

# 目錄

授權書

國科會授權書

口試委員簽名單

指導教授簽名單

目錄-----	1
誌謝-----	7
英文摘要-----	8
中文摘要-----	10
第一章緒論-----	12
1.1 Nm23/nucleoside diphosphate kinase 之發現-----	12
1.2 人類 nm23 基因家族-----	13
1.3 人類 nm23 基因家族的作用-----	15
1.4 子宮頸上皮內贅瘤-----	16
1.5 Nm23-H1 於多種癌症之表現-----	17
1.6 Nm23-H1 和子宮頸癌化及子宮頸癌臨床病理因子關係之探討--	18
第二章 材料與方法-----	20
2.1 樣本及材料-----	20
2.2 免疫組織化學染色-----	21

2.3 重要試劑配製-----	22
2.4 實驗步驟-----	23
2.5 免疫組織化學染色之判讀-----	26
2.6 統計分析-----	27
第三章 結果-----	28
3.1 正常子宮頸 nm23-H1 蛋白之表現-----	28
3.2 低度和高度子宮頸鱗狀上皮內病變及癌組織 nm23-H1 蛋白表現	28
3.3 Nm23-H1 蛋白在正常子宮頸、低度和高度子宮頸鱗狀上皮內病變 及癌組織表現趨勢-----	29
3.4 本研究子宮頸鱗狀上皮癌病例其組織 nm23-H1 蛋白之表現和臨床 病理特徵之關係-----	30
第四章 討論-----	31
參考文獻-----	41
圖 一~十一-----	55
表 一~三-----	66
表一 Nm23-H1 蛋白在子宮頸正常鱗狀上皮、低度和高度鱗狀上皮 內病變及癌組織的免疫組織化學表現情形-----	66
表二 Nm23-H1 蛋白在子宮頸癌不同組織型態的免疫組織化學表現 情形-----	67

表三	早期子宮頸鱗狀上皮癌病例 nm23-H1 免疫反應和臨床病理特 徵之關係-----	68
附錄	-----	69
附圖 一	人類 Nm23/NDP kinase 蛋白家族 NDP kinase 部分主要結 構之比較 (Reference 13) -----	69
附圖二	人類 nm23/NDP kinase 基因家族系統圖 (Reference 13)---	70
附表 一	人類 nm23/NDP kinase 家族-----	71
已出版論文	-----	72
1.	Wang PH, Ko JL, Chang H, Lin LY. Clinical significance of high nm23-H1 expression in intraepithelial neoplasia and early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. <i>Gynecol Obstet Invest</i> 2003;55:14-19.-----	72
2.	Wang PH, Chang H, Ko JL, Lin LY. Nm23-H1 immunohistochemical expression in multisteps of cervical carcinogenesis. <i>Int J Gynecol</i> <i>Cancer</i> 2003;13:325-330.-----	73

## Tables of Contents

CHAPTER I Introduction-----	12
1.1 Discovery of nm23/NDPkinases-----	12
1.2 Human nm23/NDP kinases family-----	13
1.3 Functions of human nm23/NDPkinases-----	15
1.4 Cervical intraepithelial neoplasia-----	16
1.5 Nm23-H1 expression in various tumors-----	17
1.6 Relationships between nm23-H1 and carcinogenesis of uterine cervix; and clinicopathological variables for cervical cancer-----	18
CHAPTER II Materials and Methods-----	20
2.1 Samples and materials-----	20
2.2 Immunohistochemistry-----	21
2.3 Preparation of important solvents-----	22
2.4 Laboratory procedure-----	23
2.5 Interpretation of immunohistochemical staining-----	26
2.6 Statistical analysis-----	27
CHAPTER III Results-----	28
3.1 Nm23-H1 expression in normal uterine cervix-----	28
3.2 Nm23-H1 expression in low- and high-grade squamous	

intraepithelial lesions and carcinoma tissues of uterine cervix-----	28
3.3 The trend for nm23-H1 expression in normal, low- and high-grade squamous intraepithelial lesions and carcinoma tissues of uterine cervix-----	29
3.4 Relationships between nm23-H1 expression and clinicopathological characteristics for our cervical cancer cases-----	30
CHAPTER IV Discussion-----	31
REFERENCES-----	41
ILLUSTRATIONS: 1-11-----	55
TABLES: 1-3-----	66
APPENDIX-----	69
Figure 1. Primary sequence comparison between the NDP kinase domains of the human Nm23/NDP kinase proteins.-----	69
Figure 2. Phylogenetic tree for the isoforms of the human nm23/NDP kinase gene family.-----	70
Table 1. Human nm23/NDP kinase family-----	71
Published papers-----	72
1. Wang PH, Ko JL, Chang H, Lin LY. Clinical significance of high nm23-H1 expression in intraepithelial neoplasia and early-stage	

squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest*

2003;55:14-19.-----72

2. Wang PH, Chang H, Ko JL, Lin LY. Nm23-H1 immunohistochemical

expression in multisteps of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol*

*Cancer* 2003;13:325-330.-----73

## 誌謝

在這段日子裏，對我而言是充實又有意義的，除了吸收很多醫學知識外，也學習到很多流行病學和生物統計學的知識，包括研究之設計和統計方法。很幸運地，我又有機會鑽研高深的分子生物學知識，並且學習到如何從事醫學研究以及論文的撰寫。從如何尋找研究題材，提出假說和擬定研究主旨，選擇適當的實驗方法和統計分析，到找出有意義的結論，都得到完整又紮實的訓練。

特別感謝我的指導老師，林隆堯教授及實驗指導老師，柯俊良副教授不懈的教誨。並感謝周明智教授、洪耀欽副教授、鄭如茜副教授、趙世晃副教授及劉復興副教授的論文指導。另外，感謝毒理所所長，李輝教授、林嬪嬪教授、許國堂老師、吳文俊老師及蔡菁華老師，提供實驗上的指導；還有我實驗室這一群可愛可親的好伙伴，翁茂文、廖建皇、吳松鎔、黃玉儒及王宗煥提供實驗上的協助，讓我的研究能順利完成。

最後，感謝我的妻子，靈芝，兒女，俊皓、靖旻及馨霏，由於他們的鼓勵和支持，並在我遇到困難、挫折，正處於低潮煩悶時，帶來歡樂，我才能堅持下去，完成我的研究。

## Abstract

To evaluate the expression of nm23-H1 protein in normal, precancerous and cancerous tissues of the uterine cervix and its role in cervical carcinogenesis, 86 cervical specimens, including 30 squamous cell carcinomas (SCC), 3 adenocarcinomas, one clear cell carcinoma; 19 high- and 13 low-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs and LSILs) and 20 normal samples, were stained using an immunohistochemical method with streptavidin-biotin peroxidase immunostaining. Among the 30 SCC cases, the relationships between immunohistochemical expression of nm23-H1 and various clinicopathological characteristics for early-stage cervical cancer were evaluated. The cumulative recurrence hazard of these patients were also assessed. The Chi-square and Fisher's exact tests, as well as Chi-square test for trends, were used for comparing nm23-H1 expression among normal, LSIL, HSIL and cancerous tissues. Fisher's exact test was also used to determine the relationship between nm23-H1 immunoreactivity and the clinicopathologic variables, such as age ( $\geq 50$  or  $< 50$  years old), grade of differentiation (well, moderate or poorly differentiated), depth of stromal invasion ( $\geq 1/2$  or  $< 1/2$  of stromal depth), and metastatic status



(lymph nodal, parametrial or vaginal variants). Subjects were further subdivided into low and high nm23-H1 expression groups, and Kaplan-Meier curves were used to plot the cumulative recurrence hazard. The log-rank test was then used to compare the recurrence distributions for different nm23-H1 expression groups over time. There were significant differences in levels of nm23-H1 expression between LSIL and HSIL ( $P = 0.016$ ) and between LSIL and SCC ( $P = 0.002$ ), but not between HSIL and SCC or normal and LSIL samples. Furthermore, a positive relationship was demonstrated for high nm23-H1 protein expression and degree of malignant transformation ( $P < 0.05$ ). Among various clinicopathological characteristics, only deep stromal invasion ( $\geq 1/2$  of stromal depth) was significantly associated with high nm23-H1 expression. Moreover, a high cumulative recurrence hazard was demonstrated for the high nm23-H1 expression group. In conclusion, high nm23-H1 expression may induce the cellular proliferation for the progression from low to high-grade intraepithelial lesions, with the subsequent emergence of invasive carcinoma, as well as deep stromal invasion and be used as a prognostic indicator.

## 摘要

本篇論文研究目的為評估 nm23-H1 蛋白於子宮頸正常、癌前和癌組織之表現情形，以及其在子宮頸癌化過程中所扮演的角色。總共蒐集 86 個子宮頸病理樣本，包括 30 個子宮頸鱗狀上皮癌 (squamous cell carcinoma; SCC)、3 個腺癌 (adenocarcinoma)、1 個明亮細胞癌 (clear cell carcinoma)、19 個高度和 13 個低度子宮頸鱗狀上皮內病變 (high-grade and low-grade squamous intraepithelial lesions; HSILs and LSILs) 暨 20 個正常子宮頸檢體。這些檢體用免疫組織化學法，並以 streptavidin-biotin peroxidase 方式行免疫染色。更進一步，對其中 30 個子宮頸鱗狀上皮癌病例，探討 nm23-H1 蛋白表現和癌症病人臨床病理特徵之關係。此外，並評估這些病人之累計復發危險性 (cumulative recurrence hazard)。

以卡方試驗 (Chi-square test)、Fisher's exact 試驗及卡方趨勢檢定 (Chi-square test for trend) 比較 nm23-H1 蛋白在子宮頸正常、低度和高度鱗狀上皮內病變及癌組織之表現情形。以 Fisher's exact 試驗評估 nm23-H1 蛋白表現和癌症病人臨床病理特徵之關係。這些臨床病理特徵包括年齡 (大於等於或小於 50 歲)、分化層級 (分化好、中等或不好)、基質侵犯深度 (大於等於或小於基質 1/2 侵犯深度) 及癌症轉移

情形 (淋巴、子宮旁或陰道轉移)。再將癌症病人依 nm23-H1 蛋白表現高低分成兩組，並畫出累計復發危險性之 Kaplan-Meier 曲線，且以 long-rank 試驗比較 nm23-H1 蛋白表現高和低兩組隨著時間其復發分佈 (recurrence distributions) 之差異。

