

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期末報告

nm23-H1 及其下游基因 lipocalin 2 於子宮頸癌上皮間質型
轉換之角色和轉移潛力及臨床病理因子之關係(第3年)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 99-2314-B-040-011-MY3
執行期間：101年08月01日至102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

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 102年10月12日

中文摘要： 我們發現阻斷 human nonmetastatic clone 23 Type 1 (nm23-H1) 表現會增加 lipocalin 2 表現。我們先將 SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因，以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷(knock down)，發現 lipocalin 2 之 mRNA 表現會增強。接著將 lipocalin 2 promoter 轉染(transfect)到經 nm23-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株(稱為 shnm23-H1 A 和 B 癌細胞株)，並使用 luciferase reporter assay 分析，發現 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之增加，因而其 mRNA 和蛋白之表現也跟著下降。當以經 flag-nm23-H1 轉染之 SiHa 子宮頸癌細胞株為正對照組(positive controls)時，發現這些癌細胞 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之下降。更進一步驗證了 nm23-H1 對 lipocalin 2 之影響，亦即 nm23-H1 會透過 lipocalin 2 promoter，減少 lipocalin 2 之活性，進而減少 lipocalin 2 mRNA 之表現。Nm23-H1 和 lipocalin 2 兩者或可應用於子宮頸癌細胞轉移型態之研究，包括移行和侵犯能力及細胞骨架之分析，我們藉由 Boyden chamber 分析 SiHa 細胞轉移(migration)和侵犯(invasion)能力，也因 nm23-H1 經阻斷或 lipocalin 2 經轉染過度表現後而下降。並進一步探討對細胞骨架(cellular cytoskeleton)之影響，這些 nm23-H1 阻斷後或 lipocalin 2 基因過度表現之癌細胞，會呈現卵鵝石狀的表徵，並減少內部纖維。我們並製造子宮頸組織晶片，發現子宮頸癌病人癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，其癌症復發的機會較高，且平均存活較差。研究價值為可利用子宮頸癌病人，其癌組織 nm23-H1 和 lipocalin 2 之免疫蛋白表現，來追蹤和治療病人。子宮頸癌病人其癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，需嚴謹追蹤，且加強放射治療或化學治療。本研究重要發現為，可以 nm23-H1 和 lipocalin 2 為目標，減少 nm23-H1 表現且加強 lipocalin 2 表現，發展出研究策略和標靶療法，改善子宮頸癌病人預後。

中文關鍵詞： human nonmetastatic clone 23， lipocalin 2， SiHa 子宮頸癌細胞，鱗狀上皮子宮頸癌細胞，轉移型態，轉移，平均存活

英文摘要： When human nonmetastatic clone 23 (nm23-H1) gene was knocked down, expression of lipocalin 2 is elevated. Our preliminary study using cDNA genechip found that lipocalin 2 expression is affected by nm23-H1 and seems to be a significant downstream gene of nm23-H1 in SiHa cancer cells of uterine cervix. The

objectives of this pioneer study are to investigate the expression and correlation of nm23-H1 and lipocalin 2 in metastatic phenotypes of cancer cells including migration, invasion and cytoskeleton as well as their implication in recurrence and survival of cervical cancer patients.

Stable nm23-H1 knockdown SiHa cancer cells (shnm23-H1 A and B cancer cells) increased lipocalin 2 mRNA expression. When we transfected lipocalin 2 promoter to shnm23-H1 A and B cell lines and used luciferase reporter assay to analyze lipocalin 2 promoter activity, the activity was increased significantly. Thereafter, mRNA and protein expression of lipocalin 2 is reduced. In contrast, their positive control SiHa cells with flag-nm23-H1 had significantly reduced lipocalin 2 promoter activity. In addition, stable nm23-H1 knockdown SiHa cancer cell lines increased lipocalin 2 protein and secreted lipocalin 2 levels in these cancer cells. When we transfect lipocalin 2 gene into SiHa cancer cells to establish lipocalin 2 overexpressing cancer cell lines #7 and #9, nm23-H1 protein expression was not significantly affected in these cancer cells. Thus, lipocalin 2 is suggested to be a downstream gene of nm23-H1. Our findings further showed that nm23-H1 knockdown or lipocalin 2 overexpressed SiHa cancer cells decreased cells migration and invasion. They displayed cobblestone-like appearance and decreased interior fibers. Cervical cancer patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 expression had the worst recurrence probability and overall survival. In conclusion, when nm23-H1 gene is knocked down in SiHa cervical cancer cells, cells migration and invasion decrease through elevated expression of lipocalin 2. Cervical cancer patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 should be followed and treated intensely.

英文關鍵詞： Human nonmetastatic clone 23 (nm23-1), lipocalin 2, SiHa cervical cancer cells, squamous cell carcinoma (SCC), metastatic phenotypes, metastasis, overall

survival

Nm23-H1 及其下游基因 lipocalin 2 於子宮頸癌上皮間質型
轉換之角色和轉移潛力及臨床病理因子之關係

Involvement of nm23-H1 and its downstream gene, lipocalin
2, in epithelial-to-mesenchymal transition, metastatic
potential and clinicopathologic variables in cancer of uterine
cervix

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 99 - 2314 - B- 040 - 011 - MY3

執行期間：99 年 8 月 1 日至 102 年 7 月 31 日

執行機構及系所：中山醫學大學醫學研究所

中文摘要：

我們發現阻斷 human nonmetastatic clone 23 Type 1 (nm23-H1) 表現會增加 lipocalin 2 表現。我們先將 SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因，以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷(knock down)，發現 lipocalin 2 之 mRNA 表現會增強。接著將 lipocalin 2 promoter 轉染(transfect)到經 nm23-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株(稱為 shnm23-H1 A 和 B 癌細胞株)，並使用 luciferase reporter assay 分析，發現 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義

之增加，因而其 mRNA 和蛋白之表現也跟著下降。當以經 flag-nm23-H1 轉染之 SiHa 子宮頸癌細胞株為正對照組(positive controls)時，發現這些癌細胞 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之下降。更進一步驗證了 nm23-H1 對 lipocalin 2 之影響，亦即 nm23-H1 會透過 lipocalin 2 promoter，減少 lipocalin 2 之活性，進而減少 lipocalin 2 mRNA 之表現。Nm23-H1 和 lipocalin 2 兩者或可應用於子宮頸癌細胞轉移型態之研究，包括移行和侵犯能力及細胞骨架之分析，我們藉由 Boyden

chamber 分析 SiHa 細胞轉移(migration)和侵犯(invasion)能力，也因 nm23-H1 經阻斷或 lipocalin 2 經轉染過度表現後而下降。並進一步探討對細胞骨架 (cellular cytoskeleton)之影響，這些 nm23-H1 阻斷後或 lipocalin 2 基因過度表現之癌細胞，會呈現卵鵝石狀的表徵，並減少內部纖維。我們並製造子宮頸組織晶片，發現子宮頸癌病人癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，其癌症復發的機會較高，且平均存活較差。研究價值為可利用子宮頸癌病人，其癌組織 nm23-H1 和 lipocalin 2 之免疫蛋白表現，來追蹤和治療病人。子宮頸癌病人其癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，需嚴謹追蹤，且加強放射治療或化學治療。本研究重要發現為，可以 nm23-H1 和 lipocalin 2 為目標，減少 nm23-H1 表現且加強 lipocalin 2 表現，發展出研究策略和標靶療法，改善子宮頸癌病人預後。

Key words: human nonmetastatic clone 23, lipocalin 2, SiHa 子宮頸癌細胞，鱗狀上皮子宮頸癌細胞，轉移型態，轉移，平均存活

英文摘要

When human nonmetastatic clone 23 (nm23-H1) gene was knocked down, expression of lipocalin 2 is elevated. Our preliminary study using cDNA genechip found that lipocalin 2 expression is affected by nm23-H1 and seems to be a significant downstream gene of nm23-H1 in SiHa cancer cells of uterine cervix. The objectives of this pioneer study are to investigate the expression and correlation of nm23-H1 and lipocalin 2 in metastatic phenotypes of

cancer cells including migration, invasion and cytoskeleton as well as their implication in recurrence and survival of cervical cancer patients.

