

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

探討 Nm23-H1 與其結合蛋白調節其下游基因之表現於子宮  
頸癌所扮演的角色(第2年)  
研究成果報告(完整版)

計畫類別：個別型  
計畫編號：NSC 97-2314-B-040-012-MY2  
執行期間：98年08月01日至99年07月31日  
執行單位：中山醫學大學醫學系

計畫主持人：王博輝  
共同主持人：柯俊良  
計畫參與人員：碩士級-專任助理人員：張淑芳

公開資訊：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 99年09月02日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫  成果報告  
 期中進度報告

探討 Nm23-H1 與其結合蛋白調節其下游基因之表現於子宮頸癌所扮演的角色

The critical role of downstream genes expression regulated by human non-metastatic clone 23 and its binding proteins in cancer of uterine cervix

計畫類別： 個別型計畫  整合型計畫

計畫編號：97-2314-B-040-012-MY2

執行期間：98年8月1日至99年7月31日

計畫主持人：王博輝

共同主持人：柯俊良

計畫參與人員：張淑芳

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告  完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、  
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年  二年後可公開查詢

執行單位：中山醫學大學

中 華 民 國 99 年 7 月 1 日

附件二

## 可供推廣之研發成果資料表

可申請專利

可技術移轉

日期：\_\_年\_\_月\_\_日

<b>國科會補助計畫</b>	計畫名稱：The critical role of downstream genes expression regulated by human non-metastatic clone 23 and its binding proteins in cancer of uterine cervix 計畫主持人：王博輝 計畫編號：97-2314-B-040-012-MY2 學門領域：婦產學科
<b>技術/創作名稱</b>	
<b>發明人/創作人</b>	
<b>技術說明</b>	中文：  (100~500 字)
	英文：

可利用之產業 及 可開發之產品	
技術特點	
推廣及運用的價值	

- ※ 1. 每項研發成果請填寫一式二份，一份隨成果報告送繳本會，一份送 貴單位研發成果推廣單位（如技術移轉中心）。
- ※ 2. 本項研發成果若尚未申請專利，請勿揭露可申請專利之主要內容。
- ※ 3. 本表若不敷使用，請自行影印使用。

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

探討 Nm23-H1 與其結合蛋白調節其下游基因之表現於子宮頸癌所扮演的角色

The critical role of downstream genes expression regulated by human non-metastatic clone 23 and its binding proteins in cancer of uterine cervix

計畫編號：97-2314-B-040-012-MY2

執行期限：98 年 8 月 1 日至 99 年 7 月 31 日

## 中文摘要：

目的:檢測台灣女性 human nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1)基因的單一核甘酸多型性與子宮頸病變或子宮內膜癌及其臨床病理因子的相關性。

方法:利用 Real-time PCR 及基因型分析 122 位子宮頸病變(含 64 位子宮頸癌病人及 58 位高度子宮頸上皮內病變病人)及 244 位健康女性暨 91 位有子宮內膜癌女性病人及 268 位健康女性其 nm23-H1 promoter 的 rs16949649 及 rs2302254 或 rs34214448 之單一核甘酸多型性。

結果:女性在台灣女性 rs34214448 之 TG 型或 rs16949649 之 TC 型者，較易發展出子宮頸贅瘤。而 rs16949649 異形合子基因型 TC 或 rs2302254 基因型 CT 比野生型或同型合子基因型發展為子宮內膜癌機率高 (分別對個別多型性而言，其 odds ratio 3.30 and 1.86; 1.84 and 1.90)。在 rs16949640 基因型 CC 比基因型 TT 在發展為非內膜型的危險性低 (OR: 0.08;  $P=0.037$ )。然而，病人在 rs2302254 的基因型 TT 比基因型 CC 有較易發展為 advanced stage endometrial cancer (stage III-IV) 的危險性高。

結論:台灣女性對於子宮頸病變而言，rs34214448 之 TG 型或 rs16949649 之 TC 型者，較易發展出子宮頸贅瘤。子宮內膜癌在 nm23-H1 promoter 的 rs16949649 異形合子基因型 TC 及 rs2302254 基因型 CT 發展為子宮內膜

癌有潛在的危險性。一旦，有子宮內膜癌，台灣女性在 rs1694964 為同型合子 CC 發展為非內膜型危險性較低；當女性在 rs2302254 為同型合子 TT 傾向發展為 advanced stage cancer。

關鍵字:子宮頸贅瘤、子宮內膜癌、單一核甘酸多型性、advanced stage endometrial cancer

## 英文摘要

Objective. To investigate the association of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1) gene with neoplasia of uterine cervix (including 64 cervical cancer and 58 cervical high-grade dysplasia) or endometrial cancer and their implication in its clinicopathologic variables of women in Taiwan. Methods. Blood samples of 122 of patients with cervical neoplasia and 244 women controls were collected. In addition, 359 blood samples were collected from 268 healthy women and 91 patients with endometrial cancer. SNPs were analyzed for rs16949649 and rs2302254 or rs34214448 of nm23-H1 promoter using real time polymerase chain reaction and genotyping. The association of genotype and allele differences of nm23-H1 SNPs with endometrial cancer and their implication in some clinicopathologic variables were analyzed using Pearson's Chi-square or Fisher exact tests. Results. The heterozygous genotypes, TG in rs34214448 or TC in rs16949649, were differentially distributed between patients with cervical neoplasia and normal women (Hommel adjusted  $P = 0.0440$  and  $.0435$ , respectively)

