

佐剂性关节炎大鼠血小板微粒、血小板参数及滑膜组织的变化

刘磊, 刘健, 黄传兵, 万磊, 谌曦

(安徽中医药大学第一附属医院风湿病科, 合肥 230031)

[摘要] **目的** 观察佐剂性关节炎(AA)大鼠外周血血小板微粒(PMPs)及血小板参数、滑膜组织血管内皮生长因子(VEGF)、内皮抑素(ES)、微血管密度(MVD)的表达。**方法** 将 24 只 SD 大鼠随机数字表法分为健康对照(NC)组、模型对照(MC)组,通过注射弗氏完全佐剂复制 AA 模型。造模成功 30 d 后,观察两组大鼠足趾肿胀度(E)、关节炎指数(AI)、关节病理损伤指数(JPI)、血小板参数、PMPs 及滑膜 ES、VEGF、MVD 的变化。**结果** 与 NC 组比较,MC 组 E、AI、JPI、MVD、血小板参数(PLT、PCT)、PMPs 及滑膜 VEGF mRNA 表达升高,滑膜 ES mRNA 表达降低,VEGF mRNA/ES mRNA 升高。相关性分析结果表明 PMPs 与血小板参数 PLT、PCT 呈正相关;PMPs 与 AI、E、JPI、MVD、VEGF mRNA、VEGF mRNA/ES mRNA 呈正相关;PLT 与 E、MVD 呈正相关;PCT 与 E、AI 呈正相关($P < 0.05$)。**结论** AA 大鼠 PMPs 表达升高可能是引起 VEGF/ES 表达失衡,导致滑膜组织血管增生、关节损伤的原因。

[关键词] 关节炎,实验性;血小板;滑膜;疾病模型,动物

中图分类号:R593.22 文献标识码:A DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2018.05.023

The change of PMPs, platelet parameters, VEGF, ES and MVD in the adjuvant arthritis Liu Lei, Liu Jian, Huang Chuanbing, Wan Lei, Shen Xi (Department of Rheumatology, the First Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Corresponding author: Huang Chuanbing, Email: chuanbinh@163.com

[Abstract] **Objective** To observe the expression of PMPs, platelet parameters, VEGF, ES, MVD in the adjuvant arthritis. **Methods** 24 SD rats were randomly divided into normal control (NC) group and model control (MC) group. AA model was made by injecting freund's complete adjuvant. After modeling, to observe two groups of E, AI, Pathological injury index of synovial joint, PMPs, platelet parameters, VEGF, ES, MVD. **Results** Compared with NC group, the expression of E, AI, synovial joint pathological damage index, MVD (PLT, PCT), platelet parameters, PMPs and synovial VEGF mRNA, VEGF mRNA/ES mRNA of the MC group were rising. synovial ES mRNA expression of the MC group was reducing. PMPs was positively correlated with PLT, PCT. PMPs were positively correlated with AI, E, JPI, MVD, VEGF mRNA, VEGF mRNA/ES mRNA. PLT was positively correlated with E and MVD. PCT was positively correlated with E and AI ($P < 0.05$). **Conclusion** The increase of PMPs in AA rats may be the cause of vascular hyperplasia and joint injury of synovial tissue caused by the imbalance of VEGF/ES.

[Keywords] Arthritis, experimental; Blood platelets; Synovial membrane; Disease models, animal

类风湿关节炎(RA)是一种可致多系统受累的、慢性、侵袭性自身免疫性疾病,以关节滑膜慢性炎症为基本病理特征。滑膜组织血管增生形成血管翳对关节软骨的侵蚀,是造成 RA 关节功能障碍的最主

要原因。近年来血小板参数及血小板微粒的异常表达^[1-2]、促血管生长因子/抑制血管生长因子的表达失衡^[3-4]成为 RA 关节病变发病机制研究的热点。本研究通过观察 AA 大鼠外周血血小板微粒

基金项目:国家自然科学基金(81473672);2016 年中央引导地方科技发展专项(财教[2016]1188);安徽省科技攻关项目(1604a0802085);现代中医内科应用基础与开发研究安徽省重点实验室(财教[2016]518);2015 年技术创新服务体系专项(财教[2015]1551);国家临床重点专科中医风湿病学建设项目(财社[2013]239 号)

