

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.25.018

肝细胞癌组织中 Daxx 的表达及临床意义

王燕,田薇,刘颖,靳钦,张曙[△]
(南通大学附属医院病理科,江苏南通 226001)

[摘要] 目的 探讨人肝细胞癌中死亡结构域相关蛋白(Daxx)的表达情况及其临床意义。方法 组织芯片联合免疫组化法及 Western blot 检测 Daxx 在肝细胞癌中的表达情况;结合患者临床病理参数和随访资料进行统计学分析。结果 Daxx 的表达主要定位于肝细胞癌的细胞质,正常肝组织的细胞核;Daxx 的表达与 AFP、肝炎史、肝硬化史、肿瘤分化程度、TNM 分期、门静脉癌栓及 Ki67 表达相关($P < 0.05$);Kaplan-Meier 生存曲线显示 Daxx 阴性组患者的总生存期(OS)与无进展生存期(PFS)更短;单因素生存分析显示 Daxx 表达程度、TNM 分期、门静脉癌栓及 Ki67 表达程度与术后生存期相关;多因素 COX 比例风险回归模型分析进一步显示 Daxx 的表达程度、TNM 分期及 Ki67 表达程度为患者独立的预后因素。结论 Daxx 的异常表达可能与肝细胞癌的发生、发展及预后有着密切的关系。

[关键词] 癌,肝细胞;Daxx;组织芯片;印迹法,蛋白质**[中图分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)25-3313-06

Expressions of Daxx in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

WANG Yan, TIAN Wei, LIU Ying, JIN Qin, ZHANG Shu[△]

(Department of Pathology, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong, Jiangsu 226001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of Daxx in hepatocellular carcinoma. **Methods** The tissue microarray combined with immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of Daxx in hepatocellular carcinoma. The statistical analysis was performed by combining with clinicopathological parameter and follow up data. **Results** The Daxx expression is mainly located in cytoplasm of hepatocellular carcinoma and nucleus in normal liver tissues. The Daxx expression was correlated with AFP, hepatitis history, cirrhosis history, degree of tumor differentiation, TNM staging, portal thrombosis and Ki67 expression. The Kaplan-Meier survival curves showed that the overall survival(OS) period and progress free survival(PFS) period in the Daxx lower expression group were shorter. The univariate survival analysis showed that the expression severity of Daxx, TNM staging, portal vein tumor thrombus and the Ki67 expression were associated with postoperative survival period. The multivariate COX proportional hazard regression model analysis further revealed that the Daxx expression severity, TNM staging and the Ki67 expression severity were the independent prognostic factors. **Conclusion** The abnormal expression of Daxx may have a close relationship with the occurrence, development and prognosis of hepatocellular carcinoma.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; Daxx; tissue microarray; blot, Western

肝细胞癌是最常见的恶性肿瘤之一,每年约有 60 万新增病例,死亡人数大于 25 万^[1]。目前临床最常见的治疗方法仍是手术切除和肝脏移植,另外肿瘤细胞对其化疗药索拉非尼极易产生耐药性,且该药毒性较强^[2-3]。因此,鉴定新型的生物分子标记对有效治疗肝细胞癌是必要的。死亡结构域相关蛋白(Daxx)最初是 YANG 等发现的一种新型的高度保守蛋白,存在与人体正常细胞和肿瘤细胞中,Daxx 在肝细胞癌中的表达及临床意义国内鲜有报道。本研究应用组织芯片、免疫组化法及 Western blot 检测其在肝细胞癌中的表达情况,分析其与临床病理参数及预后的关

系,探讨其表达在肝细胞癌发生、发展中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2017 年 6 月 5 例肝细胞癌患者手术切除的新鲜癌组织及正常肝组织,冻存备用。收集 2010—2012 年 280 例患者的相关肝组织,其中 130 例肝细胞癌组织,18 例肝炎组织,32 例肝硬化组织及 100 例正常肝组织,术前患者均未经任何抗肿瘤治疗,均有相应的临床病理资料及随访记录,随访率达 100%,随访截至 2017 年 6 月。本研究符合人体试验伦理学标准,并得到伦理委员会的批准,均经患者知情同意。

