

· 临床研究 ·

Daxx 蛋白在儿童急性白血病中的表达及其临床意义

刘静, 张柳清, 胡群, 林汉华, 刘爱国, 陶红芳, 宋艳清, 张小玲

(华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 湖北 武汉 430030)

〔摘要〕 目的 通过检测 Daxx 蛋白在儿童急性白血病骨髓细胞中的表达, 探讨其与急性白血病临床分型和预后的关系, 为进一步研究抗白血病治疗新靶点提供思路。方法 应用免疫组织化学链霉素亲和素-生物素-过氧化酶复合物(SABC)方法检测 50 例儿童急性白血病骨髓细胞 Daxx 蛋白的表达, 对照组为 20 例非恶性血液病且骨髓正常患儿。结果 在 50 例急性白血病患者骨髓细胞中, Daxx 蛋白阳性表达率为 38.0%, 显著高于正常骨髓组织($P < 0.05$); Daxx 在急性非淋巴细胞白血病患者骨髓细胞中的阳性表达率为 62.5%, 显著高于正常骨髓组织($P < 0.05$)和急性淋巴细胞白血病患者($P < 0.05$); Daxx 在急性淋巴细胞白血病患者骨髓细胞中的阳性表达率为 26.5%, 与正常骨髓组织比较差异无显著性($P > 0.05$); Daxx 在高危(HR)、标危(SR)急性淋巴细胞白血病患者骨髓细胞中的阳性表达率为 55.6% 和 0, 两者比较差异有显著性($P < 0.05$)。结论 Daxx 蛋白在儿童急性白血病中异常表达, 并且与儿童急性白血病的某些临床特征密切相关, 可能在儿童急性白血病的发生发展过程中起重要的作用。
[中国当代儿科杂志, 2007, 9(1): 33-36]

〔关键词〕 Daxx; 急性白血病; 免疫组化; 儿童

〔中图分类号〕 R733.71 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1008-8830(2007)01-0033-04

Expression of Daxx in children with acute leukemia

LIU Jing, ZHANG Liu-Qing, HU Qun, LIN Han-Hua, LIU Ai-Guo, TAO Hong-Fang, SONG Yan-Qing, ZHANG Xiao-Ling. Department of Pediatrics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China (Email: liujing821218@sohu.com)

Abstract: Objective To investigate Daxx expression and its clinical significance in children with acute leukemia. **Methods** The expression of Daxx protein was detected by immunohistochemical assay in 50 children with newly diagnosed acute leukemia (34 cases of acute lymphocytic leukemia and 16 cases of acute non-lymphocytic leukemia). Twenty children with normal bone marrow were used as the control group. **Results** Daxx protein was expressed in 38.0% of 50 children with acute leukemia, which was significantly higher than that of the control group (5.0%) ($P < 0.05$). The children with acute non-lymphocytic leukemia had significantly higher Daxx expression levels (62.5%) than those with acute lymphocytic leukemia (26.5%; $P < 0.05$) as well as the control group ($P < 0.05$). There were no significant differences in the Daxx expression between acute lymphocytic leukemia children and the control group. Daxx protein was expressed in 55.6% of high risk group of acute lymphocytic leukemia but it was not expressed in standard risk group of acute lymphocytic leukemia ($P < 0.05$). **Conclusions** Daxx expression is abnormal in children with acute leukemia and associated with some clinical features of acute leukemia, suggesting that it may play an important role in the genesis and development of acute leukemia.
[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(1): 33-36]

Key words: Daxx; Acute leukemia; Immunohistochemical assay; Child

细胞增殖和凋亡受抑是白血病发生的重要基础之一。对白血病细胞进行增殖活力和凋亡活性的研究有助于了解其生物学特性, 为白血病的诊断、治疗和预后提供有价值的指标。Daxx 是一种新型转录调控蛋白^[1,2], 其与细胞的转录调控、生长发育、凋亡以及病毒感染等生理或病理过程密切相关^[3,4]。

近来研究发现 Daxx 在不同的凋亡途径中起不同的作用, 可能与恶性肿瘤的发生发展密切相关。我们采用免疫组织化学技术检测了 Daxx 蛋白在儿童急性白血病骨髓细胞中的表达, 同时探讨其与临床的关系。

