

## 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白水平变化及影响因素分析

陈晓群, 金从国, 李 佳, 申文香, 姚 乾, 伍治平

(昆明医科大学第三附属医院, 云南省肿瘤医院肿瘤研究所, 云南 昆明 650118)

**[摘要]** **目的** 探讨胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白水平变化及其影响因素的临床意义. **方法** 采用流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 检测 87 例胃癌患者和 40 例健康体检者外周血血小板膜糖蛋白 CD62p、CD63 水平, 并作对比分析. **结果** 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白 CD62p ( $4.15 \pm 1.42$ )%、CD63 ( $4.72 \pm 1.54$ )% 水平明显高于健康体检者 CD62p ( $1.54 \pm 0.44$ )%、CD63 ( $1.23 \pm 0.34$ )%, 2 者间差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ). 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白水平变化分别受临床分期 CD62p、CD63 分别为 [ $(2.80 \pm 0.63)$ 、 $(4.76 \pm 1.25)$ 、 $(3.28 \pm 0.70)$  ( $5.36 \pm 1.37$ )]、手术与否 CD62p、CD63 分别为 [ $(3.49 \pm 1.21)$ 、 $(4.86 \pm 1.28)$ 、 $(3.98 \pm 1.31)$  ( $5.51 \pm 1.38$ )] 及肿瘤转移与否 CD62p、CD63 分别为 [ $(4.94 \pm 1.07)$ 、 $(3.31 \pm 1.25)$ 、 $(5.55 \pm 1.19)$ 、 $(3.82 \pm 1.38)$ ] 等因素的影响, 而不受性别及病理类型的影响. **结论** 监测外周血血小板膜糖蛋白水平可成为胃癌患者病情进展和预后观察的动态指标.

**[关键词]** 胃癌; 外周血; 血小板; 膜糖蛋白

**[中图分类号]** R737.9; R730.43 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 10-0082-04

## The Changes of Platelet Membrane Glycoprotein Levels in Peripheral Blood of Patients with Gastric Cancer and Its Influencing Factors

CHEN Xiao-qun, JIN Cong-guo, LI Jia, SHEN Wen-xiang, YAO Qian, WU Zhi-ping

(The 3rd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Cancer Institute of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the clinical significance of the changes of platelet membrane glycoprotein levels in peripheral blood of patients with gastric cancer and its influencing factors. **Methods** The levels of platelet membrane glycoproteins (CD62p and CD63) in peripheral blood of 87 patients with gastric cancer were measured by flow cytometry (FCM). 40 healthy people were served as control. Statistical analysis was performed by using the SPSS 10.0 software package. **Results** The levels of platelet membrane glycoproteins in peripheral blood in patients with gastric cancer [CD62p: ( $4.15 \pm 1.42$ )% and CD63 ( $4.72 \pm 1.54$ )%] were significantly higher than controls [CD62p ( $1.54 \pm 0.44$ )% and CD63 ( $1.23 \pm 0.34$ )%]  $P < 0.01$ . The levels of platelets membrane glycoproteins in peripheral blood in patients with gastric cancer were significantly associated with clinical stage [CD62p ( $2.80 \pm 0.63$ ) versus ( $4.76 \pm 1.25$ ); CD63 ( $3.28 \pm 0.70$ ) versus ( $5.36 \pm 1.37$ )], operation [(CD62p:  $3.49 \pm 1.21$ ) versus ( $4.86 \pm 1.28$ ), ( $3.98 \pm 1.31$ ) versus ( $5.51 \pm 1.38$ )], metastasis [CD62p ( $4.94 \pm 1.07$ ) versus ( $3.31 \pm 1.25$ ); CD63 ( $5.55 \pm 1.19$ ) versus ( $3.82 \pm 1.38$ )], while were not influenced by gender and pathological types. **Conclusion** Detecting the levels of platelets membrane glycoprotein in peripheral blood may dynamically monitor the progression and prognosis of gastric cancer.