1.2 试剂 鼠抗人 Daxx 抗体购于英国 Abcam 公司,HRP 标记山羊抗鼠 IgG 购于美国 Sigma 公司,细胞核浆蛋白提取试剂盒购于中国碧云天生物技术有限公司,DAB 显色试剂盒购于中国北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 组织芯片联合免疫组织化学法 收集的患者标本均经福尔马林固定、石蜡包埋后,制成组织芯片。经 4 μm 切片,脱蜡、水化、微波处理及抗原修复后,免疫组织化学行 Daxx 标记。阳性对照为自身对照,一抗的同型对照作为阴性对照。组织芯片结果由两位高年资的病理诊断医师在双盲情况下进行结果判读。阳性结果为细胞质或细胞核呈棕黄色或棕褐色颗粒状。结果判读:在高倍镜下($\times 400$)分别对每个位点计数 100 个细胞,计 4 个位点,共 400 个细胞,记录染色强度和阳性细胞所占的百分比。染色强度:无着色 0 分,黄色弱阳性 1 分,浅棕色中阳性 2 分,棕褐色强阳性 3 分;阳性细胞百分比: $\leq 5\%$ 0 分, $6\% \sim 25\%$ 1 分, $26\% \sim 50\%$ 2 分, $51\% \sim 75\%$ 3 分, $> 75\%$ 4 分;染色强度和阳性细胞百分比评分相乘,大于或等于 1 分为阳性。

1.3.2 Western blot 取 5 例新鲜肝细胞癌组织及正常肝组织,使用细胞核浆蛋白试剂盒分别提取提取

核浆蛋白,经紫外分光光度仪蛋白定量后分别取 50 μg 进行 Western blot 检测,内参为 β -actin。最后加 ECL 显色液显影。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用 χ^2 检验;采用 Kaplan-Meier 生存分析,Log-rank 单因素生存分析,COX 比例风险回归模型。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Daxx 在肝细胞癌中的表达 在正常肝组织、肝炎组织及肝硬化组织中 Daxx 蛋白主要表达于细胞核,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。在肝细胞癌中 Daxx 蛋白表达于细胞质,表达阳性率为 30.8% (40/130),见图 1;Western blot 结果与免疫组化结果一致,见图 2。

表 1 Daxx 蛋白在正常肝组织、肝炎组织及肝硬化组织中的表达情况[n(%)]

项目	n	阴性	阳性	χ^2	P
正常肝组织	100	20(20.0)	80(80.0)	18.327	< 0.01
肝炎组织	18	7(38.9)	11(61.1)		
肝硬化组织	32	19(59.4)	13(40.6)		

