

论著 • 临床研究

肺癌患者循环肿瘤细胞与 D-二聚体及血小板的相关性研究

宋娟娟, 周 钦

(荆州市第一人民医院检验科, 湖北荆州 434099)

摘要:目的 探究肺癌患者循环肿瘤细胞(CTC)与 D-二聚体(D-D)及血小板计数(PLT)的相关性。方法 选取 2015 年 8 月至 2017 年 1 月收治并确诊的 117 例原发性肺癌患者,对患者肿瘤细胞表达情况及凝血系统相关因子 D-D、纤维蛋白原(FIB)、PLT 进行检测,对结果进行分析。结果 D-D、FIB、PLT 基本不受性别因素的影响,男女患者间差异均无统计学意义($P>0.05$)。仅 PLT 和年龄有一定的关联, ≥ 60 岁患者的 PLT 水平高于 60 岁以下的患者($P<0.05$)。不同 TNM 分期、病理类型及远处转移状态患者之间,D-D、FIB、PLT 水平差异均有统计学意义($P<0.05$)。117 例肺癌患者中检查出 CTC 阳性 69 例,CTC 阴性 48 例。CTC 阳性患者的 D-D、FIB、PLT 水平均高于 CTC 阴性患者($P<0.05$)。发生远处转移的患者,其 CTC 阳性率(81.01%)明显高于未发生远处转移患者的 CTC 阳性率(41.25%),差异具有统计学意义($P<0.05$)。非条件 Logistic 回归模型结果显示,D-D 及 PLT 与 CTC 阳性率具有显著的相关性。结论 血液高凝状态促进了 CTC 的转移,增加了肺癌细胞远处转移的风险性。

关键词:肺癌; 循环肿瘤细胞; D-二聚体; 血小板

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.002

中图法分类号:R734.2

文章编号:1673-4130(2018)16-1940-04

文献标识码:A

Study on the correlation between circulating tumor cells and D-dimer and platelet in patients with lung cancer

SONG Juanjuan, ZHOU Qin

(Department of Clinical Laboratory, Jingzhou First People's Hospital, Jingzhou, Hubei 434099, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between circulating tumor cells (CTC) and D-D and platelet count (PLT) in patients with lung cancer. **Methods** A total of 117 patients with primary lung cancer who were admitted to the hospital from August 2015 to January 2017 were selected. The tumor cell expression and coagulation system-related factors DD, fibrinogen (FIB), and PLT were investigated and analyzed. **Results**

The three indicators D-D, FIB and PLT were not affected by gender. There was no significant difference between male and female in the three indicators ($P>0.05$). Only the PLT index and age had a certain relationship, PLT level in the patients over 60 year-old was higher than the patients under 60 year-old, and there was a significant difference ($P<0.05$). There were significant differences among the three levels of D-D, FIB and PLT in patients with different TNM staging, pathological type and distant metastasis status ($P<0.05$). Of the 117 patients with lung cancer, 69 were positive for CTC and 48 were negative for CTC. The levels of D-D, FIB and PLT in CTC-positive group were higher than those in CTC-negative group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The positive rate of CTC in distant metastasis group (81.01%) was significantly higher than that in distant metastasis group (41.25%), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The results of unconditional Logistic regression showed that D-D and PLT were significantly correlated with CTC positive rate. **Conclusion** Hypercoagulability promotes the metastasis of CTC and increases the risk of distant metastasis of lung cancer cells.

Key words:lung cancer; circulating tumor cells; D-dimer; platelets

肺癌已经成为人类恶性肿瘤死亡最主要的原因,是当今社会最为常见的癌症,其易于复发和远处转移等特点是引起患者死亡的主要原因之一^[1]。肺癌是由支气管上皮细胞引起的,也称支气管癌,由于肺癌患者本身免疫能力降低,加上持续的放化疗和手术

等,容易导致患者呼吸道感染,因此不可治愈性肺部呼吸道感染也是肺癌患者的主要死亡原因之一^[2]。循环肿瘤细胞(CTC)是指从肿瘤病灶脱落进入外周血中的各种肿瘤细胞的统称,是发生远处转移和形成转移灶的关键。有关研究显示,凝血系统的相关因子

作者简介:宋娟娟,女,主管检验技师,主要从事恶性肿瘤的早期检测及相关性研究。

本文引用格式:宋娟娟,周钦. 肺癌患者循环肿瘤细胞与 D-二聚体及血小板的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(16):1940-1943.