結果發現，有統計差異之 nm23-H1 蛋白表現，出現於低度和高度子宮頸鱗狀上皮內病變檢體之間 ( $P = 0.016$ ) 以及低度子宮頸鱗狀上皮內病變和子宮頸鱗狀上皮癌檢體之間 ( $P = 0.002$ )，然而 nm23-H1 蛋白之表現於高度子宮頸鱗狀上皮內病變和子宮頸鱗狀上皮癌檢體之間以及正常子宮頸和低度子宮頸鱗狀上皮內病變檢體之間則未有統計上的差異。更進一步發現，子宮頸病變愈厲害，nm23-H1 蛋白有表現愈高的趨勢 ( $P < 0.05$ )。而於眾多臨床病理特徵當中，只有大於等於基質 1/2 侵犯深度和 nm23-H1 蛋白之高度表現呈現統計學上有意義的關連 ( $P = 0.003$ )。甚且，nm23-H1 蛋白高度表現之組別，有較高之累計復發危險性。

總而言之，nm23-H1 蛋白之高度表現可以誘導細胞增殖 (cellular proliferation)，而由低度進展至高度子宮頸鱗狀上皮內病變，並演變成子宮頸鱗狀上皮癌且和癌症基質深度侵犯有關；nm23-H1 蛋白並且可以作為癌症預後之標記。

## 緒論

### 一、 Nm23/nucleoside diphosphate kinase 之發現

Nucleoside diphosphate (NDP) kinase 最早由 Berg P 和 Joklik WK 於酵母菌 (yeast) [1] 以及 Krebs HA 和 Hems R 於鴿子乳房肌肉 (pigeon breast muscle) [2] 發現。在人類紅血球和其他哺乳動物組織，可以發現 NDP kinase 電泳圖 (electrophoretic profiles) 很複雜，而懷疑有多種同位酵素 (isozymes) 存在 [3, 4]。1990 年 Kimura 等人根據老鼠，對 NDP kinase 之主要結構 (primary structures) 作過描述 [5]；Wallet 等人接著發現了兩種更早就被發現的調節基因之產物就是 NDP kinases [6]。這兩種更早就被發現的基因就是：(一) *nm23* 基因，牽涉到哺乳動物腫瘤惡性度 [7, 8]。(二) *awd* (abnormal wing disc) 基因，對於果蠅 (*Drosophila*) 的胚胎發展 (development) 很重要 [9, 10]。

Nm23 基因最早由 Steeg PS 所發現 [7]，他利用 differential colony hybridization 的技術 [11]，分析七株具有不同轉移能力的老鼠黑色素細胞癌細胞株 (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 之 RNA 表現量的十倍以上，而這個 clone 的號碼正好是

23 號，故稱所發現的這個基因為 nonmetastatic clone #23，簡稱 nm23 基因。接著，第二個老鼠基因 nm23 亦被發現 [12]，稱為 nm23-M2；而人類之八種 nm23 基因 (nm23-H1 至 nm23-H8) 亦陸續被發現。

## 二、人類 nm23 基因家族

由 Nm23 基因轉錄、轉譯之蛋白相當於果蠅 (*Drosophila*) 不正常翼板 (abnormal wing disc; *awd*) 之發展基因所轉錄、轉譯之蛋白，且相當於 nucleoside diphosphate (NDP) kinase，可以將 nucleoside diphosphates 磷酸化成 nucleoside triphosphates [5, 6]。截至目前為止，約有超過七十種和 NDP kinases 相對應之 cDNA 序列存於很多生物體，彼此之間並有相當的保留性 (conservation) [13]。在人類 nm23 同族基因當中，nm23-H1 基因是最早發現及被視為最具代表性的 [8]。人類第一種 nm23 cDNA 是由 Rosengard 等人藉篩檢纖維母細胞 cDNA 圖庫 (fibroblast cDNA library) 分離出的 [8]。第二種人類 nm23 基因，nm23-H2 基因，則是因和 nm23-H1 基因有高度同源性 (high homology) 而被鑑別出；且其蛋白產物和 nm23-H1 基因之蛋白產物有 88% 是相同的 [14]。Nm23-H1 和 nm23-H2 基因之蛋白產物分別和人類 NDP kinase A 及 NDP kinase B 相同 [15]。Nm23-H1 已經被認為和一些腫瘤轉移的控制有關，而 nm23-H2 則可能和腫瘤轉移的控制

有關，但尚未被確立。Nm23-H3 基因 (又稱為 DR-nm23) 是從慢性骨髓白血病細胞 (chronic myelogenous leukemia cells), 藉 cDNA 圖庫鑑別篩檢 (differential screening of a cDNA library) 發現 [16]。另外 5 種人類基因 nm23-H4 至 nm23-H8 則因在研究人類 nm23 基因的同源性序列(homologous sequences) 而陸續被發現 [17-20]。Nm23-H5 和 nm23-H6 是由 p53 誘導細胞凋亡的功能互補 (functional complementation of p53-induced apoptosis) 發現的 [21]。Nm23/NDP kinase 基因家族蛋白產物之 NDP kinase 部分主要氨基酸序列比較如附圖一 [13]。

Nm23/NDP kinase 基因和蛋白質產物家族可區分出各具特色之兩大類。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。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。第二類蛋白產物只有 nm23-H6 之產物被論及有催化 NDP kinase 反應, nm23-H5 之蛋白產物未發現有 NDP kinase 活性; 至於 nm23-H7 及 nm23-H8 之蛋白產物則尚未應用。Nm23/NDP kinase 基因家族之相似程度使用 phylogenetic tree 程式分

析如附圖二 [13]。

### 三、人類 nm23 基因家族的作用

Nm23/NDP kinase 家族存在人類的組織位置及作用如附表一 [13]。nm23 基因家族當中牽涉到癌症轉移潛力控制的主要是 nm23-H1/NDP kinase A，nm23-H2 和癌症轉移的關係沒有 nm23-H1 明顯，而作為 PuF 轉錄因子 (PuF transcription factor ; purine-binding transcription factor) 角色的只有 NDP kinase B。Lombardi 等人認為，在正常生理情況下，NDP kinase A 和 B 可能牽涉到增殖 (proliferation)、發展 (development) 及分化 (differentiation) [18]。Martinez 等人研究發現，在一些源自實質腫瘤 (solid tumors) 之細胞株，nm23-H3 基因有高度表現的情形 [22]。Amendola 等人則發現，於神經母細胞瘤之細胞所作 nm23-H3 轉殖 (transfection) 實驗裏，nm23-H3 之表現和分化呈正向關係 [23]。Nm23-H3 基因之表現和細胞分化之關係似乎隨著研究細胞株之不同而不一樣。至於 nm23-H4，則和外及內層粒線體膜 (outer and inner mitochondrial membranes) 有關 [13]。

Nm23-H5 主要存在於睪丸，可能和精子形成 (spermatogenesis) 之早期階段有關 [13, 19]。Mehus 等人指出，由 RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 研究發現，nm23-H6 存於人類

大部分組織，即使含量比較低了些 [20]。除了存於細胞質外，Tsuki 等人亦發現 nm23-H6 存於粒線體 [21]。此外，他們指出，此蛋白質在細胞生長及細胞循環進展 (cell cycle progression) 當中可能扮演某種角色。Nm23-H6 是第二類基因家族裏，唯一可能涉及 NDP kinase 活性者 [13]，且亦涉及多種惡性腫瘤 [24]。Nm23-H7 和 nm23-H8 基因主要也是在睪丸表現，也尚未發現涉及 NDP kinase 活性 [13]。

#### 四、子宮頸上皮內贅瘤 (Cervical intraepithelial neoplasia ; CIN)

子宮頸上皮內贅瘤是一種癌前病變，此種病變有可能進展成侵入性癌。當子宮頸上皮層分裂 (mitosis) 和不成熟 (immature) 細胞只佔未超過子宮頸上皮組織下三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤 CIN 1；若佔未超過上皮組織中三分之一時，稱為子宮頸上皮內贅瘤 CIN 2，已至上三分之一時，則稱為子宮頸上皮內贅瘤 CIN 3。在 Bethesda 分類系統裏，低度子宮頸鱗狀上皮內病變 (low-grade squamous intraepithelial lesions; LSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤 CIN 1 (輕度化生不良；mild dysplasia)，高度子宮頸鱗狀上皮內病變 (high-grade squamous intraepithelial lesions; HSILs) 包括子宮頸上皮內贅瘤 CIN 2 (中度化生不良；moderate dysplasia) 和子宮頸上皮內贅瘤 CIN 3 [包括重度化生不良 (severe dysplasia) 和鱗狀上皮細胞原位癌 (squamous cell carcinoma in situ)]。大部份子宮頸上皮內贅瘤 CIN 1 都會



消退 (regress), 然而有些子宮頸上皮內贅瘤 CIN 2 和 CIN 3 則會持續 (persist) 或進展 (progress) 下去 [25]。我們複習文獻發現, 只有少數研究評估在子宮頸癌化 (cervical carcinogenesis) 的多重步驟 (multisteps) 當中, nm23-H1 表現之差異, 因而我們有興趣探討 nm23-H1 在正常子宮頸和低度 高度子宮頸上皮內病變及子宮頸癌組織表現的情形, 並釐清 nm23-H1 在子宮頸癌癌化的角色。

## 五、Nm23-H1 於多種癌症之表現

很多研究已經發現於乳房腺管癌 (ductal carcinoma of the breast)、胃癌 (gastric cancer) 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 [26-28]。相反地, 肺、結腸、甲狀腺及胰臟之轉移癌, 其 nm23-H1 之表現反而增強 [29-33]。在婦科癌症當中, Mandai 等人發現, nm23-H1 表現下降和卵巢癌已經進展至末期及其淋巴轉移有關 [34]。Marone 等人則發現, 子宮頸癌病人若有淋巴轉移, nm23-H1 蛋白表現會呈現有意義下降 [35]。更進一步地, Mandai 等人亦指出, nm23-H1 蛋白於子宮頸癌病人缺乏表現和癌症有相當高比例已有淋巴轉移有關聯, 但是這種關聯只發生在腺癌 (adenocarcinoma) 而非鱗狀上皮癌 (squamous cell carcinoma; SCC) [36]。然而, Kristensen 等人卻未發現 nm23-H1 之免疫染色可作為子宮頸癌病人預後的一個有用指標

[37]。因而，nm23-H1 蛋白之表現情形和子宮頸癌之轉移潛力之關係尚未明確。

## 六、Nm23-H1 和子宮頸癌化 (carcinogenesis) 及臨床病理因子 (clinicopathological variables) 關係之探討

Lacombe 等人使用免疫組織化學法證實，NDP kinase 在很多人類惡性腫瘤有表現增強情形，包括子宮頸癌，但是卻未能證實它和轉移能力有任何的關係 [38]。然而，很多研究者已經發現 nm23-H1 之表現和癌症轉移潛力 (metastatic potential) 有關連性，但是很少研究者研究 nm23-H1 在腫瘤進展所扮演的角色。在本研究裏，我們嘗試決定 nm23-H1 在子宮頸癌化所扮演的角色。

