

血小板活化标志物 CD62P、CD63 的表达与血小板参数对非小细胞肺癌患者的意义^{*}

雷 鸣, 胡黎娅[△], 王自米, 金从国, 杨 蕊(昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院检验科, 昆明 650031)

【摘要】 目的 分析非小细胞肺癌患者血小板活化标志物 CD62P、CD63 及血小板参数作为肺癌肿瘤标志物的可行性, 为其作为靶分子治疗肺癌提供一定的依据。**方法** 选择 2014 年 1 月至 2015 年 1 月该院收治的 62 例确诊为非小细胞肺癌初治患者为肺癌组, 同期 45 例肺良性病变患者为肺良性病变组, 38 例体检健康者为健康对照组。采用抗血小板膜糖蛋白的单克隆抗体分子探针, 经免疫荧光标记, 用流式细胞术检测单个或血小板亚群膜糖蛋白的表达, 同时采用血细胞分析仪联合检测。**结果** (1) 肺癌患者 CD62P、CD63、血小板计数(PLT), 平均血小板体积(MPV), 血小板比容(PCT)与肺良性病变组及健康对照组间比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 血小板分布宽度(PDW)差异无统计学意义($P > 0.05$)。 (2) 肺腺癌与肺鳞癌的 CD62P、CD63 水平比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); CD62P、CD63 水平与肿瘤分化程度、患者性别、年龄均无关($P > 0.05$)。 (3) CD62P 和 CD63 的表达水平随 TNM 分期的增加而升高, III + IV 期与 I + II 期比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。CD62P 和 CD63 表达与有无淋巴结转移和有无远处转移有密切关系($P < 0.05$)。**结论** 肺癌患者血小板活化标志物 CD62P、CD63 和血小板参数对肺癌的发生、发展、淋巴结转移和远处转移有一定关系, 对其进行动态监测具有重要的临床价值。

【关键词】 CD62P; CD63; 肺癌; 活化标志物

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2016.10.008 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)10-1319-03

Significance of detecting platelet activation markers CD62P, CD63 expression and platelet parameters in patients with non-small cell lung cancer^{*} LEI Ming, HU Li-ya[△], WANG Zi-mi, JIN Cong-guo, YANG Rui (Department of Clinical Laboratory, Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/ Yunnan Provincial Tumor Hospital, Kunming, Yunnan 650031, China)

【Abstract】 Objective To analyze the feasibility of platelet activation marker CD62P, CD63 and platelet parameters as the tumor markers of lung cancer to provide a certain evidence for treating lung cancer with them as the targeted molecules. **Methods** A total of 62 cases of non-small cell lung cancer (NSCLC) treated in our hospital from January 2014 to January 2015 were selected as the lung cancer group, contemporaneous 45 cases of benign lung diseases were selected as the lung benign disease group and 38 individuals undergoing the physical examination as the control group. By using the platelet membrane glycoproteins monoclonal antibody molecules probe and immunofluorescence labeling, the flow cytometry was adopted to detect platelet membrane glycoproteins expression of single or PLT subgroup. At the same time, the hematology analyzer was used to detect the platelet parameters. **Results** (1) CD62P, CD63, PLT, MPV and PCT had statistical differences among the lung cancer group, lung benign disease group and normal control group ($P < 0.05$); PDW had no statistical difference ($P > 0.05$). (2) The expression of CD62P and CD63 had statistical difference between lung adenocarcinoma and lung squamous carcinoma ($P < 0.05$); the CD62P and CD63 levels had no relation with the tumor differentiation degree, sex, age ($P > 0.05$). (3) The CD62P and CD63 expression levels were increased with TNM stage increase, the difference between the stage III + IV and the stage I + II was statistically significant ($P < 0.05$). The CD62P and CD63 expressions were closely related with lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion** The platelet activation markers CD62P and CD63 expression levels and platelet parameters have a certain relation with the occurrence, development, lymph node metastasis and distant metastasis of lung cancer. Their dynamic monitoring has an important clinical value.