作者简介:刘磊,医师,Email:dr_tcm_liu@126.com

通信作者:黄传兵,主任医师,教授,Email:chuanbinh@163.com

(PMPs)、血小板参数(PLT、PCT、PDW、MPV)、滑膜组织血管内皮生长因子(VEGF)、内皮抑素(ES)及滑膜微血管密度(MVD)的变化,以探讨PMPs、血小板参数及VEGF、ES在RA病变中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及饲养 雄性清洁级SD大鼠24只,购于安徽省实验动物中心[动物许可证号:SYXK(皖)2015-06],大鼠体质量(200 ± 20)g,饲养于安徽中医药大学实验动物房,动物房环境保持安静,温度 $18 \sim 26^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 70\%$,保持通风排气 $10 \sim 20$ 次/小时。

1.2 试剂 弗氏完全佐剂购自美国Sigma公司;CD31检测试剂盒、SP试剂盒和DAB试剂免疫组织化学染色试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司;Trizol购自INVITROGEN公司提供(批号:15596-026);逆转录试剂盒购自美国Thermo公司(批号:K1622);荧光定量试剂购自北京康为世纪生物科技有限公司(批号:CW0956);引物由INVITROGEN公司合成;藻红蛋白(PE)标记的CD41、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD61抗体购自美国Biolegend公司,批号为B188064、B181084。标准荧光微珠购自美国Sigma公司, yellow-green 1 μm ,批号:MKBT2841V。

1.3 主要仪器 足趾容积测量仪:北京吉安得尔科技有限公司,型号:YLS-7B;电子天平:上海力衡仪器仪表有限公司,型号:MX-5001;Sysmex XT-2000i全自动血细胞分析仪器;组织石蜡包埋机:德国徕卡(LEICA)公司,型号:A130395;石蜡切片机:德国LEICA公司,型号:RM2245;组织脱水机:德国LEICA公司,型号:ASP300S;漂片机:美国伯明斯顿(Bloomington)公司,型号:MP-220;烘片机:德国LEICA公司,型号:HI1220;染色机:德国赛利(SLEE)公司,型号:MAS。显微镜:日本奥林巴斯(OLYMPUS)公司,型号:T-Gradient Thermoblock 96 PCR扩增仪:德国Biometra公司;Epics XL型流式细胞仪:美国Beckman-coulter公司。

1.4 方法

1.4.1 模型复制及指标检测 大鼠适应性饲养7d后,按照随机数字表法分为健康对照(NC)组、模型对照(MC)组,每组12只。向模型组大鼠右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂致炎,注射量为 $0.1\text{ mL}/100\text{ g}$,制成佐剂性关节炎(AA)模型。致炎后30d用10%的水合氯醛($0.35\text{ mL}/100\text{ g}$)腹腔注射

麻醉,无菌环境下取大鼠膝关节滑膜组织,免疫组织化学法检测滑膜组织CD31表达计算滑膜MVD值、PCR法检测滑膜组织VEGF mRNA、ES mRNA表达;取外周血流式细胞术检测血小板微粒表达。

1.4.2 足趾肿胀度、关节炎指数测定 足趾肿胀度(E):分别在模型复制前1天、致炎后30天测量各组大鼠足跖容积,计算各组大鼠足跖肿胀度。足跖肿胀度 $^{[5]} = (V_t - V_n)/V_n \times 100\%$ (V_n 、 V_t 分别代表致炎前后足跖容积)。

关节炎指数(AI):致炎后第30天观察并记录全身关节病变程度,根据未注射佐剂的其余3只肢体的病变程度累积积分,计算出各组大鼠AI。0分:无红肿;1分:小趾关节红肿;2分:趾关节和足跖肿胀;3分:踝关节以下的足爪肿胀;4分:包括踝关节在内的全部足爪肿胀 $^{[6]}$ 。把各个关节的积分累计起来,即为每只大鼠的AI分值。

1.4.3 大鼠滑膜JPI、MVD、ES、VEGF的检测 关节病理损伤指数(JPI)评定:末次用药24h后将动物处死,切开大鼠右侧足趾关节。各组大鼠取后足远端趾间关节,用4%多聚甲醛固定24h后,10%乙二胺四乙酸(EDTA)脱钙5周;脱钙完全后,石蜡包埋,切片,HE染色。采用HE染色方法进行分级评定 $^{[7]}$ 。即为每只大鼠的JPI值。