Stable nm23-H1 knockdown SiHa cancer cells (shnm23-H1 A and B cancer cells) increased lipocalin 2 mRNA expression. When we transfected lipocalin 2 promoter to shnm23-H1 A and B cell lines and used luciferase reporter assay to analyze lipocalin 2 promoter activity, the activity was increased significantly. Thereafter, mRNA and protein expression of lipocalin 2 is reduced. In contrast, their positive control SiHa cells with flag-nm23-H1 had significantly reduced lipocalin 2 promoter activity. In addition, stable nm23-H1 knockdown SiHa cancer cell lines increased lipocalin 2 protein and secreted lipocalin 2 levels in these cancer cells. When we transfect lipocalin 2 gene into SiHa cancer cells to establish lipocalin 2 overexpressing cancer cell lines #7 and #9, nm23-H1 protein expression was not significantly affected in these cancer cells. Thus, lipocalin 2 is suggested to be a downstream gene of nm23-H1. Our findings further showed that nm23-H1 knockdown or lipocalin 2 overexpressed SiHa cancer cells decreased cells migration and invasion. They displayed cobblestone-like appearance and decreased interior fibers. Cervical cancer patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 expression had the worst recurrence probability and overall survival. In conclusion, when nm23-H1 gene is knocked down in SiHa cervical cancer cells, cells migration and invasion decrease through elevated expression of lipocalin 2. Cervical cancer patients with positive nm23-H1 and

negative lipocalin 2 should be followed and treated intensely.

Key words: Human nonmetastatic clone 23 (nm23-1), lipocalin 2, SiHa cervical cancer cells, squamous cell carcinoma (SCC), metastatic phenotypes, metastasis, overall survival

前言:

Nm23 (nonmetastatic clone 23 type 1) 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)。接著第二個 murine nm23 基因被發現，稱為 nm23-M2 (Rosengard et al, 1989)。

第一個被發現的人類 nm23，是由 Rosengard et al.於 1989 年發現，並命名為 human nonmetastatic clone 23 type 1 (nm23-H1) (Rosengard et al, 1989)。Nm23/NDP kinase 基因家族 (nm23/nucleotide diphosphate kinase family; nm23/NDP kinase family)區分出各具特色之兩大類(Lacombe et al, 2000)。第一類基因家族之蛋白產物於其他脊椎動物有高度同源類似物(homologous counterparts)，並具有 NDP kinase 之典型酵素活性，可以將 nucleoside diphosphates 磷酸化成 nucleoside triphosphates (Kimura et al, 1990; Wallet et al, 1990)。這類家族之蛋白包括

NDP kinases A-D (對應之基因為 nm23-H1 至 H4)，他們彼此有 58% 至 88% 相似度。第二類基因家族(nm23-H5 至 H8)之蛋白產物更分歧，因其氨基酸序列和第一類蛋白產物及彼此之間只有 25% 至 45% 相似度。在人類 nm23 同族基因當中，nm23-H1 基因是最早被發現及被視為最具代表性的(Urano et al, 1992)，且已經被認為和一些腫瘤轉移的控制有關[(Lombardi et al, 2000)。很多研究已經發現於乳癌、胃癌和黑色素細胞癌(melanoma)，nm23-H1 表現和癌症轉移潛力呈反比；亦即當 nm23-H1 表現下降時，會增加癌症轉移機會(Kantor et al, 1993; Torzewski et al, 1998)。相反地，甲狀腺之轉移癌，其 nm23-H1 之表現反而增強(Ferenc et al, 2004)。然而，於結腸癌裏，Myeroff LL 等人認為，結腸癌轉移病例中，nm23-H1 之表現是增強的(Myeroff & Markowitz, 1993)。

Nm23-H1 在很多癌症之轉移和存活有不同的角色，這種不同的關聯可能透過對其下游基因有不同的影響而產生。子宮頸癌(cancer of uterine cervix)是臺灣最常見之婦女癌症，我們之前曾使用 cDNA 基因晶片，於 SiHa 子宮頸癌細胞發現，lipocalin 2 基因之表現會受 nm23-H1 基因之影響，lipocalin 2 可能是 nm23-H1 有意義之下游基因。本篇先驅性論文之目的為，研究 nm23-H1 和 lipocalin 2 於 SiHa 子宮頸癌細胞表現之相關性，及兩者與子宮頸癌細胞轉移表徵(metastatic phenotypes)包括細胞移行和侵犯及 cytoskeleton 之關聯，並探討 nm23-H1 和 lipocalin 2 與子宮頸癌病人臨床病理因子、復發及存活之相關性。

研究目的:

本篇研究之目的為，研究 nm23-H1 和其可能之下由基因 lipocalin 2，於 SiHa 子宮頸癌細胞表現之相關性，及兩者與子宮頸癌細胞轉移表徵(metastatic phenotypes)包括移行和侵犯能力及 cytoskeleton 之關聯，並探討兩者與子宮頸癌病人臨床病理因子、復發及存活之相關性。

研究方法：

一. 細胞培養：

將HeLa(子宮頸癌細胞株)、SiHa(子宮頸癌細胞株)及293T(人類胚胎腎臟細胞)培養於Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)購於Invitrogen；並且包含 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Hyclone, SV30014.03)、Sodium bicarbonate (sigma, S4019)、L-glutamine (Sigma, G8540-25G)、penicillin (Sigma, P3032)/streptomycin (Sigma, S9137-25G)。

二.VSV-G pseudotyped lentivirus-shRNA system

(1) VZV-G psudotypred Lentivirus shRNA poduction

293T細胞 2.4×10^6 在10 cm培養皿上，取16 μ l jetPEI transfection reagent利用500 μ l NaCl稀釋；另外，取4 μ g shRNA plasmid【RNAi載體來自於中央研究院RNAi 核心設施, shRNA職體系菌株為shnm23-H1 (TRCN0000010061 and TRCN0000010062)和shLucTRCN0000072243】、0.4 μ g pMD.G以及4 μ g pCMV Δ R8.91並以500 μ l NaCl稀釋，接著將兩者混合，作用15~20分鐘後，加到293T細胞中，放置於P2實驗室的37 $^{\circ}$ C培養箱中，12個小時後，更換新鮮培養液，再於12小時後，收集舊的培養液，換置新鮮培養皿，舊的培養液含有來自細胞所釋放並且帶有shnm23-H1的VSV-G psudotypred Lentivirus，利用0.22 mm filter過濾培養液，去除受損細胞，接著將培養液分裝於冷凍小管中，存放於-80 $^{\circ}$ C冰箱。再經過12個小時後，收集第二次的病毒，同樣將培養液用0.22 mm filter過濾培養液，去除受損細胞，將培養液分裝於冷凍小管中，存放於-80 $^{\circ}$ C冰箱。剩餘含有細胞的培養皿，則加入漂白水，滅菌後