截至目前為止，只有一篇報告提到，於高度子宮頸上皮內贅瘤 (high-grade cervical intraepithelial neoplasia) 及子宮頸鱗狀上皮癌檢體，nm23-H1 蛋白表現下降；然而於低度子宮頸上皮內贅瘤 (low-grade cervical intraepithelial neoplasia) 則未有此發現 [39]。Lee 等人的發現是，nm23-H1 蛋白表現之下降牽涉到子宮頸癌化的一系列變化當中之早期變化。他們的發現和 Marone 及 Mandai 等研究群之先前作者的發現，亦即 nm23-H1 蛋白表現之下降是牽涉到子宮頸癌之轉移而非癌症早期變化的發現是不一致的 [35, 36]。對於子宮頸癌病人而言，nm23-H1 蛋白免疫反應和臨床病理因子諸如年齡、細胞分化、基質侵犯深度、轉移 (包括淋巴、子宮旁或陰

道轉移) 及復發的關係仍未明確。

本研究的目的是評估 nm23-H1/NDP kinase 於子宮頸癌癌化的一系列變化當中所扮演的角色，並且檢驗 nm23-H1 免疫組織化學表現和子宮頸癌臨床病理特性的關係；更進一步探討早期子宮頸癌病人之累計復發危險性 (cumulative recurrence hazard)，並評估病人預後。

## 材料與方法

### 一、樣本和材料 (Samples and materials)

本研究總共蒐集 86 個子宮頸病理樣本，包括 30 個子宮頸鱗狀上皮癌、3 個腺癌 (adenocarcinoma)、1 個明亮細胞癌 (clear cell carcinoma)、19 個高度和 13 個低度子宮頸鱗狀上皮內病變暨 20 個正常子宮頸檢體，這些樣本都是來自中山醫學大學附設醫院婦產部之病人群。子宮頸癌病人分期為期別 IB (stage IB) 或期別 IIA (stage IB)，是依據 International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) 系統分期，他們於 1996 年一月至 1998 年十二月接受經腹部子宮根除手術 (abdominal radical hysterectomy) 及骨盆腔淋巴切除術 (pelvic lymph node dissection)。在這些子宮頸癌病例當中，九位有淋巴、子宮旁或陰道轉移，且有六位於追蹤期間復發。19 位高度子宮頸鱗狀上皮內病變之病人接受單純性經腹部子宮全切除手術 (total abdominal hysterectomy; TAH) 或子宮頸轉換帶 (transformation zone) 之大線圈錐狀切除術 (large loop excision of transformation zone; LLETZ); 而 13 位低度子宮頸鱗狀上皮內病變之病人則接受陰道鏡導引 (colposcopy-directed) 點狀切片 (punch biopsy)。正常子宮頸是定義為沒有癌前病變 (precancerous lesions) 或侵入性癌 (invasive

cancer) 之子宮頸，這些檢體是來自因子宮肌瘤、子宮腺肌症或子宮脫垂而接受單純性經腹部或陰道子宮全切除手術的病人。所有病人檢體之取得及研究方案 (protocol) 都經過中山倫理委員會 (Chung Shan Institutional Review Board) 同意，且所有病人都簽有同意書。

## 二、免疫組織化學染色 (Immunohistochemistry)

本研究使用免疫組織化學染色來檢測所有檢體的 nm23-H1 免疫反應 (immunoreactivity)。所有樣本是由福馬林固定 (formalin-fixed) 並經石蠟包埋 (paraffin-embedded)。檢體組織切片約 5 微米 (micrometer;  $\mu\text{m}$ ) 厚度，先在二甲苯 (xylene) 脫蠟 (deparaffinized)，再經 100% 酒精 5 分鐘兩次、95% 酒精 5 分鐘兩次、80% 酒精 5 分鐘一次及 75% 酒精 5 分鐘一次復水 (rehydration)。再使用 3% 過氧化氫 (hydrogen peroxide;  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 浸泡組織玻片 15 分鐘以便消耗組織內源性過氧化氫酵素 (endogenous peroxidase) 後，將玻片浸泡於 citrate buffer (2.1g/1,000 ml; pH 6.0) 並放入微波爐加熱至  $60^\circ\text{C}$ ，每次 5 分鐘共三次，讓抗原露出 (antigen retrieval)，以利 nm23-H1 抗体結合。針對 nm23-H1 蛋白之第一次抗體 (1 抗；primary antibody) 是單株 (monoclonal) 老鼠抗體 (NCL-nm23-H1, Novocastra; Newcastle, UK)，並且稀釋 200 倍使用。組織切片在加入 1 抗後置於  $4^\circ\text{C}$  並需過

夜，接著於室溫下使用例行性的 streptavidin-biotin-peroxidase 複合物免疫染色法染 20 分鐘。再加入 0.04% 3', 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 作為介質 (substrate) 反應 10 分鐘即可呈棕色。最後，在封片前再以 Gill's hematoxylin 作背景染色 (counterstained)。以一般老鼠血清或 phosphate buffered saline 取代 1 抗來作陰性對照(negative control)。

### 三、重要試劑配製 (Preparation of important solvents)

#### 1. 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 配製

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 毫升加 270 毫升二次水或 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 毫升加 360 毫升二次水。

#### 2. 0.01 M citrate buffer 之配製：

取 citrate acid monohydrate 2.1 公克，加二次水 800 至 900 毫升，以 HCl 或 NaOH 調整溶液 pH 值至 6；再加二次水至 1000 毫升混合均勻，得 0.1 M citrate buffer。取 0.1 M citrate buffer 100 毫升，再加二次水至 1000 毫升；並加入 NP-40 (Nonidet-P-40) 1 毫升溶解均勻，用 HCl 或 NaOH 調整 pH (需 pH < 6)，得 0.01 M citrate buffer。

#### 3. Phosphate buffer saline (PBS) 之配製

900 cc 二次水加 KCl 2.0 公克、K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 公克、NaCl 80.0 公克

及  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  11.44 公克。加 HCl 或 NaOH 調整溶液 pH 值至 7.6，再加二次水至溶液 1000 毫升並滅菌，得 10 x PBS。取 100 毫升 10 x PBS，再加 900 毫升二次水得 1 x PBS。

#### 4. Nm23-H1 抗体稀釋 200 倍

將 nm23 抗体 (Novocastra; NCL-nm23-H1,; mouse monoclonal antibody) 以 Dako antibody diluent 稀釋 200 倍。

### 四、實驗步驟 (Laboratory procedure)

#### 1. 融蠟、脫蠟

(1) 將組織切片置入烘箱，58 59 約十幾分鐘 (或者 37 ，

overnight)，等蠟融後立刻將已烤好組織切片放入保麗龍盒。

(2) 將組織切片置入 xylene (ACS 級) 平放浸泡 2 次 (2 缸, 第 1 缸較髒)，每次浸泡 10 分鐘，看蠟有沒有完全融掉。

#### 2. 復水

將組織切片置入不同濃度之系列酒精：

先浸泡 100%絕對酒精 5 分鐘 (第 1 缸)、再浸泡 100%絕對酒精 5 分 (第 2 缸)、95%酒精 5 分鐘 (第 1 缸)、95%酒精 5 分鐘 (第 2 缸)、80%酒精 5 分鐘最後浸泡 75%酒精 5 分鐘。

3. 將組織切片置入裝有一次水之玻片盒沖洗幾下。

4. 將組織切片浸泡於 3% $\text{H}_2\text{O}_2$  (7 分鐘組織切片翻面並持續浸泡於

3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 8 分鐘), 以消耗內源性之過氧化氫酵素 (peroxidase)。

5. 將組織切片置入裝有一次水之玻片盒沖洗幾下。

6. 加 citrate buffer 將抗原裸露 (antigen retrieval) :

先將 0.01M citrate buffer (pH=6.0)加入耐熱玻片盒, 並置於微波爐內預熱 5 分鐘, 再將組織玻片置入 citrate Buffer 微波加熱 3 次, 每次 5 分鐘 (加熱 4 分鐘, 等 1 分鐘), 以便讓組織抗原裸露。再將含組織玻片之玻片盒置於室溫中, 待 citrate Buffer 呈透明澄清 (約 1 小時), 即可將 buffer 倒掉。

7. 將組織切片置入裝有一次水之玻片盒沖洗幾下。

8. 將組織切片浸泡 1x PBS 5 分鐘。

9. 加 nm23-H1 抗体 :

Nm23-H1 抗体 (Novocastra; NCL-nm23-H1; mouse monoclonal antibody) 以 Dako antibody diluent 稀釋 200 倍 (抗體和 diluent 需放在冰浴上)。所有組織玻片作好標記 (如病理號碼、抗體稀釋濃度)。染玻片時, 需先把水份甩乾, 再將玻片放在裏面加有冰塊之潮濕盒 (wet chamber) 上, 用 DAKO pen 將組織圈起來, 滴稀釋之 nm23-H1 抗體 (1:200), 將其抹平, 不要有間隙。所有玻片加完抗體後, 蓋上潮濕盒蓋子置入 4 冰箱至隔天早上 (overnight)。潮濕盒需墊平, 染色才會均勻, 並以水銀天平測有沒有平。



10. 隔天早上將有組織玻片之潮濕盒置於室溫半小時回溫。
11. 所有組織玻片以 1x PBS 沖洗 5 分鐘。
12. ABC 步驟 (Streptavidin-Biotin Procedure) :
  - (1) 組織玻片以 1x PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
  - (2) 加有水之潮濕盒，先放在 37 培養箱 5 分鐘。將組織玻片放在潮濕盒上，加入 Link (Dako, biotinylate link, anti-mouse and anti-rabbit Ig) 於 37 培養箱作用 20 分鐘 (組織玻片需用乾，一片玻片加兩、三滴 link，link 需弄均勻)。
  - (3) 組織玻片以 1x PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
  - (4) 加有水之潮濕盒，先放在 37 培養箱 5 分鐘。將組織玻片放在潮濕盒上，加入 streptavidin (Dako, streptavidin-HRP for LSAB R) 於 37 培養箱作用 20 分鐘 (組織玻片需用乾，一片玻片加兩、三滴 streptavidin，streptavidin 需弄平弄均勻)。
13. 所有組織玻片以 1x PBS 沖洗 3 次，每次 5 分鐘。
14. 所有組織玻片以一次水沖洗 30 秒。
15. DAB 呈色-呈咖啡色：

每片組織玻片背面需先在擦手紙上吸乾 (平鋪擦手紙 6-9 張)，放在潮濕盒上，每片加 50-60  $\mu$ L DAB 作用 (每片玻片可加至 100  $\mu$ L) 10 分鐘 (於室溫下、避光-即蓋上潮濕盒蓋子 10 分鐘)。