as compared to their homozygotes. Women with heterozygous genotypes TC in rs16949649 or CT in rs2302254 exhibited higher risk to develop endometrial cancer as compared to those with their wild-type or homozygous genotypes (odds ratio 3.30 and 1.86; 1.84 and 1.90 for respective SNP). Individuals with CC genotype were at less risk (OR: 0.08; P=0.037) to have non-endometrioid type as compared to those with TT genotype in rs16949649. However, a trend of increased risk (OR: 26.67; P=0.01) of advanced stage endometrial cancer (stage III–IV) was observed in patients with TT genotype as compared to those with CC genotype in rs2302254. Conclusions. Taiwan women with the polymorphic heterozygotes TG in rs34214448 or TC in rs16949649 of human nonmetastatic clone 23 type 1 promoter have the tendency to develop cervical neoplasia while compared to their homozygous counterparts. However heterozygous genotypes TC in rs16949649 and CT in rs2302254 of nm23-H1 promoter are potential susceptibility factors for endometrial cancer in Taiwan women. Once having the endometrial cancer, Taiwan women with variant homozygote CC in rs1694964 were at less risk to have nonendometrioid type, while women with variant homozygote TT in rs2302254 tended to have advanced stage cancer.

**Key words:** neoplasia of uterine cervix endometrial cancer、single nucleotide polymorphisms (SNPs)、advanced stage endometrial cancer

**緒言:**

子宮頸癌是台灣最常見的婦科癌症，2008 年衛生署公佈癌症統計資料顯示，子宮頸癌在台灣女性癌症中排名第 7，2007 年死亡率為全國婦女癌症死亡第 6 位。近年來，侵入性子宮頸癌，年齡標準化之發生率(incidence rate)約為 20/每 10 萬婦女人口。子宮癌是女性惡性腫瘤的第八名，而在台灣 lower genital cancer 則位於第二名。健康局的健康事務處指出在台灣每十萬人有 8.3 的女性罹患子宮癌。子宮內膜癌佔了子宮體惡性肉瘤癌的大部分。子宮內膜癌在最近發生率有上升的趨勢。它可再被分類為內膜型(type 1)和非內膜型(type 2)腺癌。

Nm23 基因於 1988 年由 Steeg PS 首先提出，他以 differential colony hybridization 的技術，分析七株具有不同轉移能力的老鼠黑色素細胞癌(murine K-1735 melanoma cell line)，結果發現其中兩癌細胞株轉移能力較低，其對應之 cDNA clone 的 RNA 表現至少為其它 cDNA clone RNA 表現量的十倍以上，因而此基因被認為和癌症轉移有關(metastasis-associated)。而這個 clone 的號碼正好是 23 號，故稱其為 nonmetastatic clone #23(Steeg et al 1988)。目前至少有 9 種人類 nm23-H1 isotypes 被確定(Lacombe et al 2000)。Nm23-H1 表現被發現在乳癌及結腸中，對於癌細胞轉移的影響是相反(Kapitanovic et al 2004, Sirotkovic-Skerlev et al 2005)。增加 nm23-H1 會降低骨癌及神經母細胞癌病人的存活(Leone et al 1993, Oda et al 2000)。在我們最近的研究中也發現 nm23-H1 表現與子宮頸癌的侵入基質的深度有明顯的相關性(Hsu et al 2008)。nm23-H1 表現與子宮頸癌的存活有高度的相關性。在有淋巴轉移的子宮內膜癌病人，nm23-H1 表現較低(Marone et al 1996)。

在 Chinese HapMap 資料庫，nm23-H1 promoter 的 5'端有兩個單一核苷酸多型性

(single nucleotide polymorphisms, SNPs)。目前並無文獻指出，nm23-H1 promoter 5'端的多型性與子宮頸內膜癌間的相關性。在 nm23-H1 promoter 的 SNPs 會影響轉錄因子的結合及 promoter 活性同時也影響基因轉錄。不同的 SNPs 對於基因及蛋白的表達及子宮內膜癌有不同的危險率。本次研究，我們發現在台灣，女性 nm23-H1 基因的多型性會影響子宮內膜癌發生率，也與癌症的分期及病理類型有關。

## 實驗步驟

### 一. 檢體收集

122 位子宮頸病變婦女(含 64 位子宮頸癌病人及 58 位高度子宮頸上皮內病變病人)及 244 位健康女性為對照組，於 2007 年一月至 2009 年三月於中山醫學大學附設醫院婦產部看診或治療，經病理科報告確認。另外，91 個病人已經病理報告確認有子宮內膜癌，同時，也有 268 位沒有子宮內膜病變的女性病人作為對照組。子宮頸病變婦女及控制組的女性年紀為 50.6±12.0 and 48.6±8.2 歲。子宮內膜癌病人及控制組的女性年紀為 58.2±10.5 及 56.2±10.1 歲。有子宮內膜癌的病人在 2005 年 4 月到 2007 年 10 月於台中榮民總醫院及中山醫學大學附設醫院接受治療。他們的分期是依據 International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)系統分類，被歸類為內膜(type 1)及非內膜腺癌(type 2)。有 91 個血液檢體來自於這些病人並且被收集。268 個血液檢體則來自於同一個醫院接受健康檢查但沒有內膜癌的女性。上述研究都經中山醫學大學及台中榮民總醫院的人體試驗委員會通過執行。