【Key words】 CD62P; CD63; lung cancer; activation marker

近年来, 肺癌发病率和病死率在我国均升至恶性肿瘤首位, 肿瘤侵袭和转移是非小细胞肺癌最重要的生物学行为^[1]。研究表明血小板活化状态及其数量的增多与肺癌的发生、发展及转移密切相关^[2]。血小板可在保护肿瘤细胞逃避免疫系统

杀伤、促进肿瘤细胞与血管内皮细胞的黏附以及肿瘤细胞植入后的生长等多个环节参与肿瘤转移, 其中血小板黏附分子及其释放产物起到了关键性的作用^[3]。中、晚期肿瘤患者的血小板往往处于活化状态, 其血小板黏附分子的表达和释放增加^[4]。

^{*} 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金资助项目(2013Y299)。

作者简介: 雷鸣, 男, 硕士, 主管检验师, 主要从事免疫学检验工作。 [△] 通讯作者, E-mail: kmhly92@163.com。

CD62P 和 CD63 分别是血小板细胞质中的 α -颗粒内膜糖蛋白及溶酶体膜糖蛋白,活化时可在血小板膜表面表达。笔者采用流式细胞术检测不同组织类型、临床分期的非小细胞肺癌患者血小板 CD62p、CD63 的表达水平,以了解血小板的活化程度,同时联合血小板参数,探讨其在肺癌患者早期诊断、分期、分型和判断是否转移的意义,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般材料 肺癌组为 2014 年 1 月至 2015 年 1 月本院收治的经病理学、CT、MRI 等影像学检查确诊为非小细胞肺癌的 62 例初治肺癌患者,其中男 41 例,女 21 例;年龄 38~85 岁,中位年龄 60 岁,其中≤60 岁 25 例,>60 岁 37 例;鳞癌 38 例,腺癌 24 例;高分化 8 例,中分化 35 例,低分化例 19 例。参照国际肺癌研究协会(IASLC) 2009 年第 7 版肺癌 TNM 分期标准,其中 I + II 期 33 例,III + IV 期 29 例;无淋巴结转移者 25 例,有淋巴结转移者 37 例;无远处转移者 48 例,有远处转移者 14 例。肺部良性病变组为同期收集的肺良性病变患者 45 例;健康对照组为同期本院体检的健康者 38 例。

1.2 仪器与试剂 试剂: CD61 2FITC、CD62 P2PE、CD63 2PE 及同型对照 IgG1 2PE 购自 BD 公司。仪器: Beckmam-

Coulter FC500 流式细胞仪。由美国 BD 公司提供的流式细胞分析仪及配套试剂。血小板参数检测由日本 Sysmex 公司提供的 THS302 流水线及配套试剂。

1.3 方法 标本检测前、检测中严格按照 SOP 文件进行室内质控。全部入选对象均按照标准的采血步骤及方法,于清晨 6:00~8:00 采集空腹静脉血 2 mL。注入灭菌后的肝素抗凝管中,颠倒混匀。采用流式细胞术检测各组外周血血小板活化标志物 CD62P 和 CD63。同时用 EDTA-K₂ 采血管采血 2 mL 检测血小板参数[血小板计数(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板比容(PCT)、血小板分布宽度(PDW)]。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件包进行统计处理和分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用 *F* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组间各项检查结果比较 肺癌患者 CD62p、CD63、PLT、MPV、PCT 与肺良性病变组及健康对照组间比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),PDW 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。各检测值在健康对照组与肺良性病变组之间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 3 组间各项检查结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD62p(%)	CD63(%)	PLT($\times 10^9/L$)	MPV(fL)	PCT(%)	PDW(fL)
健康对照组	38	2.27 ± 2.11 [△]	6.83 ± 2.85 [△]	228.00 ± 64.21 [△]	9.06 ± 1.00 [△]	0.24 ± 0.06 [△]	11.22 ± 2.42
肺良性病变组	45	9.01 ± 3.65 [△]	11.02 ± 3.87 [△]	230.00 ± 69.32 [△]	10.23 ± 1.01 [△]	0.24 ± 0.08 [△]	11.56 ± 2.22
肺癌组	62	11.64 ± 3.79	15.73 ± 4.22	276.00 ± 105.99	11.70 ± 1.03	0.29 ± 0.10	12.51 ± 2.17

注:与肺癌组比较,△*P* < 0.05。

表 2 肺癌患者术前血小板活化标志物 CD62p 和 CD63 的表达与临床病理、生理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	<i>n</i>	CD62P(%)		CD63(%)	
		检测值	<i>P</i>	检测值	<i>P</i>
年龄	≤60 岁	25	2.75 ± 1.52	0.095	2.64 ± 1.33
	>60 岁	37	2.87 ± 1.72		2.93 ± 1.68
性别	男	41	2.83 ± 1.82	0.088	2.92 ± 1.49
	女	21	2.74 ± 1.67		2.79 ± 1.66
组织类型	鳞癌	38	2.68 ± 1.42	0.032	2.70 ± 1.43
	腺癌	24	3.08 ± 1.98		3.15 ± 1.51
分化程度	高、中分化	43	2.73 ± 1.62	0.075	2.66 ± 1.23
	低分化	19	2.89 ± 1.81		2.85 ± 1.43
TNM 分期	I + II 期	33	2.21 ± 1.23	0.000	2.17 ± 1.30
	III + IV 期	29	3.38 ± 1.62		3.04 ± 1.62
淋巴转移	无	27	2.13 ± 1.41	0.000	2.09 ± 1.30
	有	35	3.02 ± 1.77		2.96 ± 1.83
远处转移	无	48	2.09 ± 1.48	0.000	2.17 ± 1.25
	有	14	3.23 ± 1.86		2.91 ± 1.67