16. 將玻片側放直立，讓 DAB 於擦手紙上吸乾。放入一次水中泡 30 秒，洗 4-5 次。

17. Haematoxylin 染色-藍色背景

玻片置入 Haematoxylin 浸泡 5 秒，立刻放入水（一般水）盆中，以水沖洗玻片約 5-15 分鐘（不要直接沖組織玻片）。

18. 組織玻片脫水：

將組織玻片置入不同濃度之系列酒精：

先浸泡 75%酒精 30 秒、再浸泡 80%酒精 30 秒、95%酒精 30 秒、100%絕對酒精 30 秒（第 1 缸）及 100%絕對酒精 30 秒（第 2 缸），最後浸泡 xylene 1 分鐘（第 1 缸）和 xylene 1 分鐘（第 2 缸）。

19. 以阿拉伯膠封組織玻片。

## 五、免疫組織化學染色之判讀 (Interpretation of immunohistochemical staining)

所有樣本的 nm23-H1 之免疫組織化學表現由相同的病理學專家判讀，免疫反應是依被染色細胞的深度和比率評估。陽性免疫反應定義為有超過百分之十之被染色的正常、化生不良 (dysplasia) 或癌細胞，其染色深度比鄰近非細胞部分基質還深。此外，陽性病例若染色深度比正常子宮頸鱗狀上皮細胞之免疫染色還強，則被認為有高度的 nm23-H1 蛋白之表現。相對地，若沒有免疫染色或染色深度相同或比

較弱則被認為低度的 nm23-H1 蛋白表現。

## 六、統計分析 (Statistical analysis)

1 使用卡方 (Chi-square) 或 Fisher's exact 試驗來評估 nm23-H1 蛋白在子宮頸正常鱗狀上皮、低度和高度鱗狀上皮內病變及癌組織的表現情形。

2. 使用卡方趨勢檢定 (Chi-square test for trend) 來評估 nm23-H1 蛋白之高度表現在子宮頸正常鱗狀上皮、低度和高度鱗狀上皮內病變及癌組織的趨勢。

3 使用 Fisher's exact 試驗來評估子宮頸鱗狀上皮癌組織, 其 nm23-H1 蛋白表現和多種臨床病理因子諸如年齡、細胞分化、基質侵犯深度及轉移 (包括淋巴、子宮旁或陰道轉移) 的關係。

4 將子宮頸鱗狀上皮癌病人依高度和低度 nm23-H1 蛋白之表現分成兩組, 並將高度和低度 nm23-H1 蛋白表現兩組別病人, 依其接受經腹部子宮根除手術到 2002 年一月這段時間裏復發情形, 畫出 Kaplan-Meier 曲線來評估累計復發危險性, 再以 log-rank 試驗比較這兩組病人, 其復發分佈的差異。

5 使用 SPSS 統計軟體 (Ver 7.0) 作統計分析, 當  $P < 0.05$  就被認為有統計上的意義。

## 結果

### 一、正常子宮頸 nm23-H1 蛋白之表現

以 nm23-H1 蛋白抗体作免疫組織化學染色，於所有 (20 個正常子宮頸檢體) 正常子宮頸鱗狀上皮組織裏，均呈陽性細胞質染色。大部分呈陽性染色之細胞，其染色深度 (intensity) 皆相似；且這些呈色細胞位於基底細胞層 (basal cell layer) 上面，而基底細胞則不呈色 (圖一)。偶而，在子宮頸鱗狀上皮裏，可以看到稀疏的核染色 (圖二)。在有些樣本裏，基質細胞或血管壁呈陽性細胞質染色。至於子宮頸內管 (endocervix)，其柱狀上皮偶而亦可看到 nm23-H1 蛋白核染色，細胞質及基質則呈低度免疫組織化學染色 (圖三)。

### 二、低度和高度子宮頸鱗狀上皮內病變及癌組織 nm23-H1 蛋白表現

於低度子宮頸鱗狀上皮內病變組織裏，nm23-H1 蛋白免疫染色之表現和在正常子宮頸上皮裏類似。於兩個低度子宮頸鱗狀上皮內病變且有 koilocytic atypia 之病例，其整層鱗狀上皮之 nm23-H1 蛋白免疫染色均呈低度染色 (圖四)。於 13 個低度子宮頸鱗狀上皮內病變病例當中，有 84.6% 顯現 nm23-H1 蛋白低度染色 (表一)。相對於低度子宮頸鱗狀上皮內病變，於 19 個高度子宮頸鱗狀上皮內病變病例當

中，有 57.9% 顯現 nm23-H1 蛋白高度染色 (圖五、六、七，表一)；於 30 個子宮頸鱗狀上皮癌病例當中，有 66.7% 顯現 nm23-H1 蛋白高度染色 (圖八、九，表一)。此外，三例腺癌 (圖十) 及一例明亮細胞癌也都顯現 nm23-H1 蛋白高度染色 (表二)，經由卡方或 Fisher's exact 試驗統計分析發現，nm23-H1 蛋白之表現在低度及高度子宮頸鱗狀上皮內病變之間，有顯著差異 ( $P = 0.016$ )；於低度子宮頸鱗狀上皮內病變和子宮頸鱗狀上皮癌病例之間亦有顯著差異 ( $P = 0.002$ ) (表一)。另外，nm23-H1 蛋白之表現在正常子宮頸鱗狀上皮及高度子宮頸鱗狀上皮內病變之間 ( $P < 0.001$ ) 暨正常子宮頸鱗狀上皮和子宮頸鱗狀上皮癌病例之間 ( $P < 0.001$ ) 也都有顯著差異 (表一)。至於，在高度子宮頸鱗狀上皮內病變及子宮頸鱗狀上皮癌病例之間 ( $P = 0.535$ ) 或正常子宮頸鱗狀上皮及低度子宮頸鱗狀上皮內病變之間 ( $P = 0.148$ ) 則都沒有顯著差異 (表一)。

### 三、Nm23-H1 蛋白在正常子宮頸、子宮頸鱗狀上皮內病變及癌組織表現趨勢

nm23-H1 蛋白高度表現的比例隨著子宮頸鱗狀上皮病變系列進展而增加。由卡方趨勢檢定發現，nm23-H1 蛋白高度表現和子宮頸鱗狀上皮惡性轉換 (malignant transformation) 程度有正向關聯 (positive relationship) (表一)。

#### 四、本研究子宮頸鱗狀上皮癌病例其組織 nm23-H1 蛋白之表現和臨床病理特徵之關係

由統計分析發現，在眾多臨床病理特徵當中，只有深部基質侵犯（大於或等於一半基質深度之侵犯）之檢體，其 nm23-H1 蛋白之表現才會呈現有意義之上升（表三）。雖然年紀較大（大於或等於 50 歲）或有組織轉移之檢體，nm23-H1 蛋白表現有較高之趨勢，但其差異都未達到統計學上的意義

將子宮頸鱗狀上皮癌病人依 nm23-H1 蛋白之表現分成兩組，一組為高表現群，另一組為低表現群。依據 Kaplan-Meier 曲線來評估累計復發危險性，nm23-H1 蛋白低表現群有較好的復發分布，且有統計上的意義（圖十一）。甚且，本研究所有子宮頸癌復發的病人都發生於 nm23-H1 蛋白高表現群（6/6）。

## 討論

我們的資料分析發現, nm23-H1 蛋白之表現在低度及高度子宮頸鱗狀上皮內病變之間, 有顯著差異; 同樣地, 於低度子宮頸鱗狀上皮內病變和子宮頸鱗狀上皮癌病例之間亦有顯著差異 (表一)。至於, 在高度子宮頸鱗狀上皮內病變及子宮頸鱗狀上皮癌病例之間或正常子宮頸鱗狀上皮及低度子宮頸鱗狀上皮內病變之間則都沒有顯著差異 (表一)。Lee 等人之研究亦指出, nm23-H1 蛋白之表現在低度及高度子宮頸鱗狀上皮內病變之間暨低度子宮頸鱗狀上皮內病變和子宮頸鱗狀上皮癌病例之間有顯著差異 [39]。然而, 他們的發現是在高度子宮頸鱗狀上皮內病變暨子宮頸鱗狀上皮癌病例裏, nm23-H1 蛋白之表現是下降, 而非如我們實驗的發現, nm23-H1 蛋白之表現是上升的。Lacombe 等人指出, 包括子宮頸鱗狀上皮癌之實質腫瘤 (solid tumors), 其腫瘤細胞 nm23-H1 蛋白的免疫染色深度和 NDP kinase 之活性有關, 且活性的增加是由於 NDP kinase 量的增加 [38]。

Nm23/NDP kinase 對於 nucleic acid 合成所需之 nucleoside triphosphates (NTP) 之補充是很重要的。因此, nm23 蛋白表現增加是和細胞增殖 (cellular proliferation) 有關 [40]。事實上, Lacombe 等人亦發現, 一些良性腫瘤, 其 nm23-H1 蛋白之過度表現可能和細

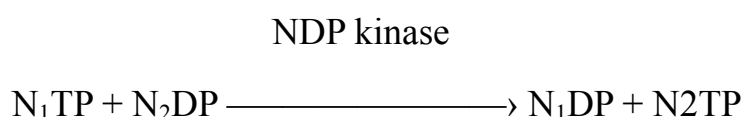
胞增殖也有關 [38]。此外，Ohneda 等人亦發現在腫瘤化早期 (early stages of tumorigenesis)，細胞惡性轉換 (cell transformation) 和不朽 (immortalization) 可以誘導 nm23-H1 基因過度表現 (overexpression)，進而增加 nm23 基因產物的表現 [41]。這正好支持我們的研究結果，亦即，nm23-H1 蛋白的高度表現而非 nm23 蛋白表現之下降，發生於子宮頸鱗狀贅瘤一系列發展過程之早期；並由低度子宮頸鱗狀上皮內病變產生關鍵性之 nm23-H1 蛋白之表現增強，進展至高度子宮頸鱗狀上皮內病變，接下來更進展至侵入性子宮頸鱗狀上皮癌 [42]。

我們的資料顯示，nm23-H1 蛋白表現增強的程度和子宮頸鱗狀贅瘤細胞病變之嚴重度，亦即，由正常鱗狀上皮轉變成低度子宮頸鱗狀上皮內病變，再由低度而至高度子宮頸鱗狀上皮內病變，甚至進展為侵入性子宮頸鱗狀上皮癌，呈正向關係 (表一) [43]。甚且，於大部分高度子宮頸鱗狀上皮內病變及子宮頸鱗狀上皮癌病例，nm23 基因產物均呈高度表現。這些發現隱約告訴我們，子宮頸鱗狀贅瘤惡性轉換 (malignant transformation) 嚴重度的增加可以由 nm23 基因產物增強的趨勢反映出來。我們的研究和 Ravazoula 等人的發現一致；他們的研究指出，nm23-H1 蛋白的免疫反應有隨著子宮頸上皮病變嚴重度增強而增強的傾向 [42-44]。他們發現，於子宮頸鱗狀上皮內贅瘤 CIN II 和 CIN III 暨 CIN II 和侵入性癌症之間，nm23-H1 蛋白之表現，