可能与肿瘤细胞的发生、发展和转移存在一定的关联^[3]。本文就肺部恶性肿瘤患者 CTC 与 D-二聚体(D-D)、血小板计数(PLT)及纤维蛋白原(FIB)的相关性进行了研究,旨在探讨各种因素之间的相互联系及其与肺癌患者病理特征和发生远处转移的关系,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 8 月至 2017 年 1 月本院收治并确诊的 117 例原发性肺癌患者,其中男 59 例,女 58 例,年龄 35~79 岁,平均年龄(62.7±2.4)岁;其中鳞癌 47 例,腺癌 43 例,小细胞癌 27 例。患者进行完全身检查后,按照国际肺癌研究协会 2009 年制定的第 7 版分期标准对患者进行肿瘤分期系统(TNM)判定,分期结果为Ⅰ期 16 例,Ⅱ期 27 例,Ⅲ期 37 例,Ⅳ期 37 例。本研究经本院伦理委员会审核并通过,患者及其家属均同意并签署知情同意书。纳入标准:(1)符合临床国际肺癌研究协会 2009 年制定的第 7 版肺癌诊断标准;(2)研究前未进行过针对性治疗;(3)自愿配合研究进行。排除标准:(1)肺癌合并其他肿瘤患者;(2)肺癌合并心、肝、肾等疾病患者;(3)长期应用激素患者;(4)近期进行过手术且使用过抗凝、抗纤溶等药物的患者;(5)肺癌合并血栓性综合疾病、感染性综合疾病和阻塞性肺炎患者。

1.2 方法 D-D、FIB 检测所采用法国 STAGO 全自动血凝仪及配套试剂,PLT 采用迈瑞 BC5800 全自动血细胞分析仪及配套试剂。采集患者清晨空腹肘静脉血,采用免疫磁珠阴性分离和免疫细胞化学染色的方法检测患者外周血中 CTC 相关数据。具体操作如下:把患者血液和淋巴细胞分离液室温放置 30 min 后复温到 18~25 ℃,然后取 7.5 mL 抗凝血和等量磷酸盐缓冲液于 50 mL 离心管中充分混合,贴壁缓慢加入装有 15 mL 淋巴细胞分离液的另一只离心管中,室温下 400×g 离心 30 min。离心后吸取乳白色环状单个核细胞层,加入 5 倍体积的磷酸盐缓冲液混合均匀,室温下 300×g 离心 15 min,去掉上清液,重复处理 2 次。然后将细胞沉淀,重悬于 80 μL 磁珠缓冲液中,再加入 20 μL 抗 CD45 抗体(生产商:德国 Miltenyi Biotec 公司),用手轻轻拍打混匀后,放入 4 ℃冰箱孵育 15 min。取出后再加入 20 倍体积的磁珠缓冲液,室温下 300×g 离心 10 min,去掉上清液后加入

500 μL 缓冲液重悬细胞。把细胞重悬液过磁珠 MS 分流柱,流净后加入 500 μL 磁珠缓冲液冲洗,重复 2 遍,收集从分流柱流下的液体,室温下 300×g 离心 10 min,去上清液,将剩余沉淀部分均匀涂在防脱落载玻片上,室温下风干,用 4%多聚甲醛固定 10 min,用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次共 5 min。加入鼠抗光谱细胞角蛋白存于 4 ℃冰箱过夜。再用磷酸盐缓冲液清洗,加入二抗工作液,37 ℃孵育 20 min。磷酸盐缓冲液浸洗,用二氨基联苯胺显色,苏木素复染 4~6 min,分化、脱水、透明、中性树胶封片处理^[4]。

1.3 判断标准^[5]

1.3.1 指标参考区间 D-D 参考区间为:0~0.55 mg/L;FIB 参考区间为:1.8~3.6 g/L;PLT 参考区间为:(130~370)×10⁹/L。