### 二. Nm23-H1 多型性的選擇

dbSNP 資料庫中，nm23-H1 基因的 5 端

promoter 位置有 12 個單一核酸多型性 (single nucleotide polymorphism, SNP)，並且提供其中五個 SNP 的次要對偶頻率 (allele frequencies, MAPs) 的資訊。為了有足夠的能力評估潛在的相關性，我們檢測 rs16949649 (-1465 T/C)，rs3760568 (-1242 A/T)，rs3760469 (-1181 T/C) 及 rs2302254 (-873 C/T)，這些 MAF ≥ 5%。因為 rs16949649 和 rs3760468 ( $R^2=1$  and  $D'=1$ ) 及 rs3760469 ( $R^2=0.967$  and  $D'=0.985$ ) 都有很強的連鎖不平衡，基於中國 HapMap 資料庫，rs16949649 可以當作剩餘兩個 SNPs 的替代品被分析。另外，我們使用 EcoRI SNP of nm23-H1, rs34214448, 來評估它在子宮頸病變及對照組婦女之分佈情形。

### 三. 檢體血液的收集和基因體 DNA 粹取

利用 QIAamp DNA blood mini kits (Qiagen, Valencia, USA) 粹取含有 EDTA 血液檢體中的基因體 DNA。DNA 被溶解於 TE buffer [10mM Tris(pH 7.8), 1mM EDTA]，保存於 -20 °C，並且被利用當作 real-time polymerase chain reaction (PCR) 的模板。

### 四. 利用 real-time polymerase chain reaction (PCR) 及基因分型分析單一核酸多型性

萃取的 DNA 被利用當作 real-time PCR 的模板。nm23-H1 多型性的對偶基因辨識利用 TaqMan (assay IDs: C\_34107066\_10 for rs16949649 and C\_2646888\_1\_ for rs2302254) 及 ABI Perkin Elmer Prism 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA) 進行分析。最終每個反應為 5  $\mu$  l，含有 2.5  $\mu$  L TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0.125  $\mu$  L primers/TaqMan probes mix, and 10 ng DNA。Real-time PCR 反應包含了初始

變性步驟為95°C，15秒，接下來為92°C，15秒；60°C，1分鐘進行40 cycle。藉由ABI PRISM 7900HT 序列偵測儀 (Applied Biosystems)分析螢光強度。對偶頻率則藉由ABI SDS software分析。至於Gene polymorphism for EcoRI site of nm23-H1 (rs34214448)則採用PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)技術。使用的 primers 為 5'-CCCACCGTTTATTGGCTAG-30 (forward)和 5'-CAACCCCTTCATTTTACAA-30 (reverse)。

## 五. 統計分析

利用Winpepi Software, version 10.0軟體分析Pearson's Chi-square test，藉此評估有子宮頸病變或子宮頸內膜癌女性病人與健康女性其nm23-H1 SNP的不同。Odds ratio (OR)和其95% confidence interval (CI)被評估藉由Chi-square test。我們分析子宮內膜癌的女性病人與正常女性在野生型同型合子與非野生型的基因型間；同型合子與異型合子間；同時也分析變異同型合子與非變異的基因型間的不同。藉由Winpepi Software, version 10.0軟體分析Hommel's method判定P值。P<0.05表示有顯著差異。藉由Winpepi Software分析Fisher exact test藉此判定nm23-H1 SNPs與臨床病理因子的相關性。

## 實驗結果：

### 1. 子宮頸病變及對照組婦女nm23-H1單一核甘酸多型性之基因型分佈。

Nm23-H1 Polymorphisms	Normal Women	Patients With Cervical Neoplasia	P	Power	Hommel Adjusted P <sup>a</sup>	Odds Ratio (95% Confidence Interval)
rs34214448			.027 <sup>b</sup>	0.7	.054	
GG	98	45				1.00 (reference)
TT	53	15	.157		.157	0.62 (0.29-1.26)
TG	93	62	.125		.125	1.45 (0.88-2.41)
TG vs TT <sup>a</sup>			.0009 <sup>b</sup>	0.8	.027 <sup>b</sup>	2.36 (1.18-4.89)
rs16949649			.024 <sup>b</sup>	0.7	.048 <sup>b</sup>	
TT	99	45				1.00 (reference)
CC	53	15	.166		.166	0.62 (0.29-1.27)
TC	92	62	.105		.166	1.48 (0.90-2.46)
TC vs CC <sup>a</sup>			.009 <sup>b</sup>	0.8	.027 <sup>b</sup>	2.38 (1.19-4.95)
rs2302254			.728	0.1	.728	
CC	136	71				1.00 (reference)
TT	17	6	.428		.817	0.68 (0.21-1.90)
CT	91	45	.817		.817	0.95 (0.58-1.53)
CT vs TT <sup>a</sup>			.506		.817	1.4 (0.48-4.64)

**Table 1.**

<sup>a</sup> Statistical analysis: chi-square test; Hommel

method in response to multiple analyses. We adjust the P-values using Hommel method by WinPepi software, version 10.0. The Hommel adjusted P values 0.054 in rs34214448, 0.048 in rs16949649, and 0.728 in rs2302254 are obtained based on 0.027, 0.024, and 0.728, respectively. The Hommel's adjusted P values 0.157, 0.157, and 0.027 in rs34214448 are obtained based on 0.157, 0.125, and 0.009, respectively. The Hommel adjusted P values 0.166, 0.166, and 0.027 in rs16949649 are obtained based on 0.166, 0.105, and 0.009, respectively. The Hommel adjusted P values 0.817, 0.817, and 0.817 in rs2302254 are obtained based on 0.428, 0.817, and 0.506, respectively. Power is also calculated using Primer software.