有統計學上顯著的差異。然而，於 Bethesda 系統分類 (Bethesda System) 裏，子宮頸鱗狀上皮內贅瘤 CIN II 和 CIN III 被歸類為高度子宮頸鱗狀上皮內病變。嚴格說來，我們研究裏，於子宮頸癌化 (cervical carcinogenesis) 過程產生關鍵且有意義進展的是發生於低度至高度子宮頸鱗狀上皮內病變之間 (CIN I 至 CIN II 及 III 之間)，而非 Ravazoula 等人所指出的子宮頸鱗狀上皮內贅瘤 CIN II 至 CIN III 之間。

Nm23-H1/NDP kinase 之代謝角色 (metabolic roles)，讓我們更能了解何以在高度子宮頸鱗狀上皮內病變及子宮頸鱗狀上皮癌病例等細胞增殖厲害的情況，nm23-H1 蛋白的表現會明顯增強。NDP kinase 之生化活性可以一公式表示 [1, 2, 45]：



N1 和 N2 可以是核糖核酸或去氧核糖核酸。NDP kinase 的酵素活性包括將 N<sub>1</sub>TP 上的磷酸根經由高能量的 nm23-phosphohistidine 中間物轉移給 N<sub>2</sub>DP。在磷酸根的轉移反應當中，nm23-phosphohistidine 並保有每莫耳可多至七大卡的鍵能。目前 NDP kinase 廣為接受的角色包括：(1) 以 ATP 為供應者 (donor) 製造 nonadenylic NTPs，以便核酸合成和一些重要代謝中間物 (metabolic intermediates) 所需，這些

中間物包括：UDP-glucose 和一些 CDP-lipid 衍生物 (CDP-lipid derivatives)；(2) 催化克氏循環 (Krebs cycle) 裏產生的 GTP 和 ADP 之間磷酸根轉移 (transphosphorylation)；(3) 提供 GTP 以便蛋白質合成，G 蛋白信號傳遞 (G-protein signaling) 和 tubulin 聚合 (tubulin polymerization) [13]，所以，nm23/NDP kinase 應該可以促進細胞增殖。NDP/kinase 最重要的角色之一便是製造 NTPs 以便核酸合成。事實上，在被誘導增殖的細胞裏，可以觀察到 NDP kinase A 和 B 量的增加 [46, 47]。在大腸桿菌裏，NDP kinase 似乎是去氧核糖核酸合成複合物的一部份。在我們的研究裏，由於 nm23-H1/NDP kinase 提供 nucleic acid 合成所需之 nucleoside triphosphates (NTP) 以便核酸合成，並且有聚合 tubulin 的作用，有利於細胞增殖，於高度子宮頸鱗狀上皮內病變及癌化過程，nm23-H1/NDP kinase 蛋白表現當然明顯增強。

至於 Nm23-H1 免疫反應和臨床病理特徵之關係，我們可以發現於年紀較大 (大於或等於 50 歲) 或有組織轉移之病例，有高度 nm23-H1 蛋白表現的傾向；然而，尚未達到統計學上的意義。更進一步地，只有深部基質侵犯 (大於或等於一半基質深度之侵犯) 才會和高度 nm23-H1 蛋白表現有顯著意義之關連 (表三)。除了子宮頸旁組織有無侵犯 細胞分化層級及淋巴轉移和 nm23-H1 蛋白表現無關外，Sarac

等人也沒辦法證明深部基質侵犯和 nm23- H1 蛋白表現有明顯關聯 [48]；但是，他們卻未定義基質侵犯深度。然而，將深部基質侵犯和高度 nm23- H1 蛋白表現有關，歸因於和 nm23/NDP kinase 相關之細胞增殖的推測似乎是合理的。

論及子宮頸鱗狀上皮癌的轉移潛力，在我們的轉移病例裏，包括淋巴、子宮頸旁組織及陰道轉移，可以看到有較多的高度 nm23- H1 蛋白表現的情形。於我們的淋巴轉移病例，有高達 83.3% (5/6) 的比率是高度 nm23- H1 蛋白表現，這種結果和 Kristensen 等人的發現一致，在他們的淋巴轉移病例，較深的 nm23- H1 蛋白染色所佔比率是 75.8% [37]。相反地，Marone 等人則認為，有淋巴侵犯的子宮頸癌病人，nm23- H1 蛋白含量反而呈有意義下降 [35]。更進一步地，Mandai 等人指出，nm23-H1 蛋白於子宮頸癌病人缺乏表現和有相當高比例已有淋巴轉移有關聯，但是這種關聯只發生在腺癌 (adenocarcinoma) 而非鱗狀上皮癌 [36]。另外，陳氏等人則發現 nm23-H1 蛋白之表現和淋巴轉移無關，他們甚至發現於 IB1 期子宮頸鱗狀上皮癌，exons 4 和 5 的 nm23-H1 基因沒有突變 (mutations) [49]。除了子宮頸癌外，於其他腫瘤癌症，有關 nm23-H1 蛋白之表現和腫瘤生物行為的關係亦相當分歧 [26-33]；因而我們認為 nm23/NDP kinase 的功能是因不同組織而異，甚至即使相同器官，但是在鱗狀上皮癌及腺癌等不同組

織形態 (histologic type) 裏，其 nm23-H1 蛋白表現亦不相同 [36]。在我們的子宮頸癌病例當中，於三十例鱗狀上皮癌檢体，約有 66.7% (20/30) 是高 nm23-H1 蛋白表現，而在三例腺癌及一例明亮細胞癌檢体，均為高 nm23-H1 蛋白表現；但是因為樣本數少，我們尚不能論證高 nm23-H1 蛋白表現較常發現於較具侵襲組織形態 (aggressive histological types) 之癌症。由以上一些研究結果，我們懷疑 nm23-H1 基因其實是不穩定的 (unstable)。對於侵襲性強的神經母細胞癌 (neuroblastoma), nm23-H1 基因突變，造成位置 120 之精氨酸 serine 轉變為 glycine，已被張氏等人提出和增加高 nm23-H1 蛋白表現有關 [50]。相對地，於黑色素細胞癌和乳癌病例，當有遠處轉移 (distant metastasis) 且 nm23-H1 免疫反應較低時，nm23-H1 基因之体染色体基因有缺損 (somatic allelic deletion) [28, 51]。因此，nm23-H1 基因之不穩定可能牽涉到於不同的腫瘤之腫瘤進展的調節機制，進而造成臨床過程之分歧。然而，有些報告指出 nm23 另外的精氨酸磷酸化 (serine phosphorylation) 作用並未涉入它的 NDP kinase 活性 [52-55]。於黑色素細胞及乳癌細胞株裏，serine 120 精氨酸磷酸化可能和 nm23 的抑制轉移有關，且可能和 nm23 的表現程度直接相關，且當 serine 120 突變為 glycine (serine to glycine) 時，nm23 便喪失它抑制轉移的作用 [52, 56]。前面提到，張氏等人發現，增加高 nm23-H1 蛋

白表現和神經母細胞癌增強的侵襲性有關，但是它的基因已發生基因突變，造成位置 120 之精氨酸 serine 轉變為 glycine。是否測得的 nm23-H1 蛋白表現增加，很多都不具有正常功能，真正有功能的 nm23-H1 蛋白已因基因突變而減少，造成抑制癌細胞轉移的作用減弱，因而神經母細胞癌侵襲性增強，是很值得探討的。

雖然目前尚未有針對子宮頸癌所作的細胞層級之研究 (cellular study)，足以解釋並確認子宮頸癌病例裏，轉移特性及其他臨床病理特徵和 nm23-H1 的關係；然而有很多觀察卻發現，nm23/NDP kinase 涉及細胞面對細胞外的刺激所作的反應。過度表現 nm23-H1 之黑色素細胞癌和乳癌之癌細胞會減少對細胞素 (cytokine) TGF- $\beta$  1 (transforming growth factor- $\beta$  1) 的反應 [57, 58] 且對血清、PDGF (platelet-derived growth factor) 和 IGF-1 (insulin-like growth factor) 所引發的移動會受到明顯抑制 [56, 59-60]。同樣地，nm23-H1 也抑制了前列腺癌細胞為化學趨近素 (chemoattractant) 所刺激而產生的移動 [61]；相反地，於結腸癌細胞，經由 anti-sense 來減少 nm23-H1 表現，卻阻斷了 TGF- $\beta$  1 訊息傳遞路徑 (TGF- $\beta$  1 signaling pathway) [62]。由以上研究可知，nm23/NDP kinases 會調節細胞訊息傳遞網路。然而，研究結果並未循一明顯可辨的模式調節訊息傳遞；所以到目前為止，關於 nm23/NDP kinase 於訊息傳遞的角色尚未有一致的假說。

以上 nm23/NDP kinases 於不同細胞，癌細胞或正常細胞所導致明顯且分歧的結果，似乎歸因於被其活化的接受體種類不同所致 [63-67]。如果 nm23/kinase 加強一反應，可能的接受體 (muscarinic cholinergic receptor, mating factor receptor 或者 phytochrome) 會連結到 heterotrimeric G proteins，而當連結到細胞素和大多數 polypeptide growth factors，nm23/kinase 則產生抑制作用。總結而言，nm23/NDP kinase 於訊息傳遞上所扮演的相反角色，端看細胞外的訊息所活化的接受體是啟動 heterotrimeric G protein 活性或利用 tyrosine/serine 磷酸化作用 (phosphorylation) 起始訊息。子宮頸癌之臨床病理特性和 nm23/kinase 之關聯究竟循 heterotrimeric G protein (促進作用) 或 growth factor receptor (抑制作用) 訊息傳遞，尚需進一步的實驗和觀察。Nm23/NDP kinases 和細胞訊息傳遞之相關性除了和啟動接受體有關外，另外對於癌細胞周圍組織的直接侵犯轉移則與細胞骨架成份 (cytoskeletal components) 有關。和 nm23/NDP kinase 所涉及的訊息傳遞最有關連的蛋白質便是細胞骨架成份，包括 tubulin 和 vimentin，它們和訊息傳遞的空間特色有關 [63]。Nm23/NDP kinase 和細胞骨架的交互作用已經由很多器官及組織當中的細胞發現到，這種關聯的普遍性顯示它是一種基本功能 [68-72]。經細胞膜接受體的活化常會影響細胞骨架的組織化 (cytoskeletal organization)，在接受外界刺激以