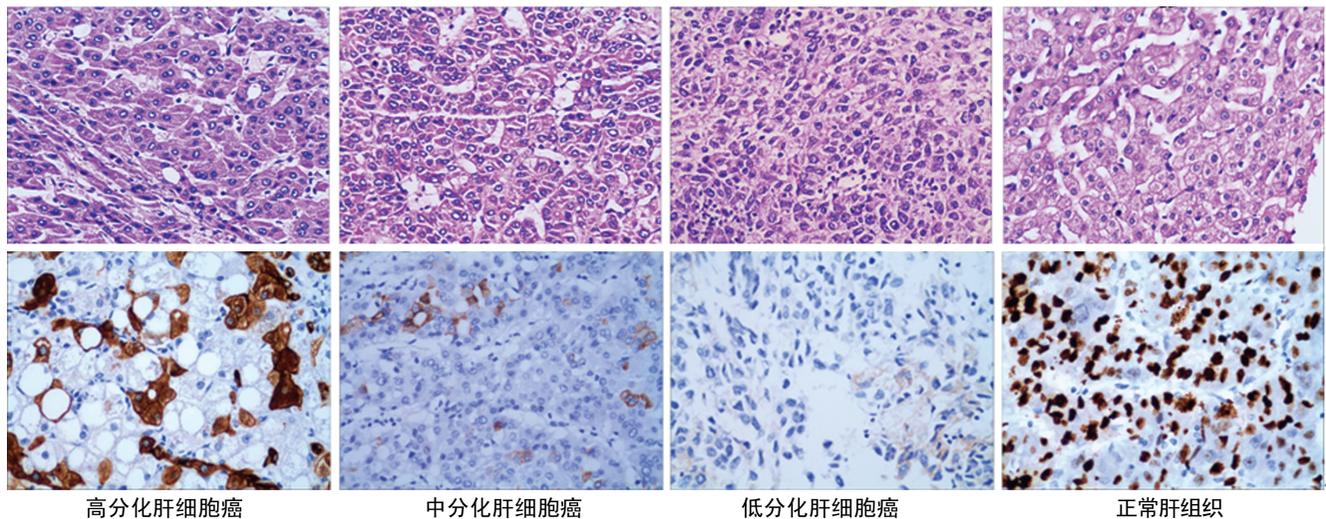
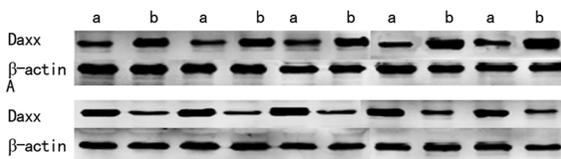


图 1 免疫组化检测 Daxx 在不同分化程度的肝细胞癌及正常肝组织中的表达($\times 400$)



A:肝细胞癌组织;B:正常肝组织;a:核蛋白;b:浆蛋白

图 2 Western blot 检测 Daxx 在肝细胞癌及正常肝组织中的表达

2.2 Daxx 表达与肝细胞癌临床病理参数的关系

Daxx 在肝细胞癌中的表达与患者 AFP、肝炎史、肝硬

化史、肿瘤分化程度、TNM 分期、门静脉癌栓及 Ki67 表达相关($P < 0.05$),而与患者性别、年龄、饮酒史、肿瘤数目、肿瘤大小及肿瘤部位不相关($P > 0.05$),见表 2。

2.3 预后分析 Kaplan-Meier 生存曲线显示 Daxx 阴性组患者的 5 年总生存期(OS)及无进展生存期(PFS)比阳性组更短,见图 3。单因素生存分析显示 Daxx 的表达程度、TNM 分期、门静脉癌栓及 Ki67 表达程度与患者术后生存期相关($P < 0.05$)。COX 比例风险回归模型多因素分析进一步显示 Daxx 表达程

度、TNM 分期及 Ki67 表达程度为影响 OS 及 PFS 的独立危险因素,见表 3、4。

表 2 D_{axx} 表达与肝细胞癌患者临床病理参数的关系[n(%)]

临床病理特征	n	D _{axx} 表达		χ^2	P
		阴性	阳性		
性别				0.242	0.623
男	101	71(69.3)	30(30.7)		
女	29	19(65.5)	10(34.5)		
年龄(岁)				0.114	0.735
≤60	85	58(68.2)	27(31.8)		
>60	45	32(71.1)	13(28.9)		
AFP(μg/L)				8.257	0.004
≤400	60	34(56.7)	26(43.3)		
>400	70	56(78.6)	14(21.4)		
饮酒史				0.256	0.613
无	77	52(67.5)	25(32.5)		
有	53	38(71.7)	15(28.3)		
肝硬化史				4.070	0.044
无	64	39(60.9)	25(39.1)		
有	66	51(77.3)	15(22.7)		
肝炎史				4.499	0.034
无	73	45(61.6)	28(38.4)		
有	57	45(78.9)	12(21.1)		
肿瘤数目				0.105	0.746
单个	103	72(69.9)	31(30.1)		

续表 2 D_{axx} 表达与肝细胞癌患者临床病理参数的关系[n(%)]