丟棄。以上實驗皆在P2實驗室中操作，所有碰過病毒的器材皆須過漂白水後再丟棄。

(2) 病毒濃度測定

細胞接種 5×10^3 在96孔盤上，隔夜後，加入不同量的病毒 (1、5、10、15、20、25 μ l)並以適量的新鮮培養液 (49、45、40、35、30、25 μ l) 進行稀釋，促使最終體積為50 μ l，同時在每個孔洞也加入0.5 μ l的0.8 μ g/ μ l protamine sulfate幫助病毒感染細胞。經過24小時後，每個孔洞加入100 μ l含有2 μ g/ml puromycin的新鮮培養液進行篩選，若有感染病毒的細胞則不會死亡，48小時後，加入適量的MTT，進行MTT assay，測細胞存活率，取存活率大約為60%的病毒濃度，做之後的實驗，因為當細胞存活率60%約等於MOI為1，此時含有shRNA的病毒引發的副作用為最低。以上實驗皆在P2實驗室中操作，所有碰過病毒的器材皆須過漂白水後再丟棄。

(3) Lentivirus shRNA infection of cell

接種Hela 和SiHa細胞 5×10^5 在6 cm培養皿上，隔夜後，加入病毒效價MOI \approx 1的病量，同時在每個孔洞也加入0.8 μ g/ μ l protamine sulfate幫助病毒感染細胞。經過24小時後，加入含有2 μ g/ml puromycin的新鮮培養液進行篩選，若有感染病毒的細胞則不會死亡，48小時後，收集蛋白，進行RT-PCR，以及西方點墨法，確認shRNA是否真的具有knockdown效果，以便進行基因knockdown實驗。病毒感染實驗皆在P2實驗室中操作，並且所有碰過病毒的器材皆須過漂白水後再丟棄。

三.反轉錄酶鏈聚合酶連鎖反應(RT-PCR)

(1) RNA純化：

移除舊培養液，加入 1 ml Rare RNA (GENEPURE TECHNOLOGY CO., Taichung, Taiwan.)之後上下搖晃均勻，放置室溫 5 分鐘。吸取液體至新的微量離心管，加入 300 μ l

的 chloroform (MERCK, 1.02445.2500) 劇烈振盪混合 20 秒，置於冰上 5 分鐘後，離心 13000 rpm，4°C，5 分鐘。吸取上清液並置換乾淨的 1.5 ml 微量離心管中，加入等體積的 isopropanol (Sigma I-9516) 振盪混合 20 秒，離心 13000 rpm，4°C，5 分鐘。倒掉上清液，再用 75% 酒精清洗一次，離心 13000 rpm，4°C，倒掉上清液，以 Speed Vacume 進行抽乾，約 5 分鐘。抽乾的 pellet 處理 30 μ l RNase-Free DNase (Promega) 37°C，作用 20 分鐘。接著補 RNase free ddH₂O 至 200 μ l，再加入 acid phenol (AMRESCO, 0981-400ml)/ chloroform (1:1) 200 μ l，vortex 20 秒，離心 13000 rpm，4°C，5 分鐘，小心拿，取上清液 180 μ l，加入等體積 Isopropanol，vortex 20 秒，離心 13000 rpm，4°C，5 分鐘，75% Alcohol 清洗，用真空乾燥 Dry 乾，溶 TE buffer 40 μ l。偵測在 260nm 與 280nm 波長下的比值，其比值應大於 1.8 以上，並取 2 μ g RNA 進行反轉錄反應作成 cDNA。其他的 RNA 儲存在 -80°C 冰箱中。

(2) cDNA 的合成 (RT-PCR) :

本實驗使用 promega RT-PCR kit 作反應。方法如下：取 2 μ g 的 total RNA 加熱 70°C、10 分鐘後隨即放置冰浴中冷卻，再加入 5 \times MMLV buffer 4 μ l，10mM dNTP Mixture 2 μ l，Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor 0.5 μ l，MMLV Reverse transcriptase 0.5 μ l，Oligo (dT)₁₅ Primer (0.5 μ g/ μ l) 1 μ l 及 Nuclease-Free Water 補至最終體積為 20 μ l。於 PCR 儀中進行下列反應：72°C、10 分鐘，42°C、90 分鐘，72°C、10 分鐘及 4°C 即合成 cDNA。可進行 PCR 反應，或儲存於 -20°C 冰箱中備用。

PCR (鏈聚合酶鏈鎖反應) :

β -actin primer 當內對照組 (internal control)，並加二次蒸餾水至 50 μ l，最後加入 0.5 μ l 的 Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94°C、5 分鐘；94°C、1 分鐘；55°C、1 分鐘；72°C、2 分鐘，上述條件進行 28 cycles、72°C 反應 10 分鐘，作用結束後取 10 μ l 進行 1.5% agarose gel 電泳分析。

Nm23-H1 forward primer :

5' -TGCTGCGAACCACGTGGGTCCCGG-3'，reverse primer :

5' -TCATTCATAGATCCAGTTCTGAGCA-3' 部份：取 1 μ l cDNA，加入 10 \times PCR buffer 5 μ l，2 μ l 的 10mM dNTPs，及各 2 μ l 的 10 pmole 引子 (，並加二次蒸餾水至 50 μ l，最後加入 0.5 μ l 的 Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94°C、5 分鐘；94°C、1 分鐘；60°C、1 分鐘；72°C、2 分鐘，上述條件進行 32 cycles、72°C 反應 10 分鐘，作用結束後取 10 μ l 進行 1.5% agarose gel 電泳分析。

E-cadherin forward primer :

5' -TGGAGAGACACTGCCAACTG-3'，reverse primer :

3' -AGGCTGTGCCTTCCTACAGA -5' 部份：取 1 μ l cDNA，加入 10 \times PCR buffer 5 μ l，2 μ l 的 10mM dNTPs，及各 2 μ l 的 10 pmole 引子 (，並加二次蒸餾水至 50 μ l，最後加入 0.5 μ l 的 Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94°C、5 分鐘；94°C、1 分鐘；60°C、1 分鐘；72°C、2 分鐘，上述條件進行 32 cycles、72°C 反應 10 分鐘，作用結束後取 10 μ l 進行 1.5% agarose gel 電泳分析。

LCN2

forward primer :

5' -GAGTTACCCTGGATTA AVGA-3'，reverse primer :

3' -CTCCTTAGTTCGAAGTCA -5' 取 1 μ l cDNA，加入 10 \times PCR buffer 5 μ l，2 μ l 的 10mM dNTPs，及各 2 μ l 的 10 pmole 引子 (，並加二次

蒸餾水至50 μ l，最後加入0.5 μ l的Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94 $^{\circ}$ C、5分鐘；94 $^{\circ}$ C、1分鐘；60 $^{\circ}$ C、1分鐘；72 $^{\circ}$ C、2分鐘，上述條件進行32 cycles、72 $^{\circ}$ C反應10分鐘，作用結束後取10 μ l進行1.5% agarose gel電泳分析。

MMP-2 forward primer :

5' -GGCCCTGTCACCTCCTGAGAT-3' ,
reverse primer :