**[Key words]** Gastric cancer; Peripheral blood; Platelet; Membrane glycoprotein

**[基金项目]** 云南省卫生厅科技计划项目 (2011WS0066)

**[作者简介]** 陈晓群 (1967~), 女, 云南昆明市人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事肿瘤免疫研究工作.

**[通讯作者]** 伍治平. E-mail: wuzhiping2004@163.com

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 近年来发病率有上升的趋势, 最新资料表明, 我国恶性肿瘤发病中, 胃癌位于第 2 位, 仅次于肺癌<sup>[1]</sup>. 大部分胃癌患者确诊时已处于中晚期, 故对胃癌的治疗及预后研究是十分必要的. 有研究表明, 血小板的变化与恶性肿瘤的预后密切相关. 肿瘤的侵袭和转移是导致患者死亡的主要原因. 血小板对肿瘤的转移形成及在血行转移过程有促进作用, 并有可能直接参与肿瘤细胞的血行转移过程. 活化后的血小板聚集并粘附于血循环中的肿瘤细胞, 使肿瘤细胞逃避免疫系统监控, 促进肿瘤细胞的血行转移<sup>[2]</sup>. 血小板膜糖蛋白的过度表达是血小板活化的标志之一. 笔者采用病例对照研究应用流式细胞术 (flow cytometry, FCM), 检测胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白 CD62p、CD63 水平并与正常人比较, 同时分析影响胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白水平变化的因素, 探讨其临床意义.

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

**1.1.1 病例选择** 选择 2012 年 4 月至 2013 年 11 月就诊的胃癌患者 87 例, 其中男 58 例, 女 29 例. 年龄 23 ~ 81 岁. 除外标准: 慢性心、肝、肾疾病及糖尿病患者、严重感染患者以及受检 1 个月内接受抗血小板药物和抗凝治疗的患者. 所有病例均经病理检查确诊: 其中低分化腺癌、印戒细胞癌 47 例, 中分化腺癌 22 例, 高分化腺癌 18 例; 临床分期采用国际 TNM 分期标准: I 期 8 例, II 期 19 例, III 期 54 例, IV 期 6 例. 另选 40 例同期来体检的健康者为对照组.

**1.1.2 试剂** CD61-FITC、CD62p-PE、CD63-PE、CD41 及同型对照 IgG1-PE (购自 IMMUNOTECH 公司).

**1.1.3 仪器** Beckman-Coulter 流式细胞仪, 型号 EPICS-XL.

### 1.3 统计学处理

使用 SPSS 统计软件包分析. 计量资料用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示. 计量资料的均数比较用 *t* 检验及方差分析, 多组间两两比较采用 LSD 法,

**1.1.4 标本收集** 患者入院确诊后于术前第 1 次采空腹外周静脉血 1 mL, 枸橼酸钠抗凝. 抽血时要求取末端血, 防止振荡并在 30 min 内标记. 并于术后两周第 2 次采血复检.

### 1.2 方法

采用流式细胞术检测外周血血小板活化标志物 CD62p 和 CD63. 检测步骤包括: 在 3 支试管中各加入 CD61-FITC 10 μL 后, 再分别在不同试管中加入 IgG1-PE 10 μL, CD62p-PE 10 μL 和 CD63-PE 10 μL. 用 200 μL PBS 稀释后, 各加入 5 μL 全血, 室温避光静置 15 min 后上机检测; 使用阴性对照管 (CD61-FITC+IgG1-PE) 调整电压后, 检测标记 CD62p-PE 和 CD63-PE; 用 CD61 设门, 分析 CD61 门中表达 CD62p 和 CD63 的阳性率, 见图 1、图 2.

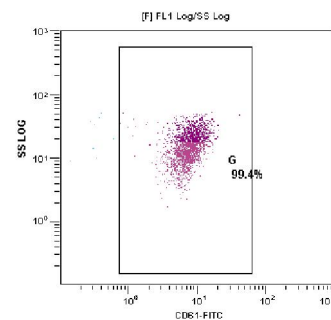


图 1 CD61 设门圈出所有血小板

Fig. 1 The CD61 gate was set to frame all platelets

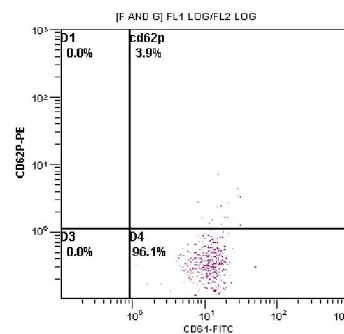


图 2 检测血小板活化水平 (CD62p 或 CD63)

Fig. 2 Detection of platelet activation levels (CD62p or CD63)

$$\text{CD62p 阳性率} = \frac{\text{CD61 门中标记上的 CD62p 血小板}}{\text{CD61 门中全部血小板}} \times 100\%$$

$$\text{CD63 阳性率} = \frac{\text{CD61 门中标记上的 CD63 血小板}}{\text{CD61 门中全部血小板}} \times 100\%$$

$P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 胃癌患者与对照组外周血血小板膜糖蛋白水平比较

分别得出了胃癌患者外周血血小板活化水平, 明显高于健康对照组, 差异有统计学意义,  $P=0.000$ , 见表 1.