後，nm23/NDP kinase 和構造型蛋白質如 vimentin 的連結，會影響到細胞骨架再塑 (cytoskeletal remodeling) 的動力學。Vimentin 網路有形成纏結 (tangle) 和成束 (bundle) 的趨勢；當 nm23/NDP kinase 存在時，vimentin 會組合的更緊密，這可能是因為超過單一細絲纖維 (filament) 可以和 nm23/NDP kinase 六面體 (nm23/NDP kinase hexamer) 交互作用。如果 nm23/NDP kinase 在活體 (in vivo) 有這種效應，它的過度表現會降低細胞骨架可塑性 (cytoskeletal plasticity) 及細胞移動所需的柔韌性 (flexibility) [71, 72]；而這個性質可能是某些 nm23/NDP kinase 家族對細胞移動之抑制作用的基礎。相反的，在我們的研究當中，子宮頸癌轉移病例裏，nm23-H1 蛋白表現之增加雖然未達到統計學上的意義，但是仍有昇高之趨勢。是否可能藉由 nm23-H1 活化 tubulin [13]，進而增加細胞移動性，再因移動性增強而有轉移之趨勢呢？顯然，23/NDP kinase 和細胞骨架之間的交互作用只能部份解釋對細胞移動的影響，卻不是唯一影響細胞移動的因子。其他如細胞與細胞之間的黏著分子 (cell-cell adhesion molecules; CAMs)，包括免疫球蛋白、cadherin 家族 (cadherin families; 尤其是 E-cadherin, epithelial-cadherin) 和 integrins 以及蛋白分解酶 (protease) 的影響仍然需考慮 [73-75]；且癌細胞循淋巴、血液轉移和 nm23/NDP kinase 的關係，沒辦法依此模式解釋。

考慮 nm23-H1 免疫反應和子宮頸鱗狀上皮癌病人預後之關係，對高度和低度 nm23-H1 蛋白表現兩組別病人，評估其累計復發危險性。高度 nm23-H1 蛋白表現組別的病人，有較差的復發分布。由此推知，高度 nm23-H1 蛋白表現可以作為較差的累計復發之預測參考；這個結果並和陳氏等人的發現一致，也就是說，當 nm23-H1 蛋白過度表現和較低的復發存活率 (recurrence-free survival rate) 呈現有意義的關聯 [49]。然而，陳氏等人的樣本為局限於 IB1 期的子宮頸癌病人。相反地，Kristensen 等人並未發現 nm23/NDP kinase 之免疫染色是子宮頸癌病人有用的預後指標 [37]。另外，Dusonchet 等人指出，nm23-H1 活性因組織而異，於結腸直腸癌病例，疾病之再發作 (disease relapse) 和 nm23-H1 免疫組織化學染色無關 [76]。因而，nm23-H1 於子宮頸癌病人預後的角色仍需進一步研究。



## 參考文獻

1. Berg P, Joklik WK. Transphosphorylation between nucleoside polyphosphates. *Nature* 1953;172:1008-1009.
2. Krebs HA, Hems R. Some reactions of adenosine and inosine phosphates in animal tissues. *Biochem Biophys Acta* 1953;12:172-180.
3. Cheng YC, Agarwal RP, Parks RE Jr. Erythrocytic nucleoside diphosphokinase. IV. Evidence for electrophoretic heterogeneity. *Biochemistry* 1971;10:2139-2143.
4. Cheng YC, Robison B, Parks RE Jr. Demonstration of the heterogeneity of nucleoside diphosphokinase in rat tissues. *Biochemistry* 1973;12:5-10.
5. Kimura N, Shimada N, Nomura K, Watanabe K. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *J Biol Chem* 1990;265:15744-15749.
6. Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe ML. *Dictyostelium* nucleoside diphosphate kinase highly homologous to nm23 and awd proteins involved in mammalian tumor metastasis and *Drosophila* development. *J Natl Cancer Inst*

1990;82:1199-1202.

7. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988;80:200-204.
8. Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IM, King CR, Liotta LA, Steeg PS. Reduced Nm23/Awd protein in tumor metastasis and aberrant *Drosophila* development. *Nature* 1989;342:177-180.
9. Dearolf CR, Hersperger E, Shearn A. Developmental consequences of awdb3, a cell-autonomous lethal mutation of *Drosophila* induced by hybrid dysgenesis. *Develop Biol* 1988;129:159-168.
10. Biggs J, Tripoulas N, Hersperger E, Dearolf C, Shearn A. Analysis of the lethal interaction between the prune and Killer of prune mutations of *Drosophila*. *Genes Develop* 1988;2:1333-1343.
11. de la Rosa A, Williams RL, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase: Toward a structural and biochemical understanding of its biological function. *Bioessays* 1995;17:53-62.
12. Urano T, Takamiya K, Furukawa K, Shiku H. Molecular cloning and functional expression of the second mouse nm23/NDP kinase gene,

- nm23-M2. *FEBS Lett* 1992;309:358-362.
13. Lacombe ML, Milon L, Munier A, Mehus JG, Lambeth DO. The human nm23/nucleoside diphosphate kinases. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:247-258.
14. Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. *Cancer Res* 1991;51:445-449.
15. Gilles AM, Presecan E, Vonica A, Lascu I. Nucleoside diphosphate kinase from human erythrocytes. Structural characterization of the two polypeptide chains responsible for heterogeneity of hexameric enzyme. *J Biol Chem* 1991;266:8784-8789.
16. Venturelli D, Martinez R, Melotti P, Casella I, Peschle C, Cucco C, Spampinato G, Darzynkiewicz Z, Calabretta B. Overexpression of DR-nm23, a protein encoded by a member of the nm23 gene family, inhibits granulocyte differentiation and induces apoptosis in 32Dc13 myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:7435-7439.
17. Milon L, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J, Lacombe ML. nm23-H4, a new member of the family of human nm23/nucleoside diphosphate kinase genes localized on chromosome

- 16p13. *Human Genet* 1997;99:550-557.
18. Lombardi D, Lacombe ML, Paggi MG. Nm23: unraveling its biological function in cell differentiation. *J Cell Physiol* 2000;182:144-149.
19. Munier A, Feral C, Milon L, Pinon VP, Gyapay G, Capeau J, Guellaen G, Lacombe ML. A new human *nm23* homologue (*nm23-H5*) specifically expressed in testis germinal cells. *FEBS Lett* 1998;434:289-294.
20. Mehus JG, Deloukas P, Lambeth DO. NME6: a new member of the *nm23*/nucleoside diphosphate kinase gene family located on human chromosome 3p21.3. *Human Genet* 1999;104:454-459.
21. Tsuiki H, Nitta M, Furuya A, Hanai N, Fujiwara J, Inagaki M, Kochi M, Ushio Y, Saya H, Nakamura H. A novel human nucleoside diphosphate (NDP) kinase, *Nm23-H6*, localizes in mitochondria and affects cytokinesis. *J Cell Biochem* 1999;76:254-269.
22. Martinez R, Venturelli D, Perrotti D, Veronese ML, Kastury K, Druck T, Huebner K, Calabretta B. Gene structure, promoter activity, and chromosomal location of the DR-*nm23* gene, a related member of the *nm23* gene family. *Cancer Res* 1997;57:1180-1187.
23. Amendola R, Martinez R, Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Calabretta B, Raschella G. DR-*nm23* gene expression in neuroblastoma cells: relationship

to integrin expression, adhesion characteristics, and differentiation.

*J Natl Cancer Inst* 1997;89:1300-1310.

24. Fearon ER. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 1997;278:1043-1050.
25. Wright Jr TC, Richart RM. Pathogenesis and diagnosis of preinvasive lesions of the lower genital tract. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, eds. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997:678-680.
26. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph-node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989;49:5185-5190.
27. Nakayama H, Yasui W, Yokozaki H, Tohara E. Reduced expression of nm23 is associated with metastasis of human gastric carcinomas. *JPN J Cancer Res* 1993;84:184-190.
28. Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O, Maelansmo GM, Bruland DS, Fodstad D. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progression. *Cancer Res* 1992;52:6088-6091.

29. Engel M, Theisinger B, Seib T, Seitz G, Huwer H, Zang KD, Welter C, Dooley S. High levels of nm23-H1 and nm23-H2 messenger RNA in human squamous-cell lung carcinoma are associated with poor differentiation and advanced tumor stages. *Int J Cancer* 1993;55:375-379.
30. Myeroff LL, Markowitz SD. 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* 1993;85:147-152.
31. Haut M, Steeg PS, Willson JKV, Markowitz SD. Induction of nm23 expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of both high and low metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1991;83:712-716.
32. Zou M, Shi Y, Al-Sedairy S, Farid NR. High levels of nm23 gene expression in advanced stage of thyroid carcinomas. *Br J Cancer* 1993;68:385-388.
33. Nakamori S, Ishikawa O, Ohhigashi H, Kameyama M, Furukawa H, Sasaki Y, Inaji H, Higashiyama M, Imaoka S, Iwanaga T, Funai H, Wada A, Kimura N. Expression of nucleoside diphosphate kinase/nm23 gene product in human pancreatic cancer: an association with lymph node metastasis and tumor invasion. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:151-158.

34. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Mori T, Arao S, Tashiro H, Okamura H, Nomura H, Hiai H, Fukumoto M. Expression of metastasis-related nm23-H1 and nm23-H2 genes in ovarian carcinomas: correlation with clinicopathology, EGFR, c-erbB-2, and c-erbB-3 genes, and sex steroid receptor expression. *Cancer Res* 1994;54:1825-1830.
35. Marone M, Scambia G, Ferrandina G, Giannitelli C, Benedetti-Panici P, Iacovella S, Leone A, Mancuso S. Nm23 expression in endometrial and cervical cancer: inverse correlation with lymph node involvement and myometrial invasion. *Br J Cancer* 1996;74:1063-1068.
36. Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Mori T, Fukumoto M. 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* 1995;75:2523-2529.
37. Kristensen GB, Holm R, Abeler VM, Trope CG. Evaluation of the prognostic significance of nm23/NDP kinase protein expression in cervical carcinoma: an immunohistochemical study. *Gynecol Oncol* 1996;61:378-383.
38. Lacombe ML, Sastre-Garau X, Lascu I, Vonica A, Wallet V, Thiery JP, Veron M. Overexpression of nucleoside diphosphate kinase

- (nm23) in solid tumors. *Eur J Cancer* 1991;27:1302-1307.
39. Lee CS, Gad J. nm23-H1 protein immunoreactivity in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Pathol Int* 1998;48:806-811.
40. Weber G, Jackson RC, Williams JC, Goulding FJ, Eberts TJ. Enzymatic markers of neoplastic transformation and regulation of purine and pyrimidine metabolism. *Adv Enzyme Regul* 1977;15:53-77.
41. Ohneda K, Fukuda M, Shimada N, Ishikawa N, Ichou T, Kaji K, Toyota T, Kimura N. Increased expression of nucleoside diphosphate kinases/nm23 in human diploid fibroblasts transformed by SV40 large T antigen or <sup>60</sup>Co irradiation. *FEBS Lett* 1994;348:273-277.
42. Wang PH, Ko JL, Chang H, Lin LY. Clinical significance of high nm23-H1 expression in intraepithelial neoplasia and early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Obstet Invest* 2003;55:14-19.
43. Wang PH, Chang H, Ko JL, Lin LY. Nm23-H1 immunohistochemical expression in multisteps of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:325-330.
44. Ravazoula P, Aletra C, Kourounis G, Ladopoulos I, Tzigounis V. Immunohistochemical analysis of nm23-H1 expression in human cervical



- lesions. *Eur J Gynaecol Oncol* 2000;21:510-512.
45. de la Rosa A, Williams RL, Steeg PS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *BioEssays* 1995;17:53-62.
46. Keim D, Hailat N, Melhem R, Zhu XX, Lascu I, Veron M, Strahler J, Hanash SM. Proliferation-related expression of p19/nm23 nucleoside diphosphate kinase. *J Clin Invest* 1992;89:919-924.
47. Lee H, Okada K, Baba H, Furukawa K, Chang SI, Shiku H. *Intern J Oncol* 1997;11:965-970.
48. Sarac E, Ayhan A, Ertoy D, Tuncer ZS, Yasui W, Tahara E, Ayhan A. Nm23 expression in carcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* 1998;19:312-315.
49. Chen HY, Hsu CT, Lin WC, Tsai HD, Chang WC. Prognostic value of nm23 expression in Stage IB1 cervical carcinoma. *JPN J Clin Oncol* 2001;31:327-332.
50. Chang CL, Strahler JR, Thoraval DH, Qian MG, Hinderer R, Hanash SM. A nucleoside diphosphate kinase A (nm23-H1) serine 120 → glycine substitution in advanced stage neuroblastoma affects enzyme stability and alters protein-protein interaction. *Oncogene* 1996;12:659-667.