[收稿日期] 2006-06-30; [修回日期] 2006-08-29

[作者简介] 刘静, 女, 博士研究生在读。主攻方向: 儿科血液与肿瘤。

[通讯作者] 张柳清, 副教授, 华中科技大学同济医学院附属同济医院儿科, 邮编 430030。

1 对象与方法

1.1 对象

骨髓涂片取自我科2005年1月至2006年4月收治的急性白血病(acute leukemia, AL)患儿和骨髓正常的非恶性血液病患儿。所有AL病例均经临床及实验室检查确诊,符合FAB分型诊断标准^[5]。AL患儿50例,男34例,女16例,年龄7月到15岁,平均年龄7.5岁,均为初发,其中急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)34例(L₁20例,L₂12例,L₃3例);急性非淋巴细胞白血病(acute non-lymphocytic leukemia, ANLL)16例(M₂5例,M₃8例,M₄1例,M₅2例)。对照组20例,其中男14例,女6例,平均年龄8.4岁。34例ALL患儿中有15例接受化疗(VDLP方案^[5],即长春新碱、柔红霉素、左旋门冬酰胺酶、地塞米松联合化疗),其中有2例在4周内死亡,接受治疗的15例患儿中有6例于第4周末完全缓解。ALL按其分型标准分为高危(HR)组和标危(SR)组^[5],经治疗的15例ALL患儿中高危9例,标危6例。16例ANLL患儿均放弃治疗。

1.2 标本采集及处理

所有玻片均经多聚赖氨酸处理,骨髓涂片自然干燥后,4℃丙酮固定30 min,待自然干燥后置于-20℃冻存待检。

1.3 研究方法

采用免疫组织化学链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)方法检测Daxx蛋白的表达。涂片于-20℃取出后室温放置20 min,0.5%过氧化氢/甲醇浸泡30 min,以除去内源性过氧化物酶,正常山羊血清封闭30 min;滴加Daxx多克隆抗体(美国,eBioscience公司),4℃孵育过夜;滴加生物素化羊抗兔IgG,37℃孵育30 min;滴加链霉素亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,37℃孵育30 min;DAB染液

(武汉,博士德生物制品有限公司)染色,苏木素复染,饱和磷酸氢二钠返蓝,冲洗晾干。结果判定:Daxx蛋白阳性表达定位于胞核,呈棕黄色颗粒状,阳性细胞散在分布。随机选择10个高倍视野,计数1 000个白血病细胞,在高倍镜下对染色作如下评分^[6]:①染色(以多数细胞呈阳性反应为准):无着色为0;淡着色为1;棕黄色为2;棕褐色为3;②染色细胞:没有细胞染色为0;1%~10%为1;11%~33%为2;34%~66%为3;>67%为4。两项结果相加<2为阴性,2~7为阳性。

1.4 统计学处理

统计学分析采用SPSS12.0统计软件进行卡方检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 Daxx蛋白在AL患儿中的表达情况

Daxx蛋白在AL患儿中的阳性表达率为38.0%,其中在ALL组的阳性表达率为26.5%,在ANLL组的阳性表达率为62.5%,采用卡方检验分析,结果提示AL组和ANLL组的阳性表达率均显著高于对照组($P < 0.01$),ALL组的阳性表达率与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$),见表1。ANLL组患儿Daxx蛋白阳性表达率明显高于ALL组,经卡方检验分析,差异有显著性($\chi^2 = 5.995$, $P < 0.05$)。

表1 各组患儿骨髓细胞Daxx蛋白的表达

	例数	Daxx		
		阴性	阳性	阳性率(%)
对照组	20	19	1	(5.0)
ALL	34	25	9	(26.5) ^a
ANLL	16	6	10	(62.5) ^a
AL	50	31	19	(38.0) ^a