1.3.2 CTC 阳性评判标准 (1)按照形态学来分:细胞外表轮廓呈现圆形椭圆形或长方形,细胞直径或者长径≥10 μm;光学镜下可见完整的细胞形态和细胞核。(2)按照光镜阳性标准来分:细胞具有完整的细胞膜结构,用 Pan-CK 染色呈现染色阳性,细胞质呈现蓝黑色或褐色;细胞直径或者长径≥10 μm;细胞的核质比严重失常。进行阳性判断时,由 2 名实验员分别在光镜下观察染色情况,当出现分歧时,由第三人进行协助判定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 数据分析软件对本研究资料进行统计分析。计数资料以例数或频数表示,组间比较采用 χ² 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。采用 Logistic 回归分析研究 D-D、FIB、PLT 对 CTC 阳性率的影响。以 *P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 患者临床特征与 D-D、FIB、PLT 的关系 D-D、FIB、PLT 基本不受性别的影响,男女患者间 3 项指标差异均无统计学意义(*P*>0.05)。就年龄因素来看,仅 PLT 指标和年龄有一定的关联,≥60 岁患者的 PLT 水平高于 60 岁以下的患者(*P*<0.05)。从不同 TNM 分期、病理类型及远处转移状态患者之间 D-D、FIB、PLT 水平差异均有统计学意义(*P*<0.05),提示该 3 项指标与 TNM 分期、病理类型及远处转移有密切关联,见表 1。

表 1 患者临床特征与 D-D、FIB、PLT 的关系($\bar{x} \pm s$)

临床特征	<i>n</i>	D-D(mg/L)			FIB(g/L)			PLT(×10 ⁹ /L)		
		检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
性别										
男	59	1.52±1.41	1.32	0.19	3.23±1.43	1.796	0.075	292±147	0.039	0.969
女	58	2.03±2.59			3.72±1.52			293±131		

续表 1 患者临床特征与 D-D、FIB、PLT 的关系($\bar{x}\pm s$)

临床特征	<i>n</i>	D-D(mg/L)			FIB(g/L)			PLT($\times 10^9$ /L)		
		检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>	检测结果	<i>t</i> / <i>F</i>	<i>P</i>
年龄										
≥60 岁	59	1.91±1.75	0.863	0.390	3.54±1.47	0.251	0.803	375±105	8.526	0.000
<60 岁	58	1.58±2.34			3.47±1.55			194±124		
TNM 分期										
I	16	1.46±1.09	4.965	0.003	2.95±1.27	4.476	0.005	128±11	71.817	0.000
II	27	1.57±0.93			3.43±1.56			144±21		
III	37	1.13±1.01			3.08±1.44			257±137		
IV	37	2.34±1.96			4.17±1.43			425±69		
病理类型										
鳞癌	47	2.11±1.31	6.03	0.003	3.91±1.54	4.594	0.012	326±147	3.291	0.041
腺癌	43	1.76±1.08			3.16±1.24			267±115		
小细胞癌	27	1.12±1.08			3.07±1.31			251±156		
远处转移										
发生	37	2.43±1.87	2.685	0.008	4.15±1.47	3.468	0.001	448±75	14.039	0.000
未发生	80	1.38±2.01			3.16±1.42			201±94		

2.2 肺癌患者 CTC 与 D-D、FIB、PLT 的关系 117 例肺癌患者中检查出 CTC 阳性 69 例,CTC 阴性 48 例。CTC 阳性组中 D-D、FIB、PLT 水平均高于 CTC 阴性组,差异具有统计学意义($P<0.05$),提示 CTC 与 D-D、FIB、PLT 可能存在关联。

表 2 肺癌患者 CTC 与 D-D、FIB、PLT 的关系($\bar{x}\pm s$)				
组别	<i>n</i>	D-D(mg/L)	FIB(g/L)	PLT($\times 10^9$ /L)
CTC 阳性组	69	2.37±2.47	3.81±1.48	341±145
CTC 阴性组	48	0.98±1.04	3.15±0.28	234±124
<i>t</i>		4.173	3.613	4.161
<i>P</i>		0.000	0.001	0.000