2.2 肺癌患者术前 CD62p 和 CD63 的表达水平与临床病理、生理特征的关系 肺癌患者的组织类型不同,CD62p 和 CD63 的表达存在差异:肺腺癌与肺鳞癌比较,肺腺癌 CD62p 和 CD63 的表达水平明显高于肺鳞癌,差异有统计学意义(*P* <

0.05)。而 CD62p 和 CD63 的表达水平与细胞分化程度、患者性别、年龄均无关(*P* > 0.05)。CD62p 和 CD63 的表达水平随 TNM 分期的增加而升高,III + IV 期与 I + II 期比较,差异有统计学意义(*P* < 0.05),与淋巴结转移和远处转移有密切关系(*P* < 0.05),见表 2。

3 讨 论

研究发现,肿瘤细胞通过释放组织因子、凝血酶和基质金属蛋白酶等诱导血小板激活。活化的血小板表达大量糖蛋白分子于膜表面,并黏附在肿瘤细胞周围形成血小板-肿瘤细胞复合物(TCIPA),为肿瘤细胞在脉管系统中的存活及成功转移提供了可能性^[5]。CD62P 是选择素家族中的一员,主要存在于血小板 α -颗粒内,为血小板活化的重要标志物,其在肺癌恶性生物学行为的作用不容忽视^[6];CD63 存在于血小板溶酶体颗粒中^[7]。这些膜蛋白在静息血小板上不表达,但在活化-介导的脱颗粒之后就暴露出来。CD62P 是目前最具特征性的血小板活化标志物,CD63 被认为是一种比 CD62P 更为敏感的血小板活化标志物^[7-8]。在本研究中,首先使用血细胞分析仪和流式细胞仪分别对肺癌组、肺良性病变组和健康对照组的 CD62P、CD63、PLT、MPV、PCT 和 PDW 等参数进行检测。结果显示,肺癌组 CD62P、CD63、PLT、MPV 和 PCT 水平明显高于健康对照组及肺良性病变组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);PDW 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。各检测值在健康对照组与肺良性病变组之间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。表明在肺癌患者中,PLT 升高,PCT 和 MPV 增大,与雷鸣等^[9]的研究报道相同。肺癌患者常表现为血液高凝状态、血小板破坏加速、反馈性骨髓巨核细胞增生。同时,肿瘤细胞产生

的骨髓刺激物质的增加等多因素导致血小板数量、形态以及大小改变的新生血小板数量增加。结果显示肺癌患者 CD62P、CD63 水平较高,表明血小板处于活化状态。可能与肺癌细胞可分泌多种异常成分,激活血小板,从而使血小板表面大量表达黏附分子表达有关。

本研究结果显示,肺腺癌外周血 CD62P、CD63 水平明显高于肺鳞癌($P<0.05$)。这可能与肺腺癌较早出现转移,且分泌较多促血小板活化物质有关。CD62P、CD63 表达水平随 TNM 分期增加而升高,Ⅲ+Ⅳ期与Ⅰ+Ⅱ期比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。表明在中、晚期肺癌患者有更高的血小板活化水平。发生淋巴结转移的肺癌患者血小板 CD62P、CD63 表达水平与未发生转移者之间比较,差异有统计学意义($P<0.05$),可能血小板活化更容易发生淋巴结转移。有报道,在淋巴结尚未转移的Ⅰ期非小细胞肺癌中,约 30%~50% 的患者存在骨髓和血循环隐匿性癌细胞播散^[10]。肺癌患者的治疗效果和预后判定很大程度上取决于是否早期发生肿瘤淋巴结转移,密切关注其动态变化有助于对病情的判断。发生远处转移的肺癌患者血小板 CD62P、CD63 表达水平明显高于未发生转移的肺癌组织。多项研究表明,实体肿瘤在生长早期就开始持续、恒定地向血循环释放癌细胞,血液中出现癌细胞与肿瘤转移存在明确的因果关系^[11]。

综上所述,CD62P、CD63 表达水平联合血小板参数检测对判断非小细胞癌患者的临床分期、淋巴结转移和远处转移有很好的参考价值。由于实验条件所限,有的标本未及时送检以及标本的质量和数量都会对结果产生一定的影响。因此,有待于更大样本数的研究而加以证实。

参考文献

[1] Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms[J]. Blood, 2007, 110(6): 1723-1729.