3' -GGCATCCAGGTTATCGGGA -5'取1 μ l cDNA，加入10 \times PCR buffer 5 μ l，2 μ l的10mM dNTPs，及各2 μ l的10 pmole引子(，並加二次蒸餾水至50 μ l，最後加入0.5 μ l的Hi-Taq DNA polymerase (5 unit/ μ l)。反應條件：94 $^{\circ}$ C、5分鐘；94 $^{\circ}$ C、1分鐘；60 $^{\circ}$ C、1分鐘；72 $^{\circ}$ C、2分鐘，上述條件進行35 cycles、72 $^{\circ}$ C反應10分鐘，作用結束後取10 μ l進行1.5% agarose gel電泳分析。

四.西方點墨法(Western Blot)

取細胞以 5×10^5 數目種植至60 mm培養皿中，在37 $^{\circ}$ C細胞培養箱中培養16小時，經48小時後，將便可將細胞收下。先以PBS清洗二次，去除上清液加入100 μ l的細胞均質緩衝液使細胞溶解，置於冰上待全部樣品皆以製備完畢後再以超音波均質機在4 $^{\circ}$ C下將細胞完全打破，反覆兩次每次間隔10分鐘以上，之後再以4 $^{\circ}$ C離心機轉速為12000 rpm離心20分鐘，小心吸取上清液，存放置另一乾淨滅菌的1.5 ml微量離心管中並進行蛋白質定量。使用Bio-Rad protein assay (#500-0006)測蛋白濃度。接下來將樣品以SDS-聚丙烯醯胺板膠電泳法分析，並在電泳分析完畢前20分鐘，先準備一張大小相當的Hybond-P membrane (Pharmacia)，須用甲醇浸潤一下約15秒，改以二次水清洗10分鐘，再浸泡於transfer buffer中約10分鐘備用。將分析完畢的電泳片小心取下，在半乾式轉漬器：Hofer Semiphor Transfer上，依序

放上3張事先的浸好transfer buffer的3M濾紙和transfer buffer浸潤過的Hybond-P membrane，電泳片、另外3張浸好transfer buffer的3M濾紙，利用以半乾式轉漬法在電源供應器：Pharmacia Biotech power supply EPS 301，以每平方公分3 mA電流的條件下進行60分鐘，使膠上的蛋白質由負極往正極的方向轉移到Hybond-P membrane。將transfer好的Hybond-P membrane浸泡在含有5%脫脂奶粉的1倍TTBS buffer中，於室溫下shaking 1小時，進行blocking。將已blocking完成的Hybond-P membrane分別加入專一性的一級抗體。利用含有3%脫脂奶粉TTBS buffer稀釋下列一級多株(polyclonal)抗體:LCN2 (1:1000)(R&D, JBH03)，一級單株(monoclonal)抗體nm23-H1 (novocastra, clone 37.5)，一級單株(monoclonal)抗體E-cadherin(BD, clone 36)和一級單株(monoclonal)抗體 β -actin (AC-40, Sigma, Saint Louis, MI, USA)於4 $^{\circ}$ C下搖晃一個晚上(至少16小時)。隔天取出轉漬膜，一級抗體以1:100的比例加入2%的sodium azide作為防腐劑後可回收重複使用，接著以100 ml 3%脫脂奶粉之1倍TTBS buffer在室溫下清洗轉漬膜2次，每次10分鐘，再用100 ml的1倍TTBS buffer在相同條件下室溫清洗2次，每次10分鐘。再以3%脫脂奶粉之1倍TTBS buffer稀釋含有anti-goat IgG-HRP(1:5000, Cell Signaling #7074)和anti-mouse IgG-HRP (1:10000 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)的二級抗體於室溫下震盪作用1小時，重覆上述之清洗步驟。利用E.C.L.呈色劑，以1:1的方式加入Enhanced luminol reagent與Oxidizing reagent混合均勻，將membrane的正面朝下放入裝有呈色劑的盒子中作用5分鐘，以催化HRP呈色，並將螢光呈現在X-光底片上，曝光時間約3~5分鐘，再以顯影劑及定影劑將影像沖洗出。

五.Migration和invasion試驗

在博登細胞移行器(Boyden chamber, 真興) bottom chamber 置入20 μ l的10% FBS-DMEM培養液。並由下至上依序組裝bottom chamber、polycarbonate membranes (Neuro probe, 8 μ m or 12 μ m pore；於invasion試驗加

上 Matrigel) , 橡膠緩衝墊片和 upper chamber , 並鎖緊螺絲。細胞計數 4×10^5 cell/ml 混不含 FBS 之 DMEM 或 RPMI 每孔取 50 μ l 細胞液加入 upper chamber (每孔洞約有 2 萬顆細胞進行移行) , 培養於 5% CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 恆溫細胞培養箱。經 24 小時後, 取出 polycarbonate membranes , 以 95% 甲醇固定下層面細胞 10 分鐘, 在室溫下待乾, 再將下層面細胞以 10% GIEMSA stain 染色一個小時以上。二次水稍微沾濕試鏡紙刮除上層面細胞 (Marone et al, 1996) 。

六. 細胞骨架試驗 (Immunofluorescence and confocal microscopy for cytoskeleton of cervical cancer cell lines shnm23-H1 A, B and shLuc as well as lipocalin 2 overexpressing #7, #9 and pcDNA) 取約 2×10^5 nm23-H1 經阻斷之 shnm23-H1 A、B 或 lipocalin 2 經過度表現之 #7、#9 子宮頸癌細胞和其個別對照組癌細胞, 於室溫下, 接種並固定於 3.7% formaldehyde-phosphate buffer saline solution 10 分鐘, 這些癌細胞並經 0.1% Triton X-100 solution 滲透。爾後, 癌細胞以 Texas-red-x-phalloidin (0.2 μ g/ml) 和 Alexa Fluor 488 DNase I (9 μ g/ml) 共軛並偵測 F-actin (red) 及 G-actin (green) 90 分鐘, 最後, 這些癌細胞以 DAPI (1:1,000) 染色 45 分鐘。F-actin and G-actin 以 confocal laser scanning microscope 放大 630 倍顯像 (Zeiss LSM 510 META) 。

七. 100 位子宮頸癌病人依 nm23-H1 和 lipocalin 2 免疫組織蛋白表現分成四類, 評估其復發和存活情形

取 100 位子宮頸癌病人的組織製成子宮頸組織晶片。組織晶片以 anti-nm23-H1 (1:200 dilution; NM301 clone, mouse antihuman nm23-H1 monoclonal

antibody; Novocas-tra, Newcastle, UK) 或 antilipocalin 2 [1:200 dilution; LCN2 antibody-neutrophil gelatinase-associated lipocalin (LCN2), goat antihuman polyclonal antibody-LS-B2496; LifeSpan BioSciences] 染色, 其染色深度以 Pro Plus 6.2 image analysis program (Media Cybernetic, Inc., Silver Spring, MD) 計算。而子宮頸癌組織晶片之免疫反應之計分, 以癌細胞染色比率乘以染色深度得到 H score 表示。而後以 100 位子宮頸癌病人其組織晶片之 nm23-H1 和 lipocalin 2 之 H score 計分和子宮頸癌病人之臨床病理因子作相關性分析。最後, nm23-H1 和 lipocalin 2 之 H score 計分, 再和子宮頸癌病人之癌症復發及平均存活作相關性分析。

本研究經 Chung Shan Medical University Hospital Institutional Review Board 同意, 且每個病人都有簽同意書。

研究結果:

