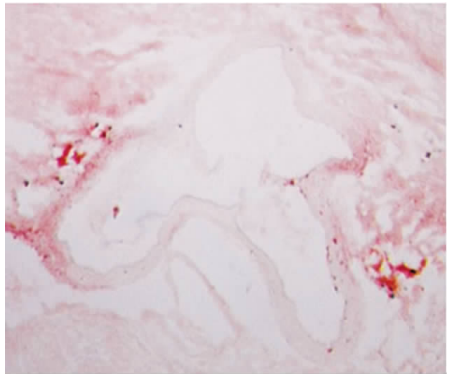


图 1　对照组新西兰兔主动脉病理图(HE，100×)

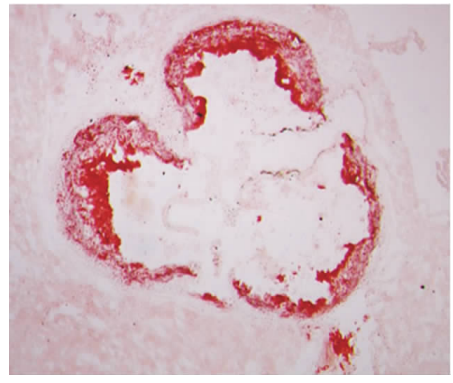


图 2　高脂组新西兰兔主动脉病理图(HE，100×)

钮晓音，等. OmpC-HBsAg‘a’表位嵌合蛋白疫苗的构建表达及其对 HBV 转基因小鼠的免疫效果研究 (正文见第 245 页)

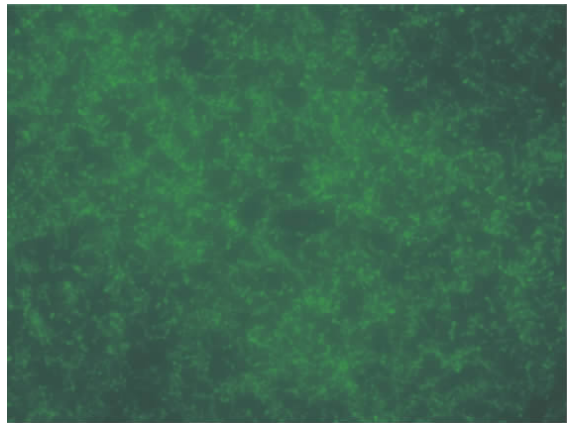
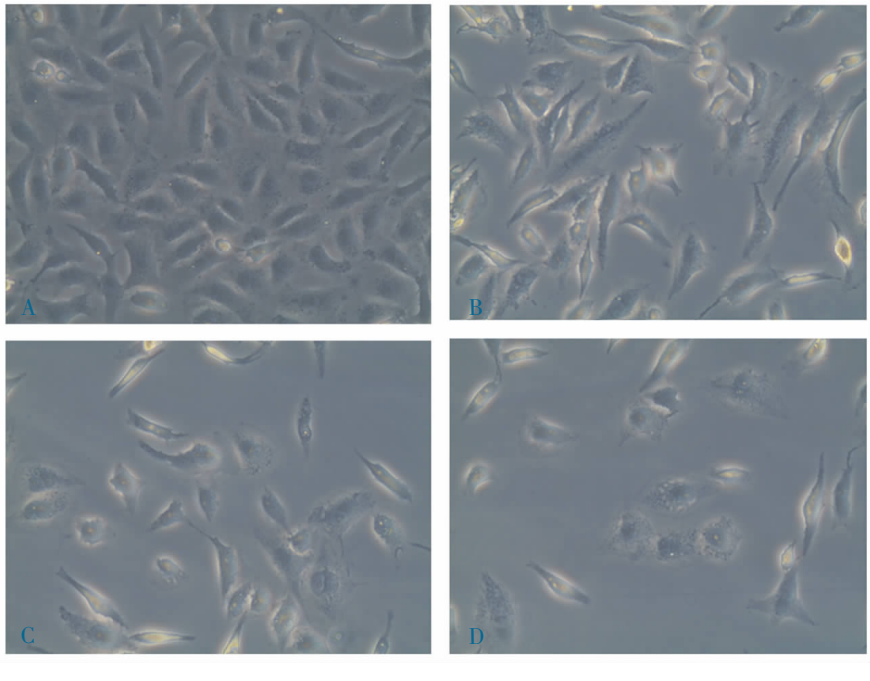


图 6　免疫荧光采用 3E7 抗体和羊抗鼠 FITC 对表达 OmpC-HBsAg‘a’表位嵌合蛋白的 BL21 菌进行检测

柯军，等. 高聚金葡素对非小细胞肺癌细胞株 A549 的生长抑制及其治疗恶性胸腔积液的效果观察 (正文见第 249 页)




注：A、B、C、D 分别观察了处理后 0、24、48、72 h A549 细胞的生长情况(倒置相差显微镜 200×)。

图 2　HAS 抑制非小细胞肺癌细胞株 A549 的生长

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net