a 与对照组比较均 $P < 0.01$

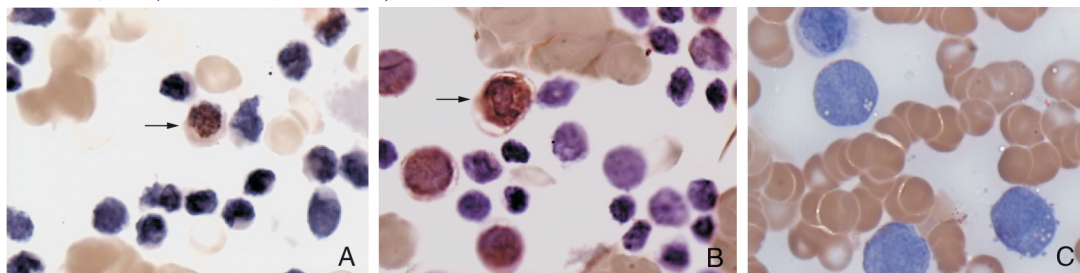


图1 Daxx蛋白在急性白血病及对照组骨髓细胞中的表达(SABC×400) 箭头所指为阳性细胞。Daxx蛋白免疫反应产物定位于胞核,以细胞核含棕黄色颗粒者为阳性细胞,部分细胞胞浆中亦可见到有阳性表达。A:急性淋巴细胞白血病骨髓细胞中Daxx蛋白阳性表达;B:急性非淋巴细胞白血病骨髓细胞中Daxx蛋白阳性表达;C:对照组骨髓细胞中Daxx蛋白的表达。

2.2 Daxx 蛋白表达与 AL 临床分型的关系

资料较完整的 15 例 ALL 患儿中,9 例 HR 患儿有 5 例 Daxx 蛋白表达阳性;而 6 例 SR 患儿无 Daxx 蛋白阳性表达。Daxx 蛋白在 HR ALL 中的阳性表达率明显高于其在 SR ALL 中的阳性表达率,且差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 Daxx 蛋白表达与 AL 疗效的关系

资料较完整的 15 例 ALL 患儿化疗 4 周末,有 6 例完全缓解。10 例 Daxx 蛋白阴性表达者化疗后有 5 例完全缓解,5 例 Daxx 蛋白阳性表达者化疗后有 1 例完全缓解,Daxx 蛋白阴性表达者的完全缓解率高于 Daxx 蛋白阳性表达者,但是经统计学处理分析,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3 讨论

细胞增殖与凋亡是机体维持自身稳定的基础。研究表明,恶性肿瘤无限增殖与肿瘤细胞凋亡减少和(或)分裂增加有关;肿瘤细胞通过复杂的分子机制下调凋亡相关基因,从而赋予肿瘤恶性增殖的生物学特性。

Daxx 是上世纪 90 年代末期发现的蛋白质家族中的新成员。1997 年 Yang 等^[7]利用酵母双杂交体系从人 HeLa 细胞 cDNAs 文库中筛选出与鼠 FasDD 结合并发生相互作用的克隆,同时分析了全序列鼠源性 cDNA,该 cDNA 编码分子量为 81.4 kD、内有 739 个氨基酸的新型蛋白,命名为 Daxx。鼠 Daxx (mouse Daxx, mDaxx)有一个 62 个氨基酸的区域,富含谷氨酸和天冬氨酸(70%),此外,还有两个小的富含脯氨酸的区域。随后,Pluta 等^[8]分离出人 Daxx 蛋白(human Daxx, hDaxx),其 cDNA 编码 740 个氨基酸,分子量为 71.3 kD 的蛋白。hDaxx 以 3 种不同的分子形式存在,分子量分别为 70 kD,97 kD 和 120 kD,其中 120 kD 为转录后磷酸化形式。hDaxx 一般含有 4 个结构域,即 2 个双螺旋结构域,一个富含酸性氨基酸的结构域和一个位于 C 端的富含丝氨酸/脯氨酸/苏氨酸 (serine/praline/threonine, SPT)结构域,这个结构域与 hDaxx 调控转录作用密切相关。Daxx 的 C 端是与其他蛋白质相互作用及其发挥功能的主要部位^[9]。Kiriakidon 等^[10]证实 hDaxx 基因定位在第 6 号染色体上,且位于 6 p 21.3,即主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) 区。Daxx 广泛分布于哺乳动物和人正常组织细胞及肿瘤细胞。hDaxx 广泛分布于成年人心、脑、肺、肝、骨骼肌、肾及胰腺,胚胎心、