<sup>b</sup> P < 0.05. Nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 type 1.

<sup>c</sup> Compared between heterozygotes and variant homozygotes. The significant difference among TT, CC, and TC distribution (P = 0.048) in SNPs rs16949649 is attributed to the comparison of TC and CC (the Hommel adjusted P = 0.027).

### 2. 子宮頸病變及對照組婦女nm23-H1單一核甘酸多型性之基因種類分佈。

Nm23-H1 Polymorphisms	Normal Women	Patients With Cervical Neoplasia	P	Power <sup>a</sup>	Hommel Adjusted P <sup>a</sup>	Odds Ratio (95% Confidence Interval)
rs34214448						
GG	98	45	.544		.544	1.00 (reference)
TT/TG	146	77				1.15 (0.72-1.85)
GG/TT	151	60	.020 <sup>b</sup>	0.7	.044 <sup>b</sup>	1.00 (reference)
TG	93	62				1.68 (1.06-2.66)
GG/TG	191	107	.029 <sup>b</sup>	0.6	.058	1.00 (reference)
TT	53	15				0.51 (0.25-0.96)
rs16949649						
TT	99	45	.496		.496	1.00 (reference)
CC/TC	145	77				1.17 (0.73-1.88)
TT/CC	152	60	.017 <sup>b</sup>	0.7	.0435 <sup>b</sup>	1.00 (reference)
TC	92	62				1.71 (1.07-2.71)
TT/TC	191	107	.029 <sup>b</sup>	0.6	.058	1.00 (reference)
CC	53	15				0.51 (0.25-0.96)
rs2302254						
CC	136	71	.655		.655	1.00 (reference)
CT/TT	108	51				0.90 (0.57-1.44)
CC/TT	153	77	.939		.939	1.00 (reference)
CT	91	45				0.98 (0.61-1.58)
CC/CT	227	116	.446		.446	1.00 (reference)
TT	17	6				0.69 (0.22-1.90)

**Table 2.** <sup>a</sup> 統計分析：chi-square test；以Hommel method作多重分析。Power以Primer software計算。只標示有統計意義者。

<sup>b</sup> P < 0.05。Nm23-H1: human nonmetastatic

clone 23 type 1。

### 3. 子宮頸病變及對照組婦女nm23-H1單一核甘酸多型性之allele分佈<sup>a</sup>。

Nm23-H1 Polymorphisms	Normal Women	Patients With Cervical Neoplasia	P	Hommel Adjusted P	Odds Ratio (95% Confidence Interval)
rs34214448			.423	506	
G	289	152			1.00 (reference)
T	199	92			0.88 (0.63-1.22)
rs16949649			.454	506	
T	290	152			1.00 (reference)
C	198	92			0.89 (0.64-1.23)
rs2302254			.506	506	
C	363	187			1.00 (reference)
T	125	57			0.89 (0.61-1.28)

<sup>a</sup>統計分析：chi-square test；以Hommel method作多重分析。Nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 type 1。

### 4. 子宮頸病變及對照組婦女nm23-H1單一核甘酸多型性rs34214448 and rs16949649基因型相關之一致性<sup>a</sup>。

Nm23-H1 Polymorphisms	Genotypes	rs 16949649			Total Number
		TT	TC	CC	
rs34214448	GG	142	1		143
	TG	2	153		155
	TT			68	68
Total number		144	154	68	366

<sup>a</sup>  $\kappa$  Statistic用來評估相關之一致性， $\kappa$  statistic coefficient 是0.987 ( $P < 0.001$ )。

Nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 type 1。

### 5. 91位子宮內膜癌病人的癌症病理分型

Characteristics	Endometrial cancer patients (n=91)
Age at diagnosis (years, mean $\pm$ SD)	58.2 $\pm$ 10.5
Pathologic types	
Endometrioid	77
Non-endometrioid	14
Stages	
I	66
II	13
III	10
IV	2

**Table 5:** 子宮內膜癌病人的癌症病理分型。77位病人被診斷為子宮內膜癌中的內膜型；14位病人非內膜型。66位病人屬於第一期；13位病人屬於第二期；10位病人屬於第三期；2位病人屬於第四期。

### 6. 有子宮內膜癌女性病人及正常女性病人nm23-H1單一核甘酸多型性的分布情形。

Nm23-H1 polymorphisms	Normal women	Patients with endometrial cancer	P	Power	Odds ratio (95% confidence interval)
rs16949649			<0.001*	0.963	
TT	101	14			1.00 (reference)
CC	49	23	0.001*		3.39 (1.51-7.73)
TC	118	54	<0.001*		3.30 (1.68-6.80)
rs2302254			0.026*	0.673	
CC	160	43			1.00 (reference)
TT	17	3	0.772		0.66 (0.12-2.43)
CT	91	45	0.016*		1.84 (1.09-3.10)