[2] 雷鸣,郭凤丽,梅伟,等. 卵巢癌 FIGO 分期与血小板计数

(上接第 1318 页)

[3] 黄山,刘志琴,樊学军. 心脏标志物临床与检验[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:131-134.

[4] 鲍骏,陈肖霞,沈成兴. 冠状动脉钙化危险因素研究进展[J]. 中华临床医师杂志(电子版),2014,4(3):318-319.

[5] Li HW, Yang ZM, Xiao CS. Identification of stability in coronary artery atherosclerosis plaque[J]. Adv Cardiovasc Dis, 2005, 26(6): 581-584.

[6] Agatston AS, Janowitz WR, Hildner FJ, et al. Quantification of coronary artery calcium using ultrafast computer tomography[J]. JACC, 1990, 15(4): 827-830.

[7] Greenland P, Bonow RO, Brundage BH, et al. ACCF/AHA 2007 clinical expert consensus document on coronary artery calcium scoring by computed tomography in global cardiovascular risk assessment and in evaluation of patients with chest pain: a report of the american college of cardiology foundation clinical expert consensus task force[J]. J AM Coll Cardiol, 2007, 49(8): 378-402.

[8] 王蓓芸,谈世进,钟远. 老年冠心病患者冠状动脉钙化积分与血清 IL-10 相关性[J]. 中华老年多器官疾病杂志

相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(14): 32-34.

[3] Gay LJ, Felding-Habermann B. Contribution of platelets to tumour metastasis[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(2): 123-134.

[4] Palumbo JS, Degen JL. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor metastasis[J]. Thromb Res, 2007, 120(Suppl 2): S22-28.

[5] Hu L, Roth JM, Brooks PI, et al. Twist is required for thrombin-induced tumor angiogenesis and growth[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4296-4302.

[6] Maynard DM, Heijnen HF, Horne MK, et al. Proteomic analysis of platelet alpha-granules using mass spectrometry[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(9): 1945-1955.

[7] Pfistershammer K, Majdic O, Stöckl J, et al. CD63 as an activation-linked T cell costimulatory element[J]. J Immunol, 2004, 173(10): 6000-6008.

[8] Battinelli EM, Markens BA, Italiano JE Jr. Release of angiogenesis regulatory proteins from platelet alpha granules: modulation of physiologic and pathologic angiogenesis[J]. Blood, 2011, 118(5): 1359-1369.

[9] 雷鸣,杨丽,胡太华,等. 非小细胞肺癌远处转移与血小板参数变化的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(7): 729-730.

[10] Jain S, Zuka M, Liu J, et al. Platelet glycoprotein I b alpha supports experimental lung metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(21): 9024-9028.

[11] 宫亮,杨和平. 肺癌患者外周血小板在肺癌血行转移中的作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(13): 2502-2504.

(收稿日期:2015-11-15 修回日期:2016-01-12)

2012, 11(6): 453-454.

[9] Li G, Lu WH, Ai R, et al. The relationship between serum hypoxia-inducible factor 1 α and coronary artery calcification in asymptomatic type 2 diabetic patients[J]. Cardiovasc Diabetol, 2014, 13(1): 52-57.

[10] 林乐清,朱建华. 妊娠相关血浆蛋白 A 与冠心病关系研究进展[J]. 医学研究杂志, 2000, 36(8): 7-9.

[11] 李晓涛,夏岳,郭喜朝,等. 血浆骨桥蛋白水平与冠状动脉病变狭窄程度的关系研究[J]. 中国循环杂志, 2011, 26(4): 271-274.

[12] 张文勇,胡咏梅,王勉,等. 冠状动脉钙化患者血浆骨桥蛋白的水平变化及介入治疗对其影响[J]. 临床心血管病杂志, 2009, 25(8): 603-605.

[13] Burton DA, Matsubara H, Ikeda K. Pathophysiology of vascular calcification: pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells[J]. Exp Gerontol, 2010, 45(11): 819-824.

(收稿日期:2015-10-25 修回日期:2015-12-24)