MVD的检测:末次用药24h后将动物处死,无菌环境取膝关节滑膜组织,固定、包埋、切片后行免疫组织化学染色。CD31抗体按1:100稀释,显色后封片,以细胞胞浆或胞核中出现黄色或棕褐色颗粒为阳性反应。免疫组织化学染色的半定量判定:采用图像分析软件(美国Image-Pro Plus专业图像分析软件系统,美国Media Cybernetics公司)进行图像分析,按照Weidner的方法 $^{[8]}$ 进行着色的微血管计数即为微血管密度(MVD)值。

滑膜VEGF、ES mRNA检测:PCR法检测大鼠滑膜ES、VEGF的表达。取大鼠滑膜组织用匀浆器匀浆,用Trizol试剂盒提取总RNA按照M-Mulv反转录试剂盒说明书提供的方法进行反转录。引物序列:VEGF序列:Forward 5'-CGG TTC CAG AAG GGA GAG GA -3', Reverse 5'- CTG GGA CCA CTT GGC ATG G-3';ES序列 Forward 5'- CGG GTC ATG CGG ACA GTTC GC-3', Reverse 5'-CCG GAC TGT TCG GCT GAG GT-3';采用实时荧光定量PCR法进行mRNA表达量分析,数据分析计算方法为 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$,计算目的基因相对表达量。

1.4.4 外周血血小板参数、血小板微粒的检测 血小板参数的检测:采用 Sysmex XT-2000i 全自动血细胞分析仪器检测大鼠血小板参数。

血小板微粒的检测:末次用药 24 h 后,腹腔注射 10% 水合氯醛溶液(0.35 mL/100 g)麻醉,打开腹腔,行腹主动脉采血 2 mL,以枸橼酸钠抗凝,800 r/min 室温离心 20 min,分离血浆,上层液为富血小板血浆(PFP),每管取 PFP 50 μ L,加入 1 μ L 标准荧光微珠,CD61-FICT 和 CD41-PE 各 5 μ L,加样后室温避光孵育 30 min,使荧光单抗与血小板微粒特异性结合,检测前用 PBS 溶液将容积调整至 0.5 mL,上机检测前取 0.5 mL PBS 中加入 1 μ L 标准荧光微球以直径 1 μ m 标准荧光微球进行定位对照及设门,对门内颗粒(微颗粒直径在 0 ~ 1 μ m)进行分析,CD61-FITC 和 CD41-PE 双阳性颗粒为 PMPs。结果经 FACSria 流式细胞仪 FlowJo 软件进行分析后输出。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件包进行统计学处理。实验数据主要为计量资料,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均先行正态性检验,两组间比较采用 t 检验;相关性分析采用 Spearman 相关分析。检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 AA 大鼠外周血 PMPs 及血小板参数的变化 与 NC 组比较,MC 组 PMPs、血小板参数 PLT、PCT 明显升高($P < 0.05$)。见表 1,图 1。

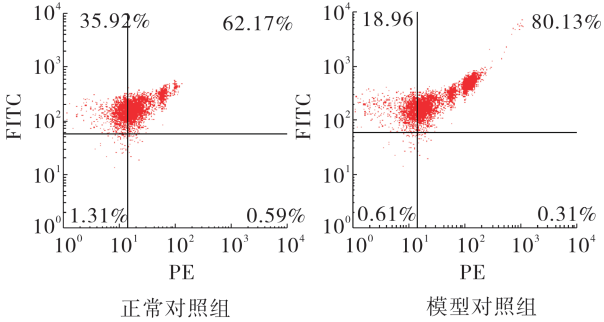


图 1 AA 大鼠外周血 CD61⁺CD41⁺PMPs 的表达

2.2 各组大鼠足趾肿胀度、关节炎指数的变化 致炎 30 天,与 NC 组相比较,MC 组大鼠 E、AI 显著升高($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠足趾肿胀度、关节炎指数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (只)	E(%)		AI(分)	
		致炎前	致炎 30 d	致炎前	致炎 30 d
健康对照组	12	1.45 $\pm$ 0.44	2.58 $\pm$ 1.04	0.14 $\pm$ 0.09	0.36 $\pm$ 0.14
模型对照组	12	1.76 $\pm$ 0.38	21.06 $\pm$ 6.95	0.26 $\pm$ 0.18	6.37 $\pm$ 1.62
t 值		1.847	9.110	2.066	12.804
P 值		0.078	<0.001	0.055	<0.001

2.3 各组大鼠 JPI、MVD、VEGF、ES 的变化 与 NC 组相比较,MC 组大鼠 JPI、MVD 显著升高,滑膜 VEGF mRNA 显著升高,滑膜 ES mRNA 显著降低,VEGF mRNA/ES mRNA 显著升高。见表 3 及图 2。