51. Barnes R, Masood S, Barker E, Rosengard AM, Coggin DL, Crowell T, King CR, Porter-Jordan K, Wargotz ES, Liotta LA, et al. Low nm23 protein expression in infiltrating ductal breast carcinomas correlates with reduced patient survival. *Am J Pathol* 1991;139:245-250.
52. MacDonald NJ, De La Rosa A, Benedict MA, Freije JMP, Krutzsch H, Steeg PS. A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* 1993;268:25780-25789.
53. Munoz-Dorado J, Almaula N, Inouye S, Inouye M. Autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*. *J Bacteriol* 1993;175:1176-1181.
54. Hemmerich S, Pecht I. Oligomeric structure and autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase from rat mucosal mast cells. *Biochemistry* 1992;31:4580-4587.
55. Bominaar AA, Tepper AD, Veron M. Autophosphorylation of nucleoside diphosphate kinase on non-histidine residues. *FEBS Lett* 1994;353:5-8.
56. MacDonald NJ, Freije JMP, Stracke ML, Manrow RE, Steeg PS. Site-directed mutagenesis of nm23-H1. Mutation of proline 96 or serine 120 abrogates its motility inhibitory activity upon transfection into human breast

- carcinoma cells. *J Biol Chem* 1996;271:25107-25116.
57. Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA, Steeg PS. Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 1991;65:25-33.
58. Leone A, Flatow U, VanHoutte K, Steeg PS. Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity. *Oncogene* 1993;8:2325-2333.
59. Kantor JD, McCormick B, Steeg PS, Zetter BR. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. *Cancer Res* 1993; 53:1971-1973.
60. Russell RL, Pedersen AN, Kantor J, Geisinger K, Long R, Zbieranski N, Townsend A, Shelton B, Brunner N, Kute TE. Relationship of nm23 to proteolytic factors, proliferation and motility in breast cancer tissues and cell lines. *Br J Cancer* 1998;78:710-717.
61. Lee HY, Lee H. Inhibitory activity of nm23-H1 on invasion and colonization of human prostate carcinoma cells is not mediated by its NDP kinase activity. *Cancer Lett* 1999;145:93-99.
62. Hsu S, Huang F, Wang L, Banerjee S, Winawer S, Friedman E. The role of

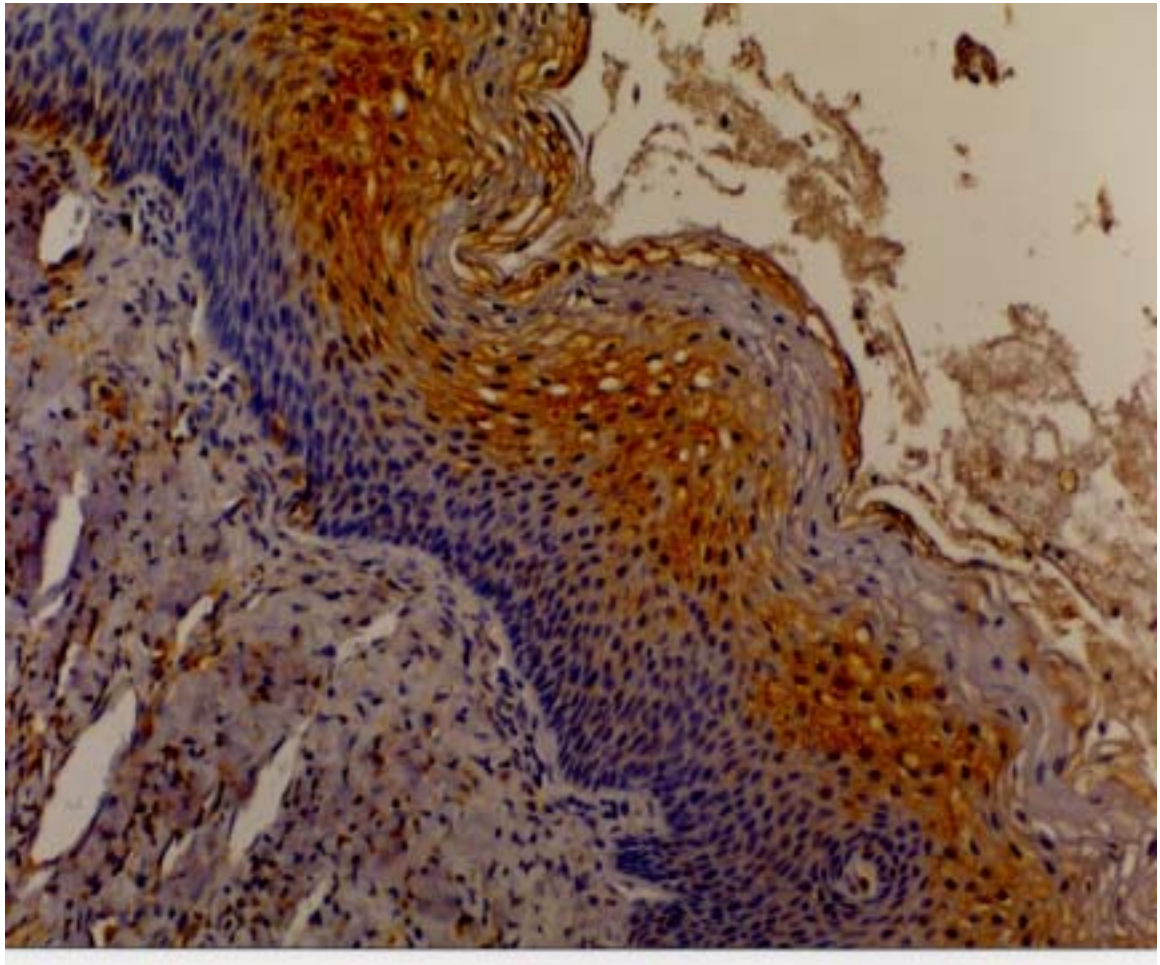
- nm23 in transforming growth factor beta 1-mediated adherence and growth arrest. *Cell Growth Differ* 1994;5:909-917.
63. Otero AS. Nm23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction. *J Bioenerg Biomembr* 2000;32:269-275.
64. Otero AS, Doyle MB, Hartsough MT, Steeg PS. Wild-type NM23-H1, but not its S120 mutants, suppresses desensitization of muscarinic potassium current. *Biochim Biophys Acta* 1999;1449:157-168.
65. Xu L, Murphy J, Otero AS. Participation of nucleoside-diphosphate kinase in muscarinic K<sup>+</sup> channel activation does not involve GTP formation. *J Biol Chem* 1996;271:21120-21125.
66. Izumiya H, Yamamoto M. Cloning and functional analysis of the ndk1 gene encoding nucleoside-diphosphate kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 1995;270:27859-27864.
67. Choi G, Yi H, Lee J, Kwon YK, Soh MS, Shin B, Luka Z, Hahn TR, Song PS. Phytochrome signalling is mediated through nucleoside diphosphate kinase 2. *Nature* 1999;401:610-613.
68. Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. A *Drosophila* gene that is homologous to a mammalian gene associated with tumor metastasis codes for a nucleoside diphosphate kinase. *Cell* 1990;63:933-940.

69. Otero AS. Copurification of vimentin, energy metabolism enzymes, and a MER5 homolog with nucleoside diphosphate kinase. Identification of tissue-specific interactions. *J Biol Chem* 1997;272:14690-14694.
70. Pinon VP, Millot G, Munier A, Vassy J, Linares-Cruz G, Capeau J, Calvo F, Lacombe ML. Cytoskeletal association of the A and B nucleoside diphosphate kinases of interphasic but not mitotic human carcinoma cell lines: specific nuclear localization of the B subunit. *Exp Cell Res* 1999;246:355-367.
71. Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A, Koteliansky V, Babinet C, Krieg T. Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 1998;111:1897-1907.
72. Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, Birembaut P. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci* 1999;112:4615-4625.
73. Fedor-Chaiken M, Meigs TE, Kaplan DD, Brackenbury R. Two regions of cadherin cytoplasmic domains are involved in suppressing motility of a mammary carcinoma cell line. *J Biol Chem* 2003;278:52371-52378.
74. Cooper GM. The cell surface. In: Cooper GM, editor. *The Cell*.