### 2.2 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白检测水平的影响因素

胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白检测水平的影响因素包括性别、年龄、病理类型、临床分期、手术与否和肿瘤转移与否. 结果显示, III、IV 期胃癌患者外周血 CD62p、CD63 检测水平均显著高于 I、II 期胃癌患者, 具有统计学意义 ( $P=0.000$ ); 胃癌患者手术与否以及肿瘤转移与否对血小板活化水平均有影响, 未行手术的患者活化水平明显高于行手术者, 差异有统计学意义 ( $P=0.000$ ); 有转移的胃癌患者活化标志物水平高于没有发生转移的患者 ( $P=0.000$ ); 同时笔者还观察到, 年龄对胃癌患者血小板膜糖蛋白水平有影响, 60 岁以上的患者各项检测指标均高于 60 岁以下的患者,  $P=0.000$ ; 而各个活化指标不受性别及病理类型的影响, 见表 2.

## 3 讨论

肿瘤的生长、侵袭和转移的形成是一个复杂的多环节过程, 受到多种作用因子和细胞的作用<sup>[1]</sup>. 恶性肿瘤的发生和发展往往伴随着血小板数量的增多和 / 或活性的明显增高<sup>[2]</sup>. 在正常血液循环中血小板处于静息状态. 而血管内皮的损伤、血小板与肿瘤细胞相互作用及作用时释放的生物活性物质是血小板激活和释放的主要原因. 研究表明: 几乎 80% 以上的恶性肿瘤患者凝血系统出现异常, 包括血液循环中的组织因子 (TF)、凝血酶 - 抗凝血酶 (TAT) 复合物以及血小板明显增高<sup>[3,4]</sup>. 血液循环中组织因子和凝血酶的异常增高不仅引起血小板的

表 1 胃癌患者与对照组外周血血小板活化标志物水平比较  
[( $\bar{x} \pm s$ ), %]

Tab. 1 Comparison of the levels of platelet activation markers in peripheral blood between gastric cancer patients group and control group [( $\bar{x} \pm s$ ), %]

组别	n	CD62P	CD63
对照组	40	1.54 ± 0.44	1.23 ± 0.34
胃癌组	87	4.15 ± 1.42**	4.72 ± 1.54**

与对照组比较, \*\* $P < 0.01$ .

表 2 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白检测水平的影响因素  
[( $\bar{x} \pm s$ ), %]

Tab. 2 The factors influencing the detection levels of platelets membrane glycoprotein in peripheral blood of gastric cancer patients [( $\bar{x} \pm s$ ), %]

P 值	n	0.000	0.000
影响因素		cD62	cD63
性别			
男	58	4.16 ± 1.42	4.74 ± 1.56
女	29	4.13 ± 1.45	4.67 ± 1.54
P 值		0.932	0.845
年龄			
≤ 60 岁	35	3.50 ± 1.34	3.99 ± 1.44
> 60 岁	52	4.59 ± 1.31	5.20 ± 1.43
P 值		0.000	0.000
病理类型及分化程度			
中、高分化腺癌	40	3.95 ± 1.39	4.30 ± 1.57
低分化腺癌、印戒细胞癌	47	4.04 ± 1.57	4.49 ± 1.63
P 值		0.843	0.711
临床分期			
I + II 期	27	2.80 ± 0.63	3.28 ± 0.70
III + IV 期	60	4.76 ± 1.25	5.36 ± 1.37
P 值		0.000	0.000
转移与否			
是	45	4.94 ± 1.07	5.55 ± 1.19
否	42	3.31 ± 1.25	3.82 ± 1.38
P 值		0.000	0.000
手术与否			
是	45	3.49 ± 1.21	3.98 ± 1.31
否	42	4.86 ± 1.28	5.51 ± 1.38

活化、聚集并粘附在血循环中的肿瘤细胞、血管内皮细胞上, 促进肿瘤细胞的血行转移, 而且还可能介导血管生成<sup>[5]</sup>. 在肿瘤的血行转移过程中, 活化的血小板可增强肿瘤细胞与内皮细胞以及基底膜 (ECM) 的粘附, 而肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附主要由活化的血小板表面的 CD62P 介导<sup>[6]</sup>.