表 1 AA 大鼠外周血 PMPs 及血小板参数的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	CD61 ⁺ CD41 ⁺ PMPs(%)	PLT(ng/L)	PCT(ng/L)	PDW(ng/L)	MPV(ng/L)
健康对照组	12	65.28 $\pm$ 3.82	1053.28 $\pm$ 196.49	0.87 $\pm$ 0.17	10.34 $\pm$ 1.32	8.57 $\pm$ 0.92
模型对照组	12	79.86 $\pm$ 4.07	1391.52 $\pm$ 201.24	1.23 $\pm$ 0.21	11.27 $\pm$ 1.21	9.27 $\pm$ 0.91
t 值		9.048	4.166	4.616	1.799	1.874
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	0.086	0.074

注:AA 为佐剂性关节炎,PMPs 为血小板微粒,下表同

表 3 各组大鼠 JPI、MVD、VEGF、ES 的变化($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	例数	JPI	MVD	VEGF mRNA	ES mRNA	VEGF mRNA/ES mRNA
健康对照组	12	0.71 $\pm$ 0.42	1.37 $\pm$ 0.38	1.12 $\pm$ 0.27	4.67 $\pm$ 1.46	0.25 $\pm$ 0.17
模型对照组	12	7.23 $\pm$ 2.43	2.27 $\pm$ 0.72	3.08 $\pm$ 0.26	2.82 $\pm$ 1.25	1.33 $\pm$ 0.34
t 值		9.159	3.829	18.114	3.334	9.842
P 值		<0.001	0.001	<0.001	0.003	<0.001

注:JPI 为关节病理损伤指数,MVD 为微血管密度,VEGF 为血管内皮生长因子,ES 为内皮抑素

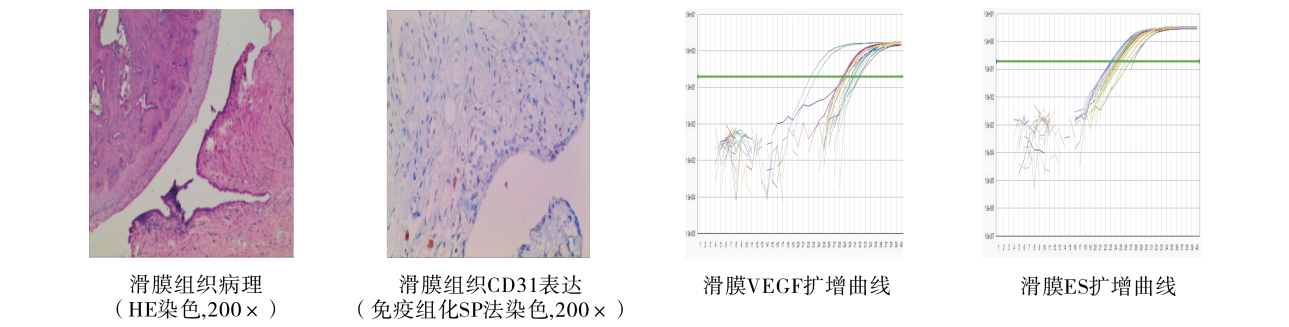


图2 滑膜组织病理、CD31 的表达及 VEGF、ES 溶解曲线

2.4 各组大鼠 PMPs 与实验指标的相关性分析
Spearman 相关性分析结果表明,CD61⁺CD41⁺PMPs (%)与血小板参数 PLT、PCT 呈正相关;CD61⁺CD41⁺PMPs (%)与 E、AI 及 JPI、MVD、VEGF mRNA、VEGF mRNA/ES mRNA 呈正相关;血小板参数 PLT 与足趾肿胀度、MVD 呈正相关;血小板参数 PCT 与 E、AI 呈正相关($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠血小板微粒与实验指标相关性分析					
指标	PMPs(%)	PLT(ng/L)	PCT(ng/L)	PDW(ng/L)	MPV(ng/L)
足趾肿胀度	0.637 ^a	0.539 ^a	0.372 ^a	0.127	0.146
关节炎指数	0.716 ^a	0.292	0.357 ^a	0.221	0.231
关节病理损伤指数	0.475 ^a	0.317	0.126	0.255	0.217
MVD	0.672 ^a	0.336 ^a	0.221	0.273	0.022
CD61 ⁺ CD41 ⁺ PMPs	-	0.526 ^a	0.428 ^a	0.165	0.176
VEGF mRNA	0.472 ^a	0.312	0.273	0.162	0.163
ES mRNA	-0.302	-0.247	-0.168	-0.102	-0.252
VEGF mRNA/ S mRNA	0.628 ^a	0.307	0.241	0.147	0.231