临床病理特征	n	D _{axx} 表达		χ^2	P
		阴性	阳性		
多个	27	18(66.7)	9(33.3)		
肿瘤部位				1.017	0.313
左叶	54	40(74.1)	14(25.9)		
右叶	76	50(65.8)	26(34.2)		
肿瘤大小(cm)				0.054	0.816
≤3	34	23(67.6)	11(32.4)		
>3	96	67(69.8)	29(30.2)		
肿瘤分化程度				7.885	0.019
高分化	35	18(51.4)	17(48.6)		
中分化	81	60(74.1)	21(25.9)		
低分化	14	12(85.7)	2(14.3)		
TNM 分期				9.957	0.019
I	79	47(59.5)	32(40.5)		
II	35	28(80.0)	7(20.0)		
III	15	14(93.1)	1(6.7)		
IV	1	1(100.0)	0		
门静脉癌栓				8.963	0.003
无	79	47(59.5)	32(40.5)		
有	51	43(84.3)	8(15.7)		
Ki67 表达				35.196	<0.001
阴性	51	22(40.7)	32(59.3)		
阳性	76	68(89.5)	8(10.5)		

表 3 单因素和多因素分析肝细胞癌患者临床病理特征与 OS 的关系

临床病理特征	单因素分析			多因素分析		
	HR	P > z	95%CI	HR	P > z	95%CI
D _{axx} 表达	0.144	<0.001	0.058~0.358	0.227	0.002	0.088~0.585
阳性 vs. 阴性						
性别	1.006	0.984	0.586~1.726			
男 vs. 女						
年龄(岁)	0.854	0.511	0.534~1.366			
≤60 vs. >60						
饮酒史	1.164	0.516	0.737~1.838			
有 vs. 无						
肝硬化史	1.733	0.016	1.106~2.716	1.573	0.052	0.995~2.485
有 vs. 无						
肝炎史	1.226	0.373	0.783~1.921			
有 vs. 无						
AFP(μg/L)	1.473	0.098	0.932~2.329			
≤400 vs. >400						
肿瘤部位	0.768	0.251	0.490~1.205			
左叶 vs. 右叶						

续表 3 单因素和多因素分析肝细胞癌患者临床病理特征与 OS 的关系

临床病理特征	单因素分析			多因素分析		
	HR	$P > z $	95%CI	HR	$P > z $	95%CI
肿块大小(cm) ≤3 vs. >3	0.729	0.212	0.443~1.197			
肿瘤数目 有 vs. 无	1.086	0.770	0.625~1.886			
分化程度 高 vs. 中 vs. 低分化	1.168	0.405	0.810~1.684			
TNM 分期 I vs. II vs. III vs. IV	1.604	0.002	1.197~2.150	2.077	0.024	1.103~3.912
门静脉癌栓 有 vs. 无	1.657	0.026	1.064~2.581	0.390	0.069	0.142~1.075
Ki67 表达 阳性 vs. 阴性	3.156	<0.01	1.794~5.553	2.172	0.012	1.184~3.983

表 4 单因素和多因素分析肝细胞癌患者临床病理特征与 PFS 的关系

临床病理特征	单因素分析			多因素分析		
	HR	$P > z $	95%CI	HR	$P > z $	95%CI
Daxx 表达 阳性 vs. 阴性	0.170	<0.001	0.074~0.391	0.227	0.002	0.088~0.585
性别 男 vs. 女	0.686	0.184	0.393~1.197			
年龄(岁) ≤60 vs. >60	0.777	0.307	0.480~1.260			
饮酒史 有 vs. 无	0.954	0.841	0.603~1.509			
肝硬化史 有 vs. 无	1.521	0.071	0.964~2.398			
肝炎史 有 vs. 无	1.045	0.849	0.667~1.636			
AFP(μg/L) ≤400 vs. >400	1.807	0.012	1.137~2.873	1.551	0.083	0.945~2.545
肿瘤部位 左叶 vs. 右叶	0.755	0.224	0.480~1.187			
肿块大小(cm) ≤3 vs. >3	0.700	0.154	0.428~1.143			
肿瘤数目 有 vs. 无	1.236	0.454	0.710~2.150			
分化程度 高 vs. 中 vs. 低分化	1.024	0.897	0.716~1.466			
TNM 分期 I vs. II vs. III vs. IV	2.000	<0.01	1.480~2.704	2.364	0.014	1.190~4.699
门静脉癌栓 有 vs. 无	2.074	0.002	1.321~3.257	0.441	0.146	0.146~1.332
Ki67 表达 阳性 vs. 阴性	3.294	<0.01	1.919~5.654	2.066	0.019	1.125~3.796