GMP-140 又称 P-选择素 (CD62p) 属粘附分子选择素家族的组分之一. 正常情况下, CD62p 在血小板膜表面不表达. 当血小板活化时, CD62p 随着  $\alpha$  颗粒内容物被释放, 或通过开放的管道系统的膜与血小板膜融合而持久表达在活化的血小板表面, 这种表达不被血浆蛋白所掩盖, 且不随时间的推移而在活化的血小板表面消失. 因此, CD62p 是目前所知反应血小板活化与释放最具特异性的分子标志物<sup>[7]</sup>. CD63 为溶酶体颗粒膜蛋白, 为静止血小板溶酶体膜的组成成分, 当血小板活化时溶酶体膜

溶解, 与血小板浆膜融合后表达于血小板膜上, 成为血小板活化的标志<sup>[10]</sup>.

本组资料显示, 胃癌患者外周血血小板膜糖蛋白检测水平明显高于正常人, 表明胃癌患者外周血血小板处于活化状态. 处于活化状态的血小板可通过膜间的糖-糖识别、糖-蛋白质识别、直接或间接的蛋白质-蛋白质连接等方式作用于肿瘤细胞, 一方面包裹肿瘤细胞, 导致免疫系统无法识别和清除肿瘤细胞; 另一方面增强了肿瘤细胞与血管内皮细胞和 ECM 的粘附, 而有利于肿瘤细胞的血行转移.

本组资料还显示, 临床分期、手术与否以及是否有转移是胃癌患者外周血血小板活化标志物水平的影响因素. 中、晚期(Ⅲ、Ⅳ期)患者外周血血小板活化标志物检测水平明显高于早期(Ⅰ、Ⅱ期); 胃癌患者经手术切除肿瘤后, 外周血血小板活化标志物检测水平明显下降; 当肿瘤发生转移时外周血血小板活化标志物检测水平明显升高. 因此, 胃癌患者外周血血小板活化标志物水平的检测有可能成为监测患者病情进展的一个动态指标. 而抗凝治疗和干预血小板活化的治疗, 对于延缓胃癌患者病情、降低血行转移可能性和改善预后等方面都具有重要的临床意义.

#### [参考文献]

- [1] 陈万青, 张思维, 郑荣寿, 等. 中国肿瘤登记地区 2007 年发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2011, 20(3): 162 - 169.
- [2] LAUBLI H, BORSING L. Selections promote tumor metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2010, 20(3): 169 - 177.
- [3] ERPENBECK L, SCHN M P. Deadly allies: the fetal interplay between platelets and metastasizing cancer cells [J]. *Blood*, 2010, 115(17): 3 427 - 3 436.
- [4] GAY L J, FELDING-HABERMANN B. Contribution of platelets to tumor metastasis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(2): 123 - 134.
- [5] AMANO H, ITO Y, SUZUKI T, et al. Roles of a prostaglandin E-type receptor, EP3, in up regulation of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor during enhancement of tumor metastasis [J]. *Cancer Sic*, 2009, 100(12): 2 318 - 2 324.
- [6] VAN DEN BERG Y W, OSANTO S, REITSMA P H, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside [J]. *Blood*, 2012, 19(4): 924 - 932.
- [7] RIBEIRO F S, AMOEDO N D. Evidence for increased expression of tissue and protease-activated receptor-1 in human esophageal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1 599 - 1 604.
- [8] MATSUI Y, AMANO H, ITO Y, et al. Thromboxane A2 receptor signaling facilitates tumor colonization through P-selection-mediated interaction of tumor cells with platelets and endothelial cells [J]. *Cancer Sic*, 2012, 103(4): 700 - 707.
- [9] MICHELS M, VAN DER VEN A J, DJAMIATUN K, et al. imbalance of angiotensin-1 and angiotensin-2 in severe dengue and relationship with thrombocytopenia, endothelial activation, and vascular stability [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2012, 87(5): 943 - 946.
- [10] MOREL-KOPP M C, MCLEAN L, CHEN Q, et al. The association of depression with platelet activation: evidence for a treatment effect [J]. *Thromb Haemost*, 2009, 7(4): 573 - 581.

(2014-06-12 收稿)