我們先將 SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因, 以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷 (knock down), 發現 lipocalin 2 之 mRNA 表現會增強。接著將 lipocalin 2 promoter 轉染 (transfect) 到經 nm23-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株 (稱為 shnm23-H1 A 和 B 癌細胞株), 並使用 luciferase reporter assay 分析, 發現 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之增加。當以經 flag-nm23-H1 轉染之 SiHa 子宮頸癌細胞株為正對照組 (positive controls) 時, 發現這些癌細胞 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之下降。更進一步驗證了 nm23-H1 對 lipocalin 2 之影響, 亦即 nm23-H1 會透過 lipocalin 2 promoter, 減少 lipocalin 2 之活性, 進而減少 lipocalin 2 mRNA 之表現。我們發現經 nm-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株, 癌細胞之 lipocalin 2 蛋白或其分泌出之 lipocalin 2 蛋白 (secreted

lipocalin 2)均增加。但是，當轉染 lipocalin 2 至 SiHa 癌細胞株時，癌細胞 nm23-H1 蛋白之表現並沒有受到影響，因此更確立 lipocalin 2 是受 nm23-H1 影響的。

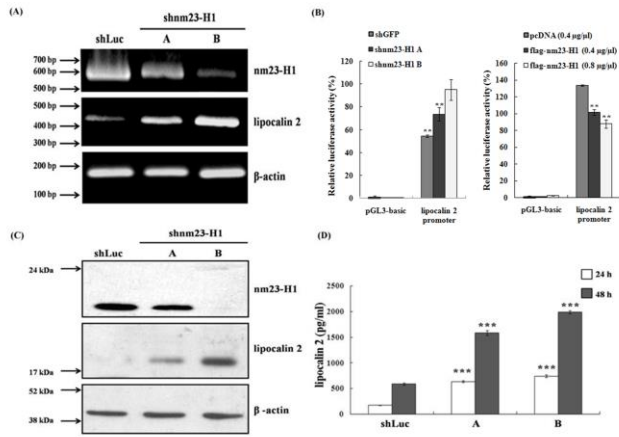


Figure 1. (A) Stable knockdown of *nm23-H1* increased *lipocalin 2* mRNA expression in SiHa cancer cells of uterine cervix. 5×10^5 SiHa cancer cells with *nm23-H1* knockdown by short hairpin RNA [shRNA (TRCN0000010061, TRCN0000010062)] or shLuc were seeded separately to harvest shnm23-H1 A, B and shLuc cancer cell lines. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detect mRNA expression in these cell lines. shLuc: negative control. *nm23-H1*: 556 base pairs (bp), *lipocalin 2*: 402 bp, β -actin: 154 bp. (B) Left, About 2×10^5 shnm23-H1 A and B or shGFP cells were seeded. pGL3-basic, *lipocalin 2* promoter and β -galactosidase reporter plasmids were transfected to these cancer cells and luciferase reporter assay was used to analyze activity of *lipocalin 2* promoter. shGFP: negative control. The shGFP cells had significantly lower luciferase activity than shnm23-H1 A and B cells ($p < 0.01$ and $p < 0.01$, respectively). Right, As positive controls for *nm23-H1* and transcription analysis to compare, the luciferase activity was measured in transiently cotransfected SiHa cells using *lipocalin 2* promoter and pcDNA (0.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) or flag-*nm23-H1* (0.4 or 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). The transcriptional activity of each reporter plasmid was normalized relative to β -galactosidase activity, and the activity in cells transfected

with pGL3 basic vector was set at 1.0. The activity decreased for SiHa cells with flag-*nm23-H1* (0.4 and 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; $P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively), as compared to pcDNA vector control cells. $**p < 0.01$. (C) Western blots were used to detect lipocalin 2 protein expression in shnm23-H1 A, B and shLuc cell lines. nm23-H1: 23 kilodalton (kDa), lipocalin 2: 25 kDa, β -actin: 42 kDa. (D) Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of secreted form lipocalin 2 from shnm23-H1 A (A bar) and B (B bar) and shLuc cancer cells. About 5×10^5 cancer cells of shLuc, shnm23-H1 A and B were seeded and cultured in 24 and 48 hours. Then, condition medium was collected. The shnm23-H1 A and shnm23-H1 B cells had significantly higher lipocalin 2 levels than shLuc cells. Virus titer = 1 multiplicity of infection. The bar data were presented as mean \pm SD of triplicate experiments. $***p < 0.001$. nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 type 1.

SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因，以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷(knock down)，癌細胞之移行和侵犯能力，均呈統計學上有意義的下降。

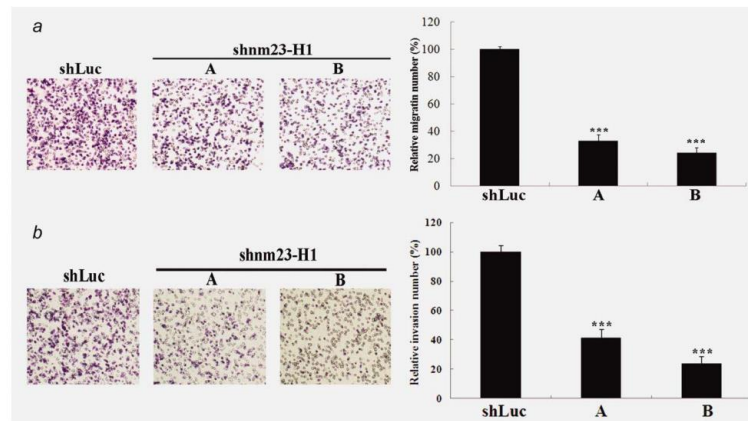


Figure 2. (a) Stable nm23-H1 knockdown decreased cells migration in SiHa cervical cancer cells. Ten percent FBS-DMEM was added to lower layer wells of Boyden chamber. About 2×10^4 SiHa cells with nm23-H1 knockdown by TRCN0000010061 (shnm23-H1 A cell line) and TRCN0000010062 (shnm23-H1 B cell line) or shLuc (shLuc cancer cell line) were suspended in $50 \mu\text{l}$ 0.1% FBS-DMEM. The shLuc cells had significantly higher migration ability than shnm23-H1 A ($p = 0.0003$) and shnm23-H1 B cells ($p < 0.001$). (b) The shLuc cells had

significantly higher invasion ability than shnm23-H1 A ($p = 0.0009$) and shnm23-H1 B cells ($p = 0.0009$). shLuc: negative control. Virus titer = 1 multiplicity of infection. Each bar represented the mean \pm 6 SD of triplicate experiments; $***p < 0.001$. nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 Type 1. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

當轉染 lipocalin 2 至 SiHa 子宮頸癌細胞株，建立 lipocalin 2 overexpressing #7 和 #9 子宮頸癌細胞株，nm23-H1 蛋白之表現並未受到影響。然而，lipocalin 2 overexpressing #7 和 #9 子宮頸癌細胞株，其移行和侵犯能力下降。所蒐集到分泌出之 condition media 含有 lipocalin 2 蛋白，會抑制癌細胞之移行。當加入 lipocalin 2 抗體至 condition media，癌細胞會恢復其移行能力。