注:表中为 r 值,^a $P<0.05$

3 讨论

RA 滑膜组织血管新生、血管翳的形成,可破坏关节软骨面,导致关节功能障碍。有研究发现 RA 血小板细胞的异常变化与 RA 疾病活动密切相关^[9-10]。传统的观点认为血小板活化、聚集可发挥凝血、止血、参与炎性反应等作用,而最近的研究表明血小板活化后可通过分泌 PMPs 参与免疫调节、血管新生^[10-11]等重要生理病理学进程。而在 RA 的滑膜病变中,血管新生相关生长因子的表达失衡尤为显著。血小板活化及血小板微颗粒表达异常、血管生长因子的分泌失衡,可诱发一系列免疫平衡的紊乱引起滑膜血管增生。

佐剂性关节炎大鼠模型是现在较为认可的 RA 动物模型,弗氏完全佐剂造模后,动物关节的持续、慢性病变与人 RA 病变相类似。本研究观察到 AA

大鼠滑膜组织 CD31 表达显著升高,MVD 明显上调,表明 AA 大鼠滑膜组织出现血管增生及血管翳的形成。同时本研究发现模型组大鼠滑膜 VEGF mRNA 显著升高,滑膜 VEGF mRNA 显著降低,VEGF mRNA/ES mRNA 显著升高,提示 AA 大鼠滑膜组织的微血管增生与 VEGF 的表达升高,ES 表达降低及 VEGF/ES 的表达升高有关。

促血管生长因子/抑制血管生长因子失衡是 RA 血管增生的重要因素^[12]。在多种以血管病理性增生为发病特征的疾病中 VEGF 与 ES 之间的表达失衡被认为是诱导血管增生的发病机制之一^[13-14]。VEGF 可磷酸化胞内酪氨酸残基,诱发内皮细胞周围局部基底膜分解。在缺氧环境下 VEGF 可增加血管通透性,调控血管内皮细胞形成血管芽诱导血管新生^[15]。ES 是已知研究发现的最有力的内源性血管生成抑制因子,可抑制内皮细胞增殖、降低迁移及血管芽成管,诱导内皮细胞凋亡进发挥抗血管新生作用^[16-17]。本研究中 AA 大鼠滑膜 VEGF 表达升高,ES 表达降低,表明 AA 大鼠滑膜组织促血管生长因子/抑制血管生长因子状态失衡,进而促进了内皮细胞增殖,导致滑膜血管增生。

相关性分析表明 PMPs 与血小板参数 PLT、PCT 存在正相关;前期的研究证明 AA 大鼠存在血小板参数(PLT、PCT)及血小板活化因子(PAF)的异常升高,表明 AA 大鼠存在血小板异常活化^[10-18]。本次研究中 AA 大鼠血小板参数(PLT、PCT)及 PMPs 表达率 CD61⁺CD41⁺PMP% 显著高表达,表明 AA 大鼠血小板活化后血小板微粒释放增多。进一步的研究表明 CD61⁺CD41⁺PMPs 与 E、AI、MVD、VEGF mRNA、VEGF mRNA/ ES mRNA 呈正相关,提示 PMPs 的高表达导致 AA 滑膜组织 VEGF/ES 的平衡失衡。

PMPs 是血小板细胞在活化后细胞膜向外伸展

变形以出芽方式形成囊泡而释放或伪足断裂脱落进入微循环所形成的小囊泡,其直径一般小于 $1\ \mu\text{m}$ ^[19]。PMPs 具有整套的血小板膜蛋白和膜脂质等结构,其膜表面可表达血小板膜糖蛋白、血小板活化因子、粘附分子、整合蛋白等。有研究表明血小板微粒 PMPs 可促进血管内皮生长因子分泌增多^[20]。而在多种血管病理性增生疾病中 PMPs 均存在异常表达^[21-23]。因此 AA 大鼠 PMPs 表达升高可上调 VEGF 表达,导致促血管生成因子 VEGF/抑制血管生成抑制 ES 平衡失衡,诱导滑膜组织血管新生及关节损伤。