**Table 6. nm23-H1 基因多型性與子宮內膜癌的相關性。**子宮內膜癌女性病人與正常女性間，在單一核甘酸多型性 rs16949649 ( $P < 0.001$ ) 與 rs2302254 ( $P = 0.026$ ) 有很明顯的不同。以 rs1694649 中的野生型同型合子基因型 TT 當作參考值，同型合子 CC 及異型合子 TC 發展為內膜癌的危險性更高 (OR: 3.39 及 3.30)。然而在 rs2302254，只有異型合子 CT 基因型，比野生型同型合子為 CC 更具危險性。

### 7. 在子宮內膜癌女性病人及正常女性病人nm23-H1 基因單一核甘酸多型性的多變性分布。

Nm23-H1 polymorphisms	Normal women	Patients with endometrial cancer	Hommel's adjusted P	Power	Odds ratio (95% confidence interval)
rs16949649					
TT	101	14	<0.001*	0.852	1.00 (reference)
CC/TC	167	77			3.33 (1.75-6.69)
TT/CC	150	37	0.03*	0.730	1.00 (reference)
TC	118	54			1.86 (1.11-3.10)
TT/TC	219	68	0.173	0.292	1.00 (reference)
CC	49	23			1.51 (0.82-2.74)
rs2302254					
CC	160	43	0.10	0.545	1.00 (reference)
CT/TT	108	48			1.65 (1.00-2.75)
CC/TT	177	46	0.036*	0.768	1.00 (reference)
CT	91	45			1.90 (1.14-3.17)
CC/CT	251	88	0.427	0.187	1.00 (reference)
TT	17	3			0.50 (0.09-1.80)

**Table 7. nm23-H1 基因多型性與子宮內膜癌的相關性。**非野生的基因型比野生的同型合子 TT 有更高的危險發展為內膜癌 (OR: 3.33)。相同的，異型合子 TC 的基因型比同型合子的基因型有更高的危險 (OR: 1.86)。然而，只有異型合子 CT 的基因型比同型合子的配對發展為內膜癌更具危險性。

**8. 分析在子宮內膜癌女性病人及正常女性中，nm23-H1 單一核酸多型性的對偶基因分布情形。**

Nm23-H1 polymorphisms	Normal women	Patients with endometrial cancer	P	Power	Odds ratio (95% confidence interval)
rs16949649			0.001*	0.951	
T	320	82			1.00 (reference)
C	216	100			1.81 (1.27-2.57)
rs2302254			0.231	0.238	
C	411	131			1.00 (reference)
T	125	51			1.28 (0.86-1.90)

**Table 8. 分析在子宮內膜癌女性病人及正常女性中，nm23-H1 多型性的對偶基因機率。**我們分析 359 個血液檢體中兩個 nm23-H1 多型性的對偶基因機率。在這個研究中，對於 rs16949649 的兩個單一核酸多型性 MAFs 測試是 0.440，對於 re2302254 是 0.245，相似於 HCB (Han Chinese in Beijing, China)，他是根據 NCBI 的 SNP (dbSNP) 資料庫。在 nm23-H1 單一核酸多型性 rs16949649 對偶基因 C 比對偶基因 T 高出 1.81 倍 (95% CI 1.27~2.57) 發展為子宮內膜癌。然而 rs2302254 的對偶基因機率，在子宮內膜癌女性病人及正常女性並沒有不同。

**9. nm23-H1 單一核酸多型性 rs16949649 及 rs2302254 的基因型分布與臨床病理因子的關係。**

Patients with endometrial cancer (n=91)	rs16949649			P	rs2302254			P
	TT	CC	TC		CC	TT	CT	
Age (years)				0.285				0.678
≤50	3	7	8		9	0	9	
>50	11	15	46		34	3	35	
OR with 95% CI	0.62 (0.09-3.58)	1.57 (0.23-8.0)					1.86 (0.23-3.41)	
Pathologic types				0.037*				0.596
Endometrioid	9	22	46		33	3	9	
Non-endometrioid	5	1	8		8	0	6	
OR with 95% CI	0.08 (0.00-0.94)	0.31 (0.07-1.54)					0.67 (0.17-2.47)	
Stages				0.194				0.01*
I-II	13	17	49		40	1	38	
I				0.460†				0.233†
IA	6	14	32		24	0	28	
IB	6	1	7		10	1	3	
II	1	2	10		6	0	7	
III-IV	1	6	5		3	2	7	
OR with 95% CI	4.59 (0.24-226.98)	1.33 (0.13-47.50)			26.67 (0.94-1608.95)		2.46 (0.51-15.03)	
OR with 95% CI†	0.07 (0-0.86)	0.22 (0.04-1.12)					0.26 (0.04-1.18)	

**Table 9. 有子宮內膜癌病人，nm23-H1 單一核酸多型性的基因型分布及特徵。**Nm23-H1 單一核酸多型性 rs16949649 的基因型在子宮內膜癌中的內膜型及非內膜型間的分布不同 (P=0.037)。rs2302254 在子宮 (stage I~ II) 及 advanced endometrial (stage