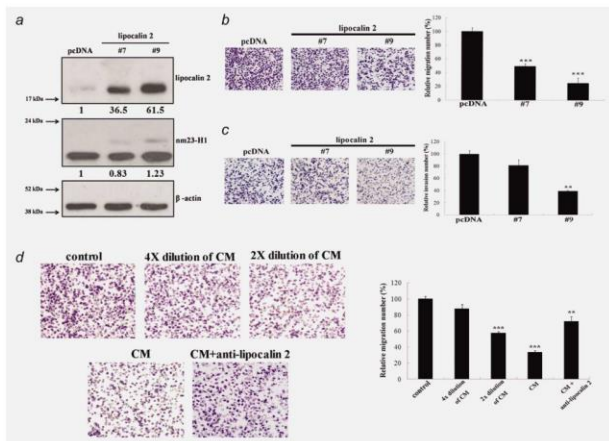


Figure 3. (a) lipocalin 2 overexpressing #7 and #9 cancer cells stably expressed lipocalin 2 but did not significantly affect nm23-H1 expression. About 5×10^5 SiHa cervical cancer cells with pcDNA or lipocalin 2 gene transfection were seeded. The software ImageJ (Broken Symmetry Software, 1.4.3.67, National Institute of Health) was used to quantify the band intensity of Western blot. The data showed the relative expression standardized by the β -actin protein level, and the ratio in cells with pcDNA was set at 1. nm23-H1: 23 kilodalton (kDa), lipocalin 2: 25 kDa, β -actin: 42 kDa. (b) Overexpression of

lipocalin 2 decreased migration of SiHa cancer cells. About 2×10^4 SiHa cells with pcDNA or lipocalin 2 transfection (#7 and #9) were suspended in 50 μ l 0.1% FBS-DMEM. The SiHa cells with pcDNA had significantly higher migration ability than #7 ($p = 0.0008$) and #9 ($p = 0.0006$) cells. (c) Overexpression of lipocalin 2 decreased invasion of SiHa cancer cells. The pcDNA cells had higher invasion ability than #7 ($p = 0.0858$) and #9 ($p = 0.0024$) cells. (d) CM with secreted lipocalin 2 decreased migration of SiHa cancer cells. CM, which contained secreted lipocalin 2 protein, was collected from SiHa cells with nm23-H1 knockdown (by shnm23-H1 TRCN0000010062). 10% FBS-DMEM, CM, 2 x and 4 x dilution of CM and CM with 20 ng/ml antilipocalin 2 were added to lower wells of Boyden chamber. The SiHa cells with no CM (as control) had significantly higher migration ability than those with 2 x dilution of CM ($p = 0.0005$) and those with CM ($p < 0.0001$). Moreover, when lipocalin 2 antibody was added to CM, SiHa cells restored their migration potential partially ($p = 0.0079$). pcDNA: SiHa cells with pcDNA transfection; as negative control. Virus titer = 1 multiplicity of infection. Each bar represented the mean \pm 6 SD of triplicate experiments; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$. nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 Type 1. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

SiHa 子宮頸癌細胞株以 pcDNA 或 shLuc 轉染時 (transfection) 時，細胞呈現延長的外觀 (elongated morphology) 和很多細胞質絲狀結構 (long filaments throughout the cytoplasm)。然而，SiHa 子宮頸癌細胞株以 shnm23-H1 轉染之 shnm23-H1 A 和 B 或以 lipocalin 2 轉染之 lipocalin 2 overexpressing #7 和 #9 子宮頸癌細胞株，則呈現鵝卵石狀外觀 (cobble-stone-like appearance) 和細胞質內在纖維減少 (decreased interior fibers) 的情形。

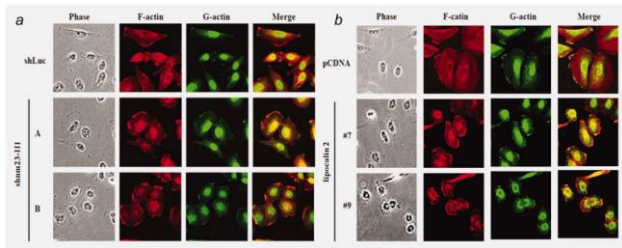


Figure 4. Nm23-H1 or lipocalin 2 effect morphology and filaments throughout the cytoplasm of SiHa cancer cells. Cancer cells about 2×10^5 were observed under confocal laser scanning microscope (Zeiss LSM 510 META) at 630 x magnifications for immunofluorescence. SiHa cells with shLuc (a) or pcDNA (b) displayed elongated morphology and had many long filaments throughout the cytoplasm. shnm23-H1 A, B (a) and lipocalin 2 overexpressing cell lines #7, #9 (b) cell lines had cobblestone-like appearance. Interior fibers were significantly decreased in these cancer cells. shnm23-H1 A and B cells: SiHa cervical cancer cells knocked down by shnm23 TRCN0000010061 and TRCN0000010062, respectively. #7 and #9 cells: SiHa cells with lipocalin 2 overexpression. nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 Type 1. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

100 位子宮頸癌病人，其癌組織晶片 nm23-H1 和 lipocalin 2 H scores 分別為 2 和 2。Lipocalin 2 在腺癌組織和深度基質侵犯的癌組織，H score 計分呈有統計學上有意義的下降。而 nm23-H1 之 H score 計分則在較深侵犯深度、較大腫瘤直徑、較不好的分化癌細胞，呈有統計學上有意義的上升。

Table 1. The correlation of lipocalin 2 and nm23-H1 immunoreactivities in 100 cancer tissue cores and clinicopathological variables of cancer of uterine cervix

Clinicopathological variables	Lipocalin 2		p value	Nm23-H1		p value
	(+)	(-)		(+)	(-)	
Stage			0.311			0.137
I	30	28		25	33	
II	26	16		12	30	
Pathologic type			0.009*			0.078
Squamous cell carcinoma	50	30		33	47	
Adenocarcinoma	6	14		4	16	
Depth of stromal invasion			0.005*			0.002*
>1/2 depth	21	29		26	24	
≤1/2 depth	35	15		11	39	
Tumor diameter			0.233			0.014*
>4 cm	23	13		19	17	
≤4 cm	33	31		18	46	
Cell differentiation			0.099			0.004*
Poor	5	9		10	4	
Well and moderate invasion	51	35		27	59	
Parametrium invasion			0.691			0.065
Invasion	17	15		16	16	
No invasion	39	29		21	47	
Vagina invasion			0.336			0.348
Invasion	13	14		12	15	
No invasion	43	30		25	48	
Pelvic lymph node metastasis			0.272			0.185
Positive	17	18		16	19	
Negative	39	26		21	44	

Statistical analysis: Chi-square test.

*Significant difference, $p < 0.05$. (+): positive immunoreactivity;

(-): negative immunoreactivity.

Nm23-H1: human nonmetastatic clone 23 Type 1.