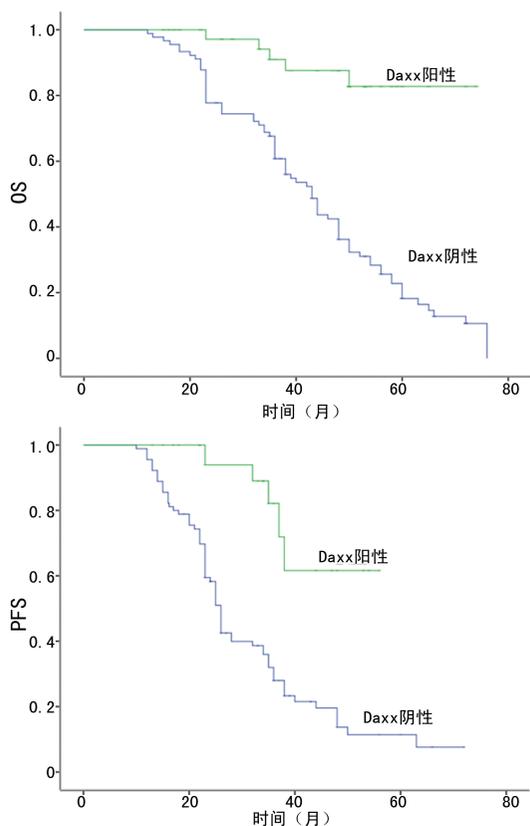


图 3 肝细胞癌患者中 Daxx 不同表达的 OS 及 PFS 的生存曲线

3 讨 论

肝细胞癌是一种起源于肝细胞的恶性肿瘤,是全球第二大癌症杀手,第三大癌症死因,在我国发病率居世界首位。到目前为止,肝细胞癌的发病率和病死率居高不下,因此有必要寻找更为有效更为安全的生物治疗方案。

Daxx 基因定位于 6 号染色体短臂 2 区 1 带 3 亚带,全长约 315 kb,含有 7 个外显子、6 个内含子及 4 个结构域(酸性氨基酸结构域 1 个、配对兼性双螺旋 2 个、SPT 结构域 1 个),它们共同参与了 Daxx 的转录调控。Daxx 蛋白含有 740 个氨基酸,由于转录后修饰的不同,存在 3 种不同的形式,相对分子质量为 120×10^3 、 97×10^3 和 70×10^3 。

Daxx 是一种多功能蛋白,可与多个蛋白相互作用,共同参与细胞凋亡。其生物活性的发挥与其在亚细胞间的分布、表达、定位及转位相关。有研究最初提出 Daxx 在胞浆中是作为 Fas 蛋白的下游,参与其凋亡通路发挥促凋亡作用,但最新研究发现,Daxx 在 T 细胞存活中发挥了新的作用,但在 Fas 诱导的细胞凋亡中是不必要的^[4];另外,Daxx 可作为细胞凋亡的启动子与细胞凋亡信号调节激酶 1(ASK1)相互作用,通过 JNK 和 p38 途径启动凋亡;也可以和前列腺细胞凋亡反应蛋白 4(PAR-4)通过 ZIP 激酶的磷酸化来

诱导凋亡^[5]。而当 Daxx 定位于细胞核时,它可以抑制诸如 ETS143、Pax342、NF- κ B、E2F120、p53 和 p73 等转录因子的表达^[6],进而发挥抗细胞凋亡作用,另有研究发现 Daxx 可发挥潜在的抗细胞凋亡的功能^[7]。