III-IV) (P=0.01) 間分布不同。年紀與 nm23-H1 單一核酸多型性沒有相關性。在 rs16949649 中，基因型 CC 比 TT 降低有子宮內膜癌中非內膜癌類型的危險 (OR: 0.08)。然而，在 rs2302254 中，基因型 TT 比 CC 的病人轉變為 advanced stage endometrial cancer (stage III-IV) 危險率高。Stage I 子宮內膜癌是最常見分期，被發現機率是 73% (66/91)。在 stage I 及 II 間 nm23-H1 單一核酸多型性 rs16949649 (P=0.460) 或 rs2302254 (P=0.883) 沒有不同的基因型分布。然而，在子宮內膜癌中 IA 及 IB 間 nm23-H1 單一核酸多型性 rs16949649 (P=0.017) 或 rs2302254 (P=0.023) 有明顯不同的基因型分布。在 rs16949649，病人有基因型的 CC 比 TT 在發展為 myometrium invasion of tumor 危險性低 (OR: 0.07)。但是，stage IA 和 stage IB 的病人間，在 rs16949649 基因型為 TC 比較 TT 在分布上沒有不同。stage IA 和 stage IB 的病人，其 nm23-H1 單一核酸多型性 rs2302254 基因型為 TT 或 CT 比較 CC 的分布沒有不同。

**討論:**

Nucleoside diphosphate (NDP) kinase 為 nm23-H1 產物，催化 NDPs 磷酸化為 nucleotide triphosphates (Kimura et al 1990, Wallet et al 1990)。在生物化學層面，nm23-H1 屬於多功能並且有很多功能都與 DNA 代謝相關，例如: DNA cleavage (Postel 2003)。正常 nm23 透過正常損壞修復防止突變和 DNA 轉變。然而，nm23 也許有相反的影響，其表現與癌細胞相關。在具有轉移能力的乳癌和卵巢癌 nm23-H1 表現是低的。DNA 修復表現缺失會導致染色體突變和基因體轉變導致腫瘤形成 (Malins et al 1996, Malins et al 1998)。細胞的癌化通常與提高 nm23 有關，高表現 nm23-H1 是突變，因為

過度的切割、修復和 misrepair。這也許可以解釋 nm23 是高度被調控。在子宮頸癌 nm23-H1 的 mRNA 和蛋白表現是比正常高 (Hsu et al 2008, Wang et al 2003)。然而，nm23-H1 多型性在婦癌的角色並沒有被報導過。我們嘗試在台灣女係 nm23-H1 SNP 如同 rs16949649 和 rs2302254 與子宮頸贅瘤及內膜癌的相關性。我們的研究，首次說明 nm23-H1 的多型性 rs16949649 和 rs230254 或 rs34214448 在子宮頸病變或子宮內膜癌病人及健康的女性間分布有很大的不同。跟同型合子婦女相比，婦女有 rs34214448 之 TG 型或 rs16949649 之 TC 型者，較易發展出子宮頸贅瘤。然而婦女有 rs16949649 CC 或 TC 基因型比野生 TT 基因型有更高的危險性發展為子宮內膜癌。至於，在 rs2302254 多型性方面，只有異型合子 CT 基因型比野生 CC 基因型有危險。子宮內膜癌與 nm23-H1 SNP 多型性種類有不同相關性之機制並不清楚。SNPs 會影響不同轉錄機制的親和性而轉變 nm23-H1 promoter 的活性。Ouata et al. 指出在人類乳癌細胞株間 nm23-H1 片段有不同表現 (Qu et al 2008)。195bp NheI-XbaI 片段影響基本表現；248bp AvrII-NheI 片段會提高 nm23-H1 表現；544bp 會抑制其表現。248bp AvrII-NheI 片段有三個轉錄因子結合位 (ACAAAG enhance, MAF/Ets, and CTF/NF1 half site)。假如，包含 SNP rs16949649 的 544bp AvrII 片段被刪除，在 MCF-7 乳癌細胞株 nm23-H1 promoter 活性被增加。因此，可知不同的 SNP 會影響轉錄因子結合並且影響 nm23-H1 promoter 活性和基因表現，然後發展為子宮頸贅瘤或子宮內膜癌。Hsieh et al. 發現 nm23-H1 基因 EcoRI 多型性位置，rs34214448，與非小細胞肺癌有明顯的相關性 (Hsieh et al 2007)。nm23-H1 的 EcoRI 多型性 (rs34214448) 被發現是根據 dbSNP

b126。然而，在世界人口上 nm23-H1 多變的單體型對於多型性來說，在已存的資料庫如:dbSNP 和 HapMap Public release#27 並沒有任何訊息存在。因為對於世界人口連鎖不平衡檢定的缺失，我們利用 kappa 估計去分析 rs16949549 及 rs3421448 在檢測子宮頸贅瘤的關係並且發現他們有高度基因型的一致性 (Feng et al)。這也間接的支持我們的發現，nm23-H1 SNP，rs1694949 提升與子宮內膜癌的發生率的相關性。

當我們分析 nm23-H1 SNPs 對偶基因的分佈與子宮內膜癌的相關性，我們發現在 rs16949649 對偶基因 C 比 T 對偶基因子宮內膜癌危險率高。然而，在 rs2392254 T 對偶基因並沒有發現比 C 對偶基因具危險性。因此，在 rs16949649 CC/TC (non-wild-type) 比野生型基因型 TT 更具發展為子宮內膜癌的危險性。在 rs2302254，CT/TT 比野生基因型 CC 並沒有明顯增加危險性。此外，女性帶有 nm23-H1 promoter 的多型性異形合子，如 SNPs rs16949649 TC 比它們的同型合子更具有發展出子宮頸贅瘤或子宮內膜癌之危險性。但是對 rs2302254 單一核甘酸多型性之分析發現，CT 比它們的同型合子對於子宮內膜癌更具危險性，對子宮頸贅瘤則沒有此危險性。Nm23-H1 基因多型性的異型合子也許會轉變 DNA 與轉錄因子的互動及 nm23-H1 promoter 活性，而造成贅瘤形成的可能性。Choudhuri et al. 提出 nm23-H1 promoter 異型性在癌症上的影響 (Choudhuri et al 2006)。當異型性的 promoter 被啟動，在人類侵入性乳癌 nm23-H1 表現是下降，影響乳癌細胞的遷移及轉移的活性。