單獨的 lipocalin 2 免疫組織表現並不能有意義的預測癌症復發，但和子宮頸癌病人存活則有顯著相關。而單獨的 nm23-H1 免疫組織表現，則可以預測病人的平均存活。混和應用 lipocalin 2 和 nm23-H1，則可以預測子宮頸癌病人之癌症復發和平均存活。當病人癌組織 nm23-H1 呈陽性而 lipocalin 2 呈陰性免疫組織蛋白表現時，病人有最差的復發和存活。

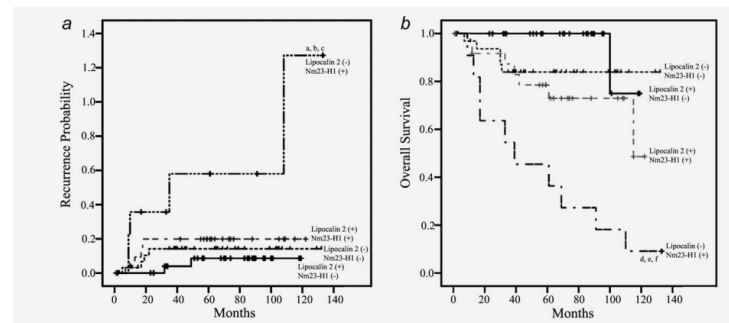


Figure 5. Kaplan-Meier curves for recurrence probability and overall survival in 100 patients with cancer of uterine cervix according to nm23-H1 and lipocalin 2 immunoreactivities. There were significantly different recurrence probability and overall survival among different subgroups of cervical cancer patients according to nm23-H1 and lipocalin 2 expression ($p = 0.009$, $p < 0.001$, respectively; Figs. 5a and 5b).

a,d,b,e,c,f Significant difference or trend of recurrence probability and overall survival existed between patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 expression and those with negative nm23-H1 and positive lipocalin 2 expression (^a $p = 0.0034$, ^d $p < 0.001$); between patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 expression and those with negative nm23-H1 and lipocalin 2 expression (^b $p = 0.0169$, ^e $p = 0.0001$); between patients with positive nm23-H1 and negative lipocalin 2 expression and those with positive nm23-H1 and lipocalin 2 expression (^c $p = 0.0602$, ^f $p = 0.0043$). Log-rank test was used for statistical significance. Nm23-H1, human nonmetastatic clone 23 Type 1.

討論:

我們先將 SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因，以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷(knock down)，發現 lipocalin 2 之 mRNA 表現會增強。接著將 lipocalin 2 promoter 轉染(transfect)到經 nm23-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株(稱為 shnm23-H1 A 和 B 癌細胞株)，並使用 luciferase reporter assay 分析，發現 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之增加。當以經 flag-nm23-H1 轉染之 SiHa 子宮頸癌細胞株為正對照組(positive controls)時，發現這些癌細胞 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之下降。更進一步驗證了 nm23-H1 對 lipocalin 2 之影響，亦即 nm23-H1 會透過 lipocalin 2 promoter，減少 lipocalin 2 之活性，進而減少 lipocalin 2 mRNA 之表現。我們發現經 nm-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株，癌細胞之 lipocalin 2 蛋白或其分泌出之 lipocalin 2 蛋白 (secreted lipocalin 2) 均增加。但是，當轉染 lipocalin 2 至 SiHa 癌細胞株時，癌細胞 nm23-H1 蛋白之表現並沒有受到影響，因

此更確立 lipocalin 2 是受 nm23-H1 影響的。

我們進一步發現，經 nm23-H1 阻斷或經 lipocalin 2 轉染之子宮頸癌細胞，其移行和侵犯能力下降，細胞骨架並會呈現鵝卵石狀的表徵，並減少內部纖維。我們並製造子宮頸組織晶片，發現子宮頸癌病人癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，其癌症復發的機會較高，且平均存活較差。研究價值為可利用子宮頸癌病人，其癌組織 nm23-H1 和 lipocalin 2 之免疫蛋白表現，來追蹤和治療病人。子宮頸癌病人其癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，需嚴謹追蹤，且加強放射治療或化學治療。

在 nm23-H1 呈陽性表現之癌細胞株，Cowland 等人發現 lipocalin 2 之增加表現，可能經由 interleukin 1 β 、NF- κ B、C/EBP-1/NFY, C/EBP-2, AP-1, TATA 等潛在上游誘發因子 (potential upstream inducers)，於其上游誘發而來。此外，nm23-H1 含有很多和已知的轉錄調節蛋白 (transcriptional regulatory proteins；AP-1, CTF/NF1, ACAAAG and Ets) 可以鍵結的序列(sequence)。AP-1 和 CTF/NF1 因子的存在，被 Chen 等人證實是 nm23-H1 啟動子活性(promoter activity)之基本要素。因而，AP-1 是在 nm23-H1 陽性且 lipocalin 2 陰性表現之細胞，lipocalin 2 表現之潛在上游誘發因子。

總結來說，本研究重要發現為，可以 nm23-H1 和 lipocalin 2 為目標，減少 nm23-H1 表現且加強 lipocalin 2 表現，發展出治療策略和標靶療法，改善子宮頸癌病人預後。

誌謝:

感謝國科會 NSC 99 - 2314 - B - 040 - 011 - MY3 計劃提供此研究經費。

發表論文:

Wang PH, Yang SF, Tseng CJ, Ying TH, Ko JL, Lin LY. The role of lipocalin 2 and its concernment with human nonmetastatic clone 23 type 1 and p53 in carcinogenesis of uterine cervix. *Reprod Sci*. 2011 May;18(5):447-55.

Wang PH, Ko JL, Yang SF, Lin LY. Implication of human nonmetastatic clone 23 Type 1 and its downstream gene lipocalin 2 in metastasis and patient's survival of cancer of uterine cervix. *Int J Cancer*. 2011 Nov 15;129(10):2380-9.

Tee YT, Liu YF, Chang JT, Yang SF, Chen SC, Han CP, **Wang PH**^{*}, Liao CL. Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of membrane type 1-matrix metalloproteinase in susceptibility and clinical significance of squamous cell neoplasia of uterine cervix in Taiwan women. *Reprod Sci*. 2012 Sep;19(9):932-8.

參考文獻

Bosnar MH, Bago R, Gall-Troselj K, Streichert T, Pavelic J (2006) Downstream Targets of Nm23-H1: gene expression profiling of CAL 27 cells using DNA microarray. *Mol Carcinog* 45:627-633.

Che GW, Zhou QH, Zhu W, Wang YP, Qin Y, Liu LX, Chen XH, Sun YL, Sun ZF (2005) [Molecular mechanism of reversing metastatic phenotype in human high-metastatic large cell lung cancer cell line L9981 by nm23-H1]. *Ai Zheng* 24(3): 278-284

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(7): 327-332

Ferenc T, Lewinski A, Lange D, Niewiadomska H, Sygut J, Sporny S, Wloch J, Salacinska-Los E, Kulig A, Jarzab B (2004) Analysis of nm23-H1 protein immunoreactivity in follicular thyroid tumors. *Pol J Pathol* 55(4): 149-153

Fuller AF, Jr., Elliott N, Kosloff C, Hoskins WJ, Lewis JL, Jr. (1989) Determinants of increased risk for recurrence in patients undergoing radical hysterectomy for stage IB and IIA carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 33(1): 34-39

Hanai J, Mammoto T, Seth P, Mori K, Karumanchi SA, Barasch J, Sukhatme VP (2005) Lipocalin 2 diminishes invasiveness and metastasis of Ras-transformed cells. *J Biol Chem* 280(14): 13641-13647

Hu L, Hittelman W, Lu T, Ji P, Arlinghaus R, Shmulevich I, Hamilton SR, Zhang W (2009) NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells. *Lab Invest* 89(5): 531-548

Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR (1993) Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res* 53(9): 1971-1973

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**(26): 15744-15749

Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG (1996) Evaluation of the prognostic significance of nm23/NDP kinase protein expression in cervical carcinoma: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* **61**(3): 378-383

Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO (2000) The human Nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* **32**(3): 247-258

Lee HJ, Lee EK, Lee KJ, Hong SW, Yoon Y, Kim JS. Ectopic expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin suppresses the invasion and liver metastasis of colon cancer cells. *Int J Cancer* 2006;118:2490-7.

Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG (2000) nm23: unraveling its biological function in cell differentiation. *J Cell Physiol* **182**(2): 144-149

Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Mori T, Fukumoto M (1995) Altered expression of nm23-H1 and c-erbB-2 proteins have prognostic significance in adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Cancer* **75**(10): 2523-2529

Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, Iacovella S, Leone A, Mancuso S (1996) Nm23 expression in endometrial and cervical

cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br J Cancer* **74**(7): 1063-1068

Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9: 446-54.

Myeroff LL, Markowitz SD (1993) Increased nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA expression and absence of mutations in colon carcinomas of low and high metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* **85**(2): 147-152

Ohba K, Miyata Y, Koga S, Kanda S, Kanetake H (2005) Expression of nm23-H1 gene product in sarcomatous cancer cells of renal cell carcinoma: correlation with tumor stage and expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, sialyl Lewis X, and c-erbB-2. *Urology* **65**(5): 1029-1034

Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2008;112:453-65.

Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IM, King CR, Liotta LA, Steeg PS (1989) Reduced Nm23/Awd protein in tumour metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* **342**(6246): 177-180

Shah S, Pishvaian MJ, Easwaran V, Brown PH, Byers SW (2002) The role of cadherin, beta-catenin, and AP-1 in retinoid-regulated carcinoma cell differentiation and proliferation.

J Biol Chem **277**(28): 25313-25322

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**(22): 6550-6554

Tammenkoski M, Koivula K, Cusanelli E, Zollo M, Steegborn C, Baykov AA, Lahti R (2008) Human metastasis regulator protein H-prune is a short-chain exopolyphosphatase. *Biochemistry* **47**(36): 9707-9713

Tong Z, Kunnumakkara AB, Wang H, Matsuo Y, Diagaradjane P, Harikumar KB, Ramachandran V, Sung B, Chakraborty A, Bresalier RS, Logsdon C, Aggarwal BB, Krishnan S, Guha S (2008) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel suppressor of invasion and angiogenesis in pancreatic cancer. *Cancer Res* **68**(15): 6100-6108

Torzewski M, Klouche M, Hock J, Messner M, Dorweiler B, Torzewski J, Gabbert HE, Bhakdi S (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(3): 369-378

Urano T, Takamiya K, Furukawa K, Shiku H (1992) Molecular cloning and functional expression of the second mouse nm23/NDP

kinase gene, nm23-M2. *FEBS Lett* **309**(3): 358-362

Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe ML (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**(14): 1199-1202

Wang PH, Chang H, Ko JL, Lin LY (2003) Nm23-H1 immunohistochemical expression in multisteps of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* **13**(3): 325-330

Yang J, Bielenberg DR, Rodig SJ, Doiron R, Clifton MC, Kung AL, Strong RK, Zurakowski D, Moses MA (2009) Lipocalin 2 promotes breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 3913-3918

Cowland JB, Sørensen OE, Sehested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol* 2003;171:6630-9.

de la Rosa, Mikhak B, Steeg PS. Identification and characterization of the promoter for the human metastasis suppressor gene nm23-H1. *Arch Med Res* 1996;27:395-401.

Chen HC, Wang L, Banerjee S. Isolation and characterization of the promoter region of human nm23-H1, a metastasis suppressor gene. *Oncogene* 1994;9:2905-12.

無研發成果推廣資料

99 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：99-2314-B-040-011-MY3					
計畫名稱：nm23-H1 及其下游基因 lipocalin 2 於子宮頸癌上皮間質型轉換之角色和轉移潛力及臨床病理因子之關係							
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	1	0	100%	人次	
		博士生	1	0	100%		
		博士後研究員	0	0	100%		
		專任助理	1	1	100%		
國外	論文著作	期刊論文	3	2	150%	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	0%		

<p>其他成果 (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>	<p>子宮頸癌病人癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，其癌症復發的機會較高，且平均存活較差。研究價值為可利用子宮頸癌病人，其癌組織 nm23-H1 和 lipocalin 2 之免疫蛋白表現，來追蹤和治療病人。子宮頸癌病人其癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，需嚴謹追蹤，且加強放射治療或化學治療。本研究影響為可以 nm23-H1 和 lipocalin 2 為目標，減少 nm23-H1 表現且加強 lipocalin 2 表現，發展出研究策略和標靶療法，改善子宮頸癌病人預後。</p> <p>發表論文：</p> <p>Wang PH, Yang SF, Tseng CJ, Ying TH, Ko JL, Lin LY. The role of lipocalin 2 and its concernment with human nonmetastatic clone 23 type 1 and p53 in carcinogenesis of uterine cervix. <i>Reprod Sci.</i> 2011 May ; 18(5):447-55.</p> <p>Wang PH, Ko JL, Yang SF, Lin LY. Implication of human nonmetastatic clone 23 Type 1 and its downstream gene lipocalin 2 in metastasis and patient's survival of cancer of uterine cervix. <i>Int J Cancer.</i> 2011 Nov 15 ; 129(10):2380-9.</p> <p>Tee YT, Liu YF, Chang JT, Yang SF, Chen SC, Han CP, Wang PH*, Liao CL. Single-nucleotide polymorphisms and haplotypes of membrane type 1-matrix metalloproteinase in susceptibility and clinical significance of squamous cell neoplasia of uterine cervix in Taiwan women. <i>Reprod Sci.</i> 2012 Sep ; 19(9):932-8.</p>
--	--

	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）

我們先將 SiHa 子宮頸癌細胞株之 nm23-H1 基因，以 short harpin RNA (shRNA) 阻斷 (knock down)，發現 lipocalin 2 之 mRNA 表現會增強。接著將 lipocalin 2 promoter 轉染 (transfect) 到經 nm23-H1 基因阻斷之 SiHa 癌細胞株（稱為 shnm23-H1 A 和 B 癌細胞株），並使用 luciferase reporter assay 分析，發現 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之增加，而 lipocalin 2 之 mRNA 及蛋白表現接著亦上升。當以經 flag-nm23-H1 轉染之 SiHa 子宮頸癌細胞株為正對照組 (positive controls) 時，發現這些癌細胞 lipocalin 2 promoter 之活性在統計學上呈現有意義之下降。更進一步驗證了 nm23-H1 對 lipocalin 2 之影響，亦即 nm23-H1 會透過 lipocalin 2 promoter，減少 lipocalin 2 之活性，進而減少 lipocalin 2 mRNA 之表現。我們進一步發現，經 nm23-H1 阻斷或經 lipocalin 2 轉染之子宮頸癌細胞，其移行和侵犯能力下降，細胞骨架並會呈現鵝卵石狀的表徵，並減少內部纖維。我們並製造子宮頸組織晶片，發現子宮頸癌病人癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，其癌症復發的機會較高，且平均存活較差。研究價值為可利用子宮頸癌病人，其癌組織 nm23-H1 和 lipocalin 2 之免疫蛋白表現，來追蹤和治療病人。子宮頸癌病人其癌組織呈陽性 nm23-H1 和陰性 lipocalin 2 免疫組織表現者，需嚴謹追蹤，且加強放射治療或化學治療。本研究影響為可以 nm23-H1 和 lipocalin 2 為目標，減少 nm23-H1 表現且加強 lipocalin 2 表現，發展出研究策略和標靶療法，改善子宮頸癌病人預後。