Daxx 与多种肿瘤如胰腺神经内分泌肿瘤、卵巢癌及胶质母细胞瘤的发生发展密切相关^[8]。NET-SAWANG 等^[9]在研究登革病毒衣壳蛋白(DENVC)的过程发现,Daxx 能够与核内定位的 DENVC 共同诱导肝细胞癌 HepG2 细胞的凋亡,其高表达能够促进 HepG2 细胞凋亡,该凋亡与过氧化氢相关。Daxx 能特异的结合于原癌基因 c-met 启动子区域,同时有 HDAC2 水平的升高,可见 HDAC2 参与 Daxx 对 c-met 启动子的转录抑制。另有研究发现在乳腺癌及非小细胞肺癌中,Daxx 与 c-met 表达成负相关,进一步说明 Daxx 对 c-met 的转录有一定的抑制作用^[10],而 c-met 基因过表达是肝细胞癌手术切除患者复发和生存的不良预后因素^[11],由此可以推断 Daxx 可能与肝细胞癌的预后相关。

另一方面,Daxx 在病毒的防御及抑制转录等方面也发挥了巨大的作用。近年研究显示,Daxx 可与多种细胞因子及病毒蛋白相互作用,共同参与调节病毒的复制周期,而一些病毒蛋白的合成或病毒的感染又可反过来影响 Daxx 在细胞内的定位,进而影响其功能的发挥^[12]。有研究发现,ZIP 激酶可与 Daxx 共定位,与 PML 一起维持 PML-NBs 结构与功能的稳定性,该稳定不利于病毒的复制及转录^[13]。另外 Daxx 也参与了 HSV-1 ICP27 对 NF- κ B 活性的抑制^[14]。

本研究显示,Daxx 蛋白主要表达于正常肝组织、肝炎组织及肝硬化组织的细胞核,肝细胞癌组织的细胞质,并且与患者的 AFP、肝炎史、肝硬化史、肿瘤分化程度、TNM 分期、门静脉癌栓及 Ki67 表达有关,由此推测 Daxx 蛋白可能与肝炎病毒相互作用,而病毒的感染影响了该蛋白在细胞中的定位,导致其由细胞核转位到细胞质,进而发挥抑制肝细胞癌细胞凋亡的作用。进一步分析 Daxx 在肝细胞癌组织中的表达与患者预后的相关性,结果表明 Daxx 是影响肝细胞癌预后的因素之一。

综上所述,Daxx 的高表达有可能抑制肝细胞癌的发生、发展、侵袭与转移,可作为判断肝细胞癌预后的独立因子,具体的作用机制及其与肝炎病毒的关系有待于进一步的研究和探索。