肺和胰腺等组织细胞内^[10]。Daxx 与早幼粒细胞性白血病蛋白 (promyelocytic leukemia protein, PML) 在体内相互作用共定位 PML 癌基因结构域 (PML oncogenic domains, PODs),且 hDaxx 定位于 PODs 依赖于 PML,两者之间的结合是一种动态的细胞周期调节事件。Daxx 和 PML 作为 PODs 主要蛋白质,关系到 PODs 球状结构的形成、维持及其他蛋白质在该区的定位。

Daxx 与细胞的转录调控、生长发育、凋亡以及病毒感染等生理或病理过程密切相关。但是 Daxx 在凋亡中的作用尚有争议。有些学者^[6]认为 Daxx 作为 Fas 下游两条凋亡通路中的一条,与另一条由 Fas 相关死亡蛋白诱导的凋亡通路相互独立,从而诱导凋亡,Daxx 能够提高 Fas 的功能,调节细胞对 Fas 的敏感性。近来研究表明^[11],Daxx 作为一种重要的信号分子,不但在细胞浆介导肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族成员促凋亡信号的转导,而且在细胞核 PODs 作为转录调控子发挥促凋亡作用。但 Jennifer 等^[12]运用 RNA 干扰技术 (RNAi) 研究 Daxx 的功能时发现,Daxx 有抗凋亡活性,但过高表达又可促进凋亡,此时 Daxx 可能作为转录阻遏物而发挥作用。邓金牛等^[13]将去乙酰化抑制剂作用于急性髓性白血病细胞株 HL-60 和慢性白血病细胞株 K562,结果 Daxx 蛋白表达下降,说明 Daxx 在 HL-60 和 K562 细胞中起到抗凋亡作用。近来研究表明^[14],hDaxx 与 PML 相互作用共定位细胞核 PODs,且 Daxx 定位 PODs 依赖于 PML,是通过泛素同源性蛋白质家族成员中的小泛素相关修饰子 1 (small ubiquitin-related modifier, SUMO-1) 修饰过的 PML 介导的。若去除 PML 的 SUMO-1 修饰位点将阻止 PML 结合 PODs,此时的 Daxx 也不能与 PML 结合定位于 PODs,而是定位于密集的染色质,Daxx 定位 PODs 时,与组蛋白去乙酰化基酶 (human histone deacetylases, HDACs) 及靶基因分离,导致细胞凋亡所需要的某些基因能够有效表达,引起细胞凋亡,一旦 Daxx 脱离 PODs,与 HDACs 结合去乙酰化,有可能抑制某些凋亡相关基因的转录,以至不能合成凋亡相关蛋白质,阻断细胞凋亡^[15]。

我们研究发现,在 50 例 AL 患儿中,19 例 Daxx 呈阳性表达,而 20 例对照组中仅有 1 例阳性(确诊为幼年型类风湿性关节炎),差异有显著性意义,提示 Daxx 可能通过其抗凋亡作用促进白血病细胞的增殖,从而在儿童 AL 的发生发展中发挥重要的作用。我们的研究表明,ANLL 骨髓细胞中 Daxx 的表达显著升高,说明在 ANLL 骨髓细胞中可能存

在有 Daxx 的调控异常。ALL 骨髓细胞中 Daxx 的表达并无显著升高,可能与 Daxx 在淋巴细胞中不参与 Fas 通路诱导的凋亡有关^[16]。在研究中发现,Daxx 在 ALL 组及 ANLL 组之间的表达差异有显著性,提示 Daxx 在白血病的 FAB 分型中可能有重要意义。ALL 患儿中 HR 组 Daxx 的阳性表达率为 55.6%,SR 组为 0,二者差异有显著性意义,提示 Daxx 可能与儿童 AL 的临床预后密切相关,可以作为儿童 AL 的预后指标之一。本研究中 ALL 患儿在 4 周末,Daxx 阳性表达者的完全缓解率为 20.0%,阴性表达者的完全缓解率为 50.0%,提示 Daxx 阳性表达者化疗疗效差,缓解率低,但差异无显著性意义,可能与所治疗的病例数较少有关。