Steege et al. 發現在很多癌症檢體上如卵巢癌，nm23-H1 mRNA 和蛋白表現與癌症轉移的潛力是相反的 (Steege 2006)。相反的，nm23-H1 的高表現可以預測子宮頸癌病人的存活率較差。然而，nm23-H1 多型性與婦

癌的臨床病理因子的相關係知道的很少 (Chen et al 2001, Hsu et al 2008)。本次的研究，子宮內膜癌的病人帶有 nm23-H1 SNP rs16949649 CC 基因型比野生型的 TT 發展為非內膜癌的類型明顯危險性較低。這表示，當個體有 rs16949649 的多變同型合子基因型 CC 有更大的危險性發展為子宮內膜癌，但有較小的危險性發展為非內膜型的腺癌。相對的，Qu et al. 指出 nm23-H1 promoter 的 rs16949649 SNP 次要的 C 對偶基因與乳癌移動性有相關性並且更證實與早期癌症有關聯 (Qu et al 2008)。在臨床變因 rs2302254 TT 基因型比野生 CC 基因型更容易成為 advanced stage endometrial cancer。我們也發現在 rs16949649 病人帶有 CC 比 TT 造成癌症的轉移的機率低。因為我們的檢體數太小，在子宮內膜癌的研究上需要更大的檢體量來證實我們的新發現。

總結而言，對於罹患婦科癌症危險，婦女有 rs34214448 之 TG 型或 rs16949649 之 TC 型者，較易發展出子宮頸贅瘤。當我們比較野生型的基因型或異型合子，nm23-H1 SNP 在 rs16949649 異型合子基因型 TC 和 rs2302254 CT 對於子宮內膜癌是潛在的危險因子。nm23-H1 SNPs 的 rs16949649 和 rs2302254 位子多變序列，也許影響 nm23-H1 promoter 結合上轉錄因子。改變這些結合也許會影響 nm23-H1 轉錄，進而轉變 nm23-H1 表現和子宮內膜癌病人的診斷。

誌謝:

1. 感謝行政院國家科學委員會 NSC 97-2314-B-040-012-MY2 計劃提供此研究經費。
2. 檢體收集已獲得中山醫學大學附設醫院 Institutional Review Board 同意。
3. 內容已發表於 *Gynecologic Oncology* (2010) 及 *Reproductive Sciences* (2010)

- (1) Wang PH, Yi YC, Tsai HT, Tee YT, Ko JL, Han CP, Liu YF, Lin LY, Yang SF. Significant association of genetic polymorphism of human nonmetastatic clone 23 type 1 gene with an increased risk of endometrial cancer. *Gynecol Oncol.* 2010 July 2. [Epub ahead of print]
- (2) Feng CY, Wang PH, Tsai HT, Tee YT, Ko JL, Chen SC, Lin CY, Han CP, Yang JS, Liu YF, Lin LY, Yang SF. Polymorphisms of Human Nonmetastatic Clone 23 Type 1 Gene and Neoplastic Lesions of Uterine Cervix. *Reprod Sci.* 2010 July 2. [Epub ahead of print]

#### 參考文獻

- Chen HY, Hsu CT, Lin WC, Tsai HD, Chang WC. 2001. Prognostic value of nm23 expression in stage IB1 cervical carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 31: 327-32
- Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Robertson ES. 2006. Expression of alpha V integrin is modulated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the metastasis suppressor Nm23-H1 through interaction with the GATA-1 and Sp1 transcription factors. *Virology* 351: 58-72
- Feng CY, Wang PH, Tsai HT, Tee YT, Ko JL, et al. Polymorphisms of Human Nonmetastatic Clone 23 Type 1 Gene and Neoplastic Lesions of Uterine Cervix. *Reprod Sci*
- Hsieh YS, Lee YL, Yang SF, Yang JS, Chen W, et al. 2007. Association of EcoRI polymorphism of the metastasis-suppressor gene NME1 with susceptibility to and severity

of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58: 191-5

Hsu CG, Lin LY, Ko JL, Yang SF, Chang H, et al. 2008. High expression of human nonmetastatic clone 23 type 1 in cancer of uterine cervix and its association with poor cell differentiation and worse overall survival. *J Surg Oncol* 98: 448-56

Kapitanovic S, Cacev T, Berkovic M, Popovic-Hadzija M, Radosevic S, et al. 2004. nm23-H1 expression and loss of heterozygosity in colon adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 57: 1312-8

Kimura N, Shimada N, Nomura K, Watanabe K. 1990. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 265: 15744-9

Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. 2000. The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 32: 247-58

Leone A, Seeger RC, Hong CM, Hu YY, Arboleda MJ, et al. 1993. Evidence for nm23 RNA overexpression, DNA amplification and mutation in aggressive childhood neuroblastomas. *Oncogene* 8: 855-65