参考文献

[1] ZHAO J A, SANG M X, GENG C Z, et al. A novel curcu-

- min analogue is a potent chemotherapy candidate for human hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12 (5):4252-4262.
- [2] XUE F, LIU Y, CHU H, et al. eIF5A2 is an alternative pathway for cell proliferation in cetuximab-treated epithelial hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8 (11):4670-4681.
- [3] XUE F, LIU Y, ZHANG H, et al. Let-7a enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to cetuximab by regulating STAT3 expression [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(7):253-261.
- [4] LI J, QIAN L, DOWLING J P, et al. Daxx plays a novel role in T cell survival but is dispensable in Fas-induced apoptosis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(3):e0174011.
- [5] SALOMONI P, KHELIFI A F. Daxx; death or survival protein? [J]. *Trends Cell Biol*, 2006, 16(2):97-104.
- [6] PUTO L A, BROGNARD J, HUNTER T. Transcriptional Repressor DAXX Promotes Prostate Cancer Tumorigenicity via Suppression of Autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(25):15406-15420.
- [7] BRAZINA J, SVADLENKA J, MACUREK L, et al. DNA damage-induced regulatory interplay between DAXX, p53, ATM kinase and Wip1 phosphatase [J]. *Cell Cycle*, 2015, 14(3):375-387.
- [8] FINNERTY B M, GRAY K D, MOORE M D, et al. Epigenetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a clinicopathologic perspective [J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2017, 9(9):341-353.
- [9] NETSAWANG J, NOISAKRAN S, PUTTIKHUNT C, et al. Nuclear localization of dengue virus capsid protein is required for DAXX interaction and apoptosis [J]. *Virus Res*, 2010, 147(2):275-283.
- [10] MOROZOV V M, MASSOLL N A, VLADIMIROVA O V, et al. Regulation of c-met expression by transcription repressor Daxx [J]. *Oncogene*, 2008, 27(15):2177-2186.
- [11] KIM J H, KIM H S, KIM B J, et al. Prognostic value of c-Met overexpression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis and review [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(52):90351-90357.
- [12] GEOFFROY M C, CHELBI-ALIX M K. Role of promyelocytic leukemia protein in host antiviral defense [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(1):145-158.
- [13] TSAI K, CHAN L, GIBEAULT R, et al. Viral reprogramming of the Daxx histone H3. 3 chaperone during early Epstein-Barr virus infection [J]. *J Virol*, 2014, 88 (24):14350-14363.
- [14] KIM J A, CHOI M S, MIN J S, et al. HSV-1 ICP27 represses NF- κ B activity by regulating Daxx sumoylation [J]. *BMB Rep*, 2017, 50(5):275-280.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-05-16)

(上接第 3312 页)

- [2] ESCHE R S, SALGO B, SCHMITZ A, et al. Cuffed endotracheal tubes in children reduce sevoflurane and medical gas consumption and related costs [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010, 54(7):855-858.
- [3] LORENTE L, LECUONA M, JIMÓNEZ A, et al. Continuous endotracheal tube cuff pressure control system protects against ventilator-associated pneumonia [J]. *Crit Care*, 2014, 18(2):R77.
- [4] HAAS C F, EAKIN R M, KONKLE M, et al. Endotracheal tubes: old and new [J]. *Respir Care*, 2014, 59(6):933-935.
- [5] NEGRO M, BARRETO G, ANTONELLI R, et al. Effectiveness of the endotracheal tube cuff on the trachea: physical and mechanical aspects [J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2014, 29(4):552-558.
- [6] SOLE M L, COMBS S M, WILLIS J. Changes in endotracheal cuff pressures over time [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (Suppl 2):A144.
- [7] GUYTON D, BANNER M J, KIRBY R R. High-volume, low-pressure cuffs: Are they always low pressure [J]. *Chest*, 1991, 100(4):1076-1081.
- [8] TU H N, SAIDI N, LEIUTAUD T, et al. Nitrous oxide increases endotracheal cuff pressure and the incidence of tracheal lesions in anesthetized patients [J]. *Anesth Analg*, 1999, 89(1):187-190.
- [9] LIZY C, SWINNEN W, LABEAU S, et al. Cuff pressure of endotracheal tubes after changes in body position in critically ill patients treated with mechanical ventilation [J]. *Am J Crit Care*, 2014, 23(1):e1-8.
- [10] 赵邦术, 刘新伟. 比较研究气管导管套囊不同充气方法对导管套囊压与气管黏膜损伤的影响 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(22):2862-2864.
- [11] 杨春平, 孙秋楨, 陈丽娜, 等. 不同手术方式对声带息肉术后恢复时间的观察 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2014, 28(8):564-565.
- [12] ROY S, SMITH L P. Surgical fires in laser laryngeal surgery: are we safe enough? [J]. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2015, 152(1):67-72.
- [13] RAMAN V, TOBIAS J D, BRYANT J, et al. Effect of cuffed and uncuffed endotracheal tubes on the oropharyngeal Oxygen and volatile anesthetic agent concentration in children [J]. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 2012, 76(6):842-844.

(收稿日期:2018-03-28 修回日期:2018-05-16)