Michaelson^[12]等发现核因子- κ B (nuclearfactor-kappa B, NF- κ B)和 E2 启动子结合因子-1 (E2 promoter binding factor-1, E2F1)是 Daxx 新的靶点,并推测 Daxx 通过调节 NF- κ B 的转录活性,发挥抗凋亡作用。我们推测,在急性白血病细胞中,由于受到多种活化因素的作用,Daxx 脱离 PODs,定位于密集的染色质,并且其与 HDACs 结合去乙酰化,从而抑制某些凋亡相关基因的转录,以至不能合成凋亡相关蛋白质,阻断细胞凋亡;同时,NF- κ B 从 NF- κ B/I κ Bs 复合物中解离出来并定位于细胞核,Daxx 通过调节靶基因 NF- κ B 的转录活性,发挥抗凋亡作用。

综上所述,我们认为 Daxx 在儿童急性白血病中过度表达,在儿童急性白血病的发生发展过程中可能起重要作用。检测 Daxx 将有助于儿童急性白血病的诊断、预后及疗效的判断。对 Daxx 的进一步深入研究将有可能为儿童急性白血病的治疗提供新的思路和新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Lin DY, Fang HI, Ma AH, Huang YS, Pu YS, Jenster G, et al. Negative modulation of androgen receptor transcriptional activity by Daxx [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24 (24):10529-10541.
- [2] Zhao LY, Liu J, Sidhu GS, Niu Y, Liu Y, Wang R, et al. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (48): 50566-50579.
- [3] Lopez P, Vidal F, Martin L, Lopez-Fernandez LA, Ruel JF, Rosen BS, et al. Gene control in germinal differentiation: RNF6, a transcription regulatory protein in the mouse sertoli cell [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22 (10): 3488-3496.
- [4] Ishov AM, Vladimirova OV, Maul GG. Daxx-mediated accumulation of human cytomegalovirus tegument protein pp71 at ND10 facilitates initiation of viral infection at these nuclear domains [J]. *J Virol*, 2002, 76 (15): 7705-7712.
- [5] 全国小儿白血病协作组. 小儿急性淋巴细胞白血病诊疗建议(第二次修订草案) [J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37 (5): 305-307.
- [6] 李春蕊, 黄伟, 刘文励, 孙汉英, 周剑锋. Daxx 在急性白血病中的表达及意义 [J]. *中国组织化学及细胞化学杂志*, 2005, 14 (6): 618-622.
- [7] Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis [J]. *Cell*, 1997, 89 (7): 1067-1076.
- [8] Pluta AF, Earnshaw WC, Goldberg IG. Interphase-specific association of intrinsic centromere protein CENP-C with hDaxx, a death domain-binding protein implicated in Fas-mediated cell death [J]. *Cell Sci*, 1998, 111 (14): 2029-2041.
- [9] Hollenbach A, Sublett JE, McPherson CJ, Grosveld G. The Pax3-FKHR oncoprotein is unresponsive to the Pax3-associated repressor hDaxx [J]. *EMBO J*, 1999, 18 (13): 3702-3711.
- [10] Kiriakidou M, Driscoll DA, Lopez-Guisa JM, Strauss JF 3rd. Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region [J]. *DNA Cell Biol*, 1997, 16 (11): 1289-1298.
- [11] 苏波, 万艳平, 廖端芳. 细胞凋亡通路及转录调控中的 Daxx [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21 (3): 617-620.
- [12] Michaelson JS, Leder P. RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116 (Pt 2): 345-352.
- [13] 邓金牛, 李春蕊, 刘文励, 周剑锋, 孙汉英, 徐慧珍. 去乙酰化酶抑制剂诱导白血病细胞凋亡过程中 Daxx 的表达变化 [J]. *中华血液学杂志*, 2004, 25 (5): 312-313.
- [14] Li H, Leo C, Zhu J. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (5): 1784-1796.
- [15] Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, Guo A, Ruggiero D, Pandolfi PP. Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis [J]. *J Exp Med*, 2000, 191 (4): 631-640.
- [16] Villunger A, Huang DC, Holler N, Tschopp J, Strasser A. Fas ligand-induced c-Jun kinase activation in lymphoid cells requires extensive receptor aggregation but is independent of DAXX, RIP, or RAIDD [J]. *J Immunol*, 2000, 165 (3): 1337-1343.

(本文编辑:吉耕中)