Malins DC, Polissar NL, Gunselman SJ. 1996. Progression of human breast cancers to the metastatic state is linked to hydroxyl radical-induced DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2557-63

Malins DC, Polissar NL, Schaefer S, Su Y, Vinson M. 1998. A unified theory of carcinogenesis based on order-disorder transitions in DNA structure as studied in the human ovary and breast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 7637-42

Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, et al. 1996. Nm23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br J Cancer* 74: 1063-8

Oda Y, Naka T, Takeshita M, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. 2000. Comparison of histological changes and changes in nm23 and c-MET expression between primary and metastatic sites in osteosarcoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Hum Pathol* 31: 709-16

Postel EH. 2003. Multiple biochemical activities of NM23/NDP kinase in gene regulation. *J Bioenerg Biomembr* 35: 31-40

Qu S, Long J, Cai Q, Shu XO, Cai H, et al. 2008. Genetic polymorphisms of metastasis suppressor gene NME1 and breast cancer survival. *Clin Cancer Res* 14: 4787-93

Sirotkovic-Skerlev M, Krizanac S, Kapitanovic S, Husnjak K, Unusic J, Pavelic K. 2005. Expression of c-myc, erbB-2, p53 and nm23-H1 gene product in benign and malignant breast lesions: coexpression and correlation with clinicopathologic parameters. *Exp Mol Pathol* 79: 42-50

Steeg PS. 2006. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med* 12: 895-904

Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. 1988. Altered expression of NM23, a gene associated with low tumor metastatic potential, during adenovirus 2 Ela inhibition of experimental metastasis. *Cancer Res* 48: 6550-4

Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, et al. 1990. Dictyostelium nucleoside

diphosphate kinase highly homologous to  
Nm23 and Awd proteins involved in  
mammalian tumor metastasis and *Drosophila*  
development. *J Natl Cancer Inst* 82:  
1199-202

Wang PH, Chang H, Ko JL, Lin LY. 2003.  
Nm23-H1 immunohistochemical expression  
in multisteps of cervical carcinogenesis. *Int J*  
*Gynecol Cancer* 13: 325-30

無研發成果推廣資料

97 年度專題研究計畫研究成果彙整表

計畫主持人：王博輝		計畫編號：97-2314-B-040-012-MY2				計畫名稱：探討 Nm23-H1 與其結合蛋白調節其下游基因之表現於子宮頸癌所扮演的角色	
成果項目		量化			單位	備註（質化說明：如數個計畫共同成果、成果列為該期刊之封面故事...等）	
		實際已達成數（被接受或已發表）	預期總達成數（含實際已達成數）	本計畫實際貢獻百分比			
國內	論文著作	期刊論文	0	0	0%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%		
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（本國籍）	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	0%			
專任助理		1	1	100%			
國外	論文著作	期刊論文	2	2	100%	篇	
		研究報告/技術報告	0	0	0%		
		研討會論文	0	0	0%		
		專書	0	0	0%	章/本	
	專利	申請中件數	0	0	0%	件	
		已獲得件數	0	0	0%		
	技術移轉	件數	0	0	0%	件	
		權利金	0	0	0%	千元	
	參與計畫人力（外國籍）	碩士生	0	0	0%	人次	
		博士生	0	0	0%		
博士後研究員		0	0	0%			
專任助理		0	0	100%			

<p style="text-align: center;">其他成果</p> <p>(無法以量化表達之成果如辦理學術活動、獲得獎項、重要國際合作、研究成果國際影響力及其他協助產業技術發展之具體效益事項等，請以文字敘述填列。)</p>	無
---	---

	成果項目	量化	名稱或內容性質簡述
科 教 處 計 畫 加 填 項 目	測驗工具(含質性與量性)	0	
	課程/模組	0	
	電腦及網路系統或工具	0	
	教材	0	
	舉辦之活動/競賽	0	
	研討會/工作坊	0	
	電子報、網站	0	
	計畫成果推廣之參與(閱聽)人數	0	

# 國科會補助專題研究計畫成果報告自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

達成目標

未達成目標（請說明，以 100 字為限）

實驗失敗

因故實驗中斷

其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文： 已發表  未發表之文稿  撰寫中  無

專利： 已獲得  申請中  無

技轉： 已技轉  洽談中  無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

研究成果簡述如下：目的:檢測台灣女性 human nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1) 基因的單一核苷酸多型性與子宮頸病變或子宮內膜癌及其臨床病理因子的相關性。方法(創新技術):利用 Real-time PCR 及基因型分析 122 位子宮頸病變及 244 位健康女性暨 91 位有子宮內膜癌女性病人及 268 位健康女性其 nm23-H1 promoter 的 rs16949649 及 rs2302254 或 rs34214448 之單一核苷酸多型性。結果及結論(學術成就及社會影響):女性在台灣女性 rs34214448 之 TG 型或 rs16949649 之 TC 型者，較易發展出子宮頸贅瘤。而 rs16949649 異形合子基因型 TC 或 rs2302254 基因型 CT 比野生型或同型合子基因型發展為子宮內膜癌機率高。在 rs1694964 為同型合子 CC 發展為非內膜型危險性較低，在 rs2302254 為同型合子 TT 傾向發展為 advanced stage cancer。可應用於台灣婦女預防和治療子宮頸病變及子宮內膜癌。