参考文献

- [1] 刘健,万磊,冯云霞,等. 四种风湿病患者血小板参数变化及外周血 BTLA、Treg 观察[J]. 中国免疫学杂志, 2014,30(4):508-511.
- [2] 薛丽佳,崔贝贝,李茜,等. 血小板微粒及其表面标志物 CD62P、CD154 与类风湿关节炎的相关性研究[J]. 四川大学学报(医学版),2017,48(3):405-409.
- [3] 赵绵松,夏蓉晖,王玉华,等. 骨关节炎与类风湿关节炎患者膝关节滑膜中血管内皮生长因子及血管形态的特征[J]. 北京大学学报(医学版),2016,44(6):927-931.
- [4] 孟德钡,潘文友,刘焱,等. 艾拉莫德联合甲氨蝶呤对难治性类风湿关节炎患者血管新生相关细胞因子的影响[J]. 医药导报,2016,35(2):148-151.
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,1991:719-725.
- [6] AL-GHAMDI M S. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *nigella sativa*[J]. J Ethnopharmacol,2001,76(1):45-48.
- [7] MYTHILYPRIYA R,SHANTHI P,SACHDANANDAM P. Efficacy of siddha formulation kalpaamruthaa in ameliorating joint destruction in rheumatoid arthritis in rats[J]. Chem Biol Interact,2008,176(2/3):243-251.
- [8] SIMAK J,GELDERMAN M P. Cell membrane microparticles in blood and blood products:potentially pathogenic agents and diagnostic markers[J]. Transfus Med Rev, 2006,20(1):1-26.
- [9] 张春兰,易甲其,郑晓芬,等. 类风湿关节炎患者免疫球蛋白和血小板参数与病情活动的相关性[J]. 检验医学与临床,2018,15(8):1207-1210.
- [10] 纵瑞凯,刘健. 新风胶囊对佐剂性关节炎大鼠外周血血小板活化因子及白细胞介素 6 和 17 表达的影响[J]. 中西医结合学报,2011,9(12):1347-1352.
- [11] VIÑUELA-BERNI V, DONÍZ-PADILLA L, FIGUEROA-VEGA N, et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease[J]. Clin Exp Immunol,2015,180(3):442-451.
- [12] VARON D, HAYON Y, DASHEVSKY O, et al. Involvement of platelet derived microparticles in tumor metastasis and tissue regeneration[J]. Thromb Res,2012,130(Suppl 1):98-99.
- [13] LIU C, KONG X, LI X, et al. Wen Luo Yin inhibits angiogenesis in collagen-induced arthritis rat model and in vitro[J]. J Ethnopharmacol,2013,149(2):478.
- [14] 李琼,薛晓红,江科,等. 乳腺癌患者血清与肿瘤组织中 VEGF、ES 表达和微血管密度的关系[J]. 世界中西医结合杂志,2016,11(12):1676-1678.
- [15] 张博,苏俊平,白杨,等. 甲状腺癌患者血清血管内皮生长因子和内皮抑素与预后的相关性分析[J]. 临床和实验医学杂志,2015,14(20):1687-1689.
- [16] 张铁慧,梁武,任远飞,等. 含血管内皮生长因子缓释微粒显微缝线促进大鼠小血管吻合后的内皮再生[J]. 中国组织工程研究,2018,22(6):877-882.
- [17] 田金,张冬丽,姚丽,等. 子宫内膜息肉干细胞的提取及内皮抑素对其血管生成的影响[J]. 安徽医科大学学报,2018,53(2):215-221.
- [18] 赵东明,刘格,张荣秋,等. 内皮抑素-血管内皮细胞抑制因子重组腺病毒对同型半胱氨酸致人血管内皮细胞损伤的拮抗作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2018,26(4):373-376.
- [19] 纵瑞凯,余学芳,刘健,等. 佐剂性关节炎大鼠血小板参数和细胞因子的变化及其相关性研究[J]. 中国临床保健杂志,2008,11(1):67-69.
- [20] MOREL O, JESEL L, FREYSSINET J M, et al. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(1):15-26.
- [21] LOPEZ BELTRAN A, MONTIRONI R. Platelet microparticles:a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy[J]. Eur Urol,2009,56(3):484-485.
- [22] FLEITAS T, MARTINEZ-SALES V, VILA V, et al. Circulating endothelial cells and microparticles as prognostic markers in advanced non-small cell lung cancer[J]. PLoS One,2012,7(10):e47365.
- [23] GEDDINGS J E, MACKMAN N. Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients[J]. Blood,2013,122(11):1873-1880.

(收稿日期:2018-06-16)