2.3 肺癌患者远处转移发生情况与 CTC 表达的关系 发生远处转移的患者 CTC 阳性率[81.01%(30/37)]明显高于未发生远处转移的患者 CTC 阳性率[41.25%(33/80)],差异具有统计学意义($P<0.05$),转移和未转移患者中各有 1 例属于 CTC 阳性可疑(±),均未列入统计。

表 3 CTC 与 D-D 及 PLT 的 Logistic 回归分析					
因素	回归系数	标准误差	Wald χ^2	<i>P</i>	OR(95%CI)
D-D	0.810	0.282	8.283	0.004	2.249(1.295~3.906)
PLT	1.167	0.484	5.803	0.016	3.211(1.243~8.296)

2.4 CTC 与 D-D 及 PLT 的 Logistic 回归分析 以本研究 117 例资料为样本,以患者 CTC 阳性状态为应变量(赋值 1=阳性,0=阴性),以 D-D、FIB、PLT 等 3 项指标为自变量,建立非条件 Logistic 回归模型。

回归过程采用向后法,自变量剔除 $\alpha=0.05$ 。结果 D-D 及 PLT 等 2 指标被最终保留入回归方程中($P<0.05$),OR 分别为 2.248、3.211,提示 D-D 及 PLT 对 CTC 阳性率有显著的影响,见表 3。

3 讨论

大约有 90% 的肿瘤患者死亡事件是由于肿瘤细胞转移引起的,CTC 是指从肿瘤病灶脱落进入外周血中的各种肿瘤细胞的统称,是发生远处转移和形成转移灶的关键^[6]。据相关研究显示,凝血系统中的相关因子可能与肿瘤细胞的发生、发展和转移存在一定的关系。

D-D 是纤溶酶降解交联纤维蛋白后的产物,其浓度反映了继发性纤维活性的强度,在临床上,通常作为评判肺癌患者恶性肿瘤进展程度的指标之一。FIB 是一种由肝细胞合成、参与机体凝血过程的、含量最高的球蛋白,参与人体细胞的生长、黏附、游走及血液凝固的过程^[7]。研究表明,FIB 的产生量容易受到人体的炎性反应或者感染的影响。FIB 被激活后形成纤维蛋白多聚体,在血小板周围凝聚,参与凝血过程。个体中 FIB 含量增高,标志着机体处于一种高凝状态,容易造成血栓的形成。FIB 可以在肿瘤细胞表层形成一种保护层,增加其对于化疗的抵抗作用,保护其免受机械损伤和免疫作用,为恶性肿瘤细胞的生长和转移提供帮助,增加肺癌患者治疗风险^[8]。PLT 是反映血小板生成与破损动态平衡的一个指标,临床尚无证据证明 PLT 与肺癌的形成有关,但是 PLT 是参与肿瘤细胞转移不可或缺的部分。

研究显示,静脉血栓栓塞症是肿瘤患者死亡的第二大杀手^[10]。本研究就患者的不同病理分期及个体因素对 D-D、FIB、PLT 的关系进行探究,同时针对不同 CTC 表达情况进行综合分析。CTC 阳性患者 D-D、FIB、PLT 水平分别为 (2.37±2.47) mg/L、(3.81±1.48) g/L、(341±145)×10⁹/L,均高于 CTC 阴性患者。其他研究表明,患者肿瘤细胞能够分泌出组织因子和癌促凝因子等凝血系统相关因子,激发患者机体凝血进程,同时,高凝的血液状态使得肿瘤细胞更容易黏附在靶器官血管壁上,增加了转移灶形成的概率^[11]。本研究也提示 CTC 阳性可能与 D-D、FIB、PLT 水平存在一定相关性。发生远处转移的患者 CTC 阳性率、D-D、FIB、PLT 等指标均明显高于未发生远处转移的患者,进一步证明了血液高凝状态即高 D-D、FIB、PLT 水平的升高促进了 CTC 的转移,促进了肺癌细胞远处转移的发生。对 CTC 与 D-D 及 PLT 进行 Logistic 回归分析发现,患者 CTC 阳性率与 D-D 及 PLT 存在正相关性,这表明血液高凝状态促进了 CTC 的血转移,进而导致了肺癌远处转移的风险性。

4 结 论

本文就肺部恶性肿瘤患者 CTC 与 D-D、FIB 和 PLT 的相关性进行了研究。肺癌患者的高凝状态不仅容易引发静脉血栓栓塞症,而且还会促进 CTC 转移^[12]。因此,针对无禁忌证的肺癌患者进行预防性的抗凝治疗有助于延缓肿瘤的复发和转移,进而保障患者生命健康安全。

参考文献

[1] 刘春花,巩平,杨杰. 肺癌患者外周血中循环肿瘤细胞与 D-二聚体纤维蛋白原及血小板的关系[J]. 中华肿瘤杂志,2016,38(5):368-371.

[2] 尹梅. 非小细胞肺癌患者凝血功能检测及临床意义探讨[J]. 重庆医学,2014(4):424-426.

[3] 张香花,左学荣,李玉权,等. 血清 C-反应蛋白在肺癌 TNM 分期中的临床意义及其与纤维蛋白原及 D-二聚体联合检测评估化疗效果的应用价值[J]. 中国老年学杂志,2015(21):6135-6136.

[4] 朱辉,张海燕,何明,等. 肺癌患者围手术期血浆 D-二聚体水平变化分析[J]. 天津医药,2014(7):710-712.

[5] 王亚辉. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能及血小板参数变化的临床意义[J]. 中国综合临床,2016,32(3):263-266.

[6] XUE P, YE KAI, GAO JIE, et al. Isolation and elution of Hep3B circulating tumor cells using a dual-functional her-ringbone chip[J]. Microfluid Nanofluidics, 2014, 16(3): 605-612.

[7] 朱建华. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能相关指标和血小板计数变化分析[J]. 中国基层医药,2016,23(19): 3014-3017.

[8] 毛德奎,秦海峰,于爱平,等. 肺癌患者化疗前后凝血、纤溶功能与血小板参数的变化及其临床意义[J]. 军事医学,2012,36(2):141-146.

[9] ZHANG P, ZHANG R, GAO M X, et al. Novel nitrocellulose membrane substrate for efficient analysis of circulating tumor cells coupled with surface-enhanced Raman scattering imaging[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6(1):370-376.

[10] 陈腊,张小林,蒋峰,等. 肿瘤标志物 D-二聚体血小板计数对肺癌脑转移的诊断及其对预后的评估[J]. 浙江临床医学,2016,18(6):1011-1013.

[11] 乔理华,王琳,姜加陶. 循环肿瘤细胞在良恶性肺部孤立性结节鉴别诊断中的应用价值[J]. 中华检验医学杂志,2016,39(12):941-945.

[12] 王俊,王峰,王自正. 循环肿瘤细胞检测应用于肺癌诊治的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(19):2654-2656.

[13] 张江霞,肖正红. 重组人血小板生成素联合重组人白细胞介素 11 治疗恶性肿瘤化疗后血小板减小症的安全性及有效性[J]. 医学综述,2016,22(15):3059-3063.

[14] 张丽敏,郭雨童,曹磊,等. 脑肿瘤患者围术期凝血-纤溶相关指标及血小板水平变化[J]. 检验医学与临床,2017,14(2):158-160.

[15] 苏雷,胡玲,刘妙玲,等. 银杏叶治疗对老年肿瘤患者血液高凝状态及血浆纤维蛋白原、D-二聚体水平、血小板计数的影响[J]. 中国老年学杂志,2014(19):5392-5393.

(收稿日期:2018-01-15 修回日期:2018-03-24)

(上接第 1939 页)

History, molecular features, and clinical importance of conventional serum biomarkers in lung cancer[J]. Surg Today, 2017, 47(9):1037-1059.

[13] 祁双. microRNA 检测方法的优缺点评价[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(1):85-88.

[14] 张潍,王辉,乔哲,等. miR-19a 和 miR-19b 在非小细胞肺癌中的表达[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36

(6):810-814.

[15] LIN Q Y, CHEN T J, LIN Q Y, et al. Serum miR-19a expression correlates with worse prognosis of patients with non-small cell lung cancer[J]. J Surg Oncol, 2013, 107(7):767-771.

(收稿日期:2018-01-13 修回日期:2018-03-22)