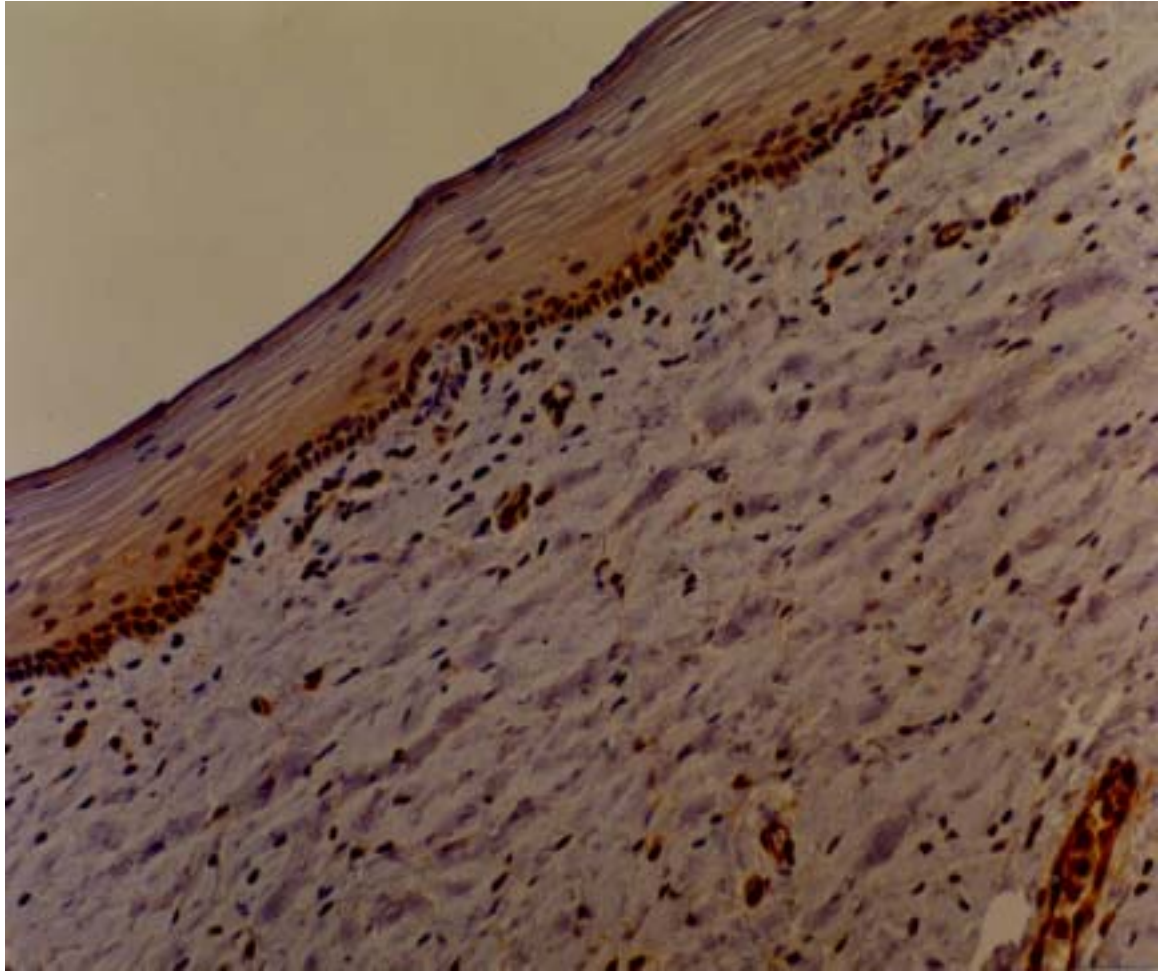
Washington, D.C.: ASM Press, 2000:510-513.

75. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.

76. Dusonchet L, Corsale S, Migliavacca M, Calo V, Bazan V, Amato A, Cammareri P, Totaro MS, Agnese V, Cascio S, La Rocca G, Sisto PS, Dardanoni G, Valerio MR, Grassi N, Latteri S, Cajozzo M, Buscemi M, Castorina S, Morello V, Tomasino RM, Gebbia N, Russo A. Nm23-H1 expression does not predict clinical survival in colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2003;10:1257-1263.

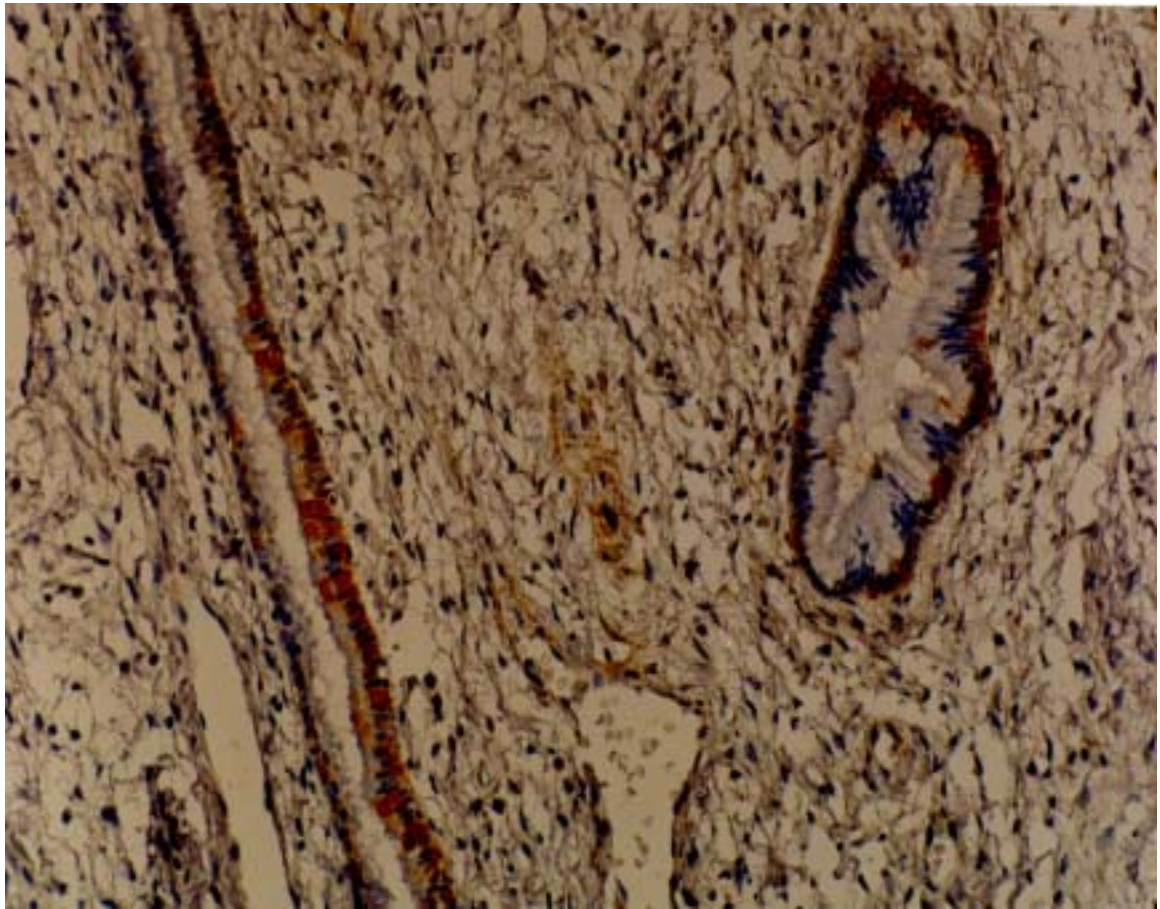


圖一 正常子宮頸鱗狀上皮組織 nm23-H1 蛋白免疫組織化學染色，於鱗狀上皮中間地帶細胞呈低度細胞質染色，大部分呈陽性染色之細胞，其染色深度皆相似，且這些呈色細胞位於基底細胞層(basal cell layer)上面，而基底細胞則不呈色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。

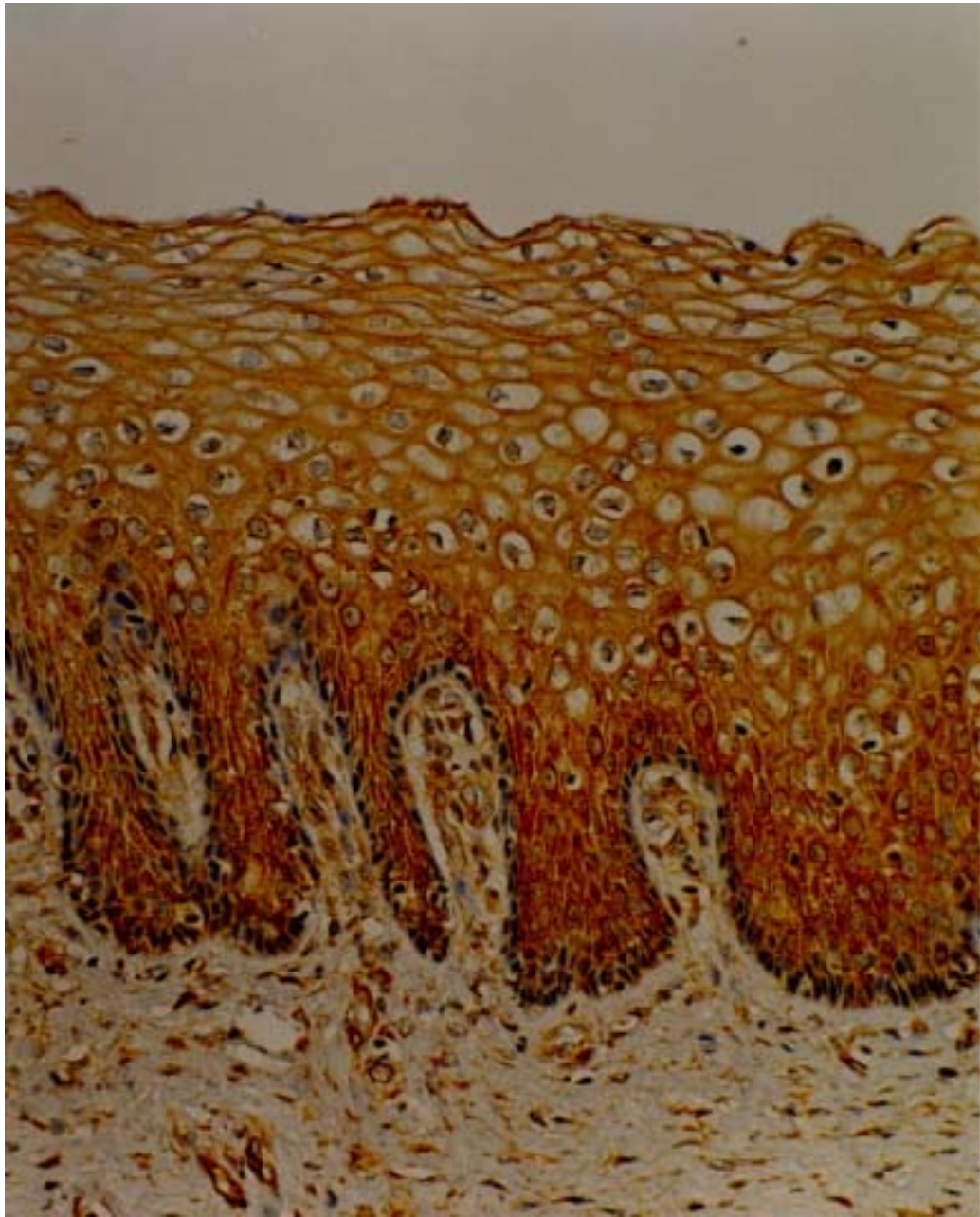


圖二 正常子宮頸鱗狀上皮裏, 偶而可以看到稀疏的 nm23-H1 蛋白核染色 ;  
免疫組織化學染色 , 圖放大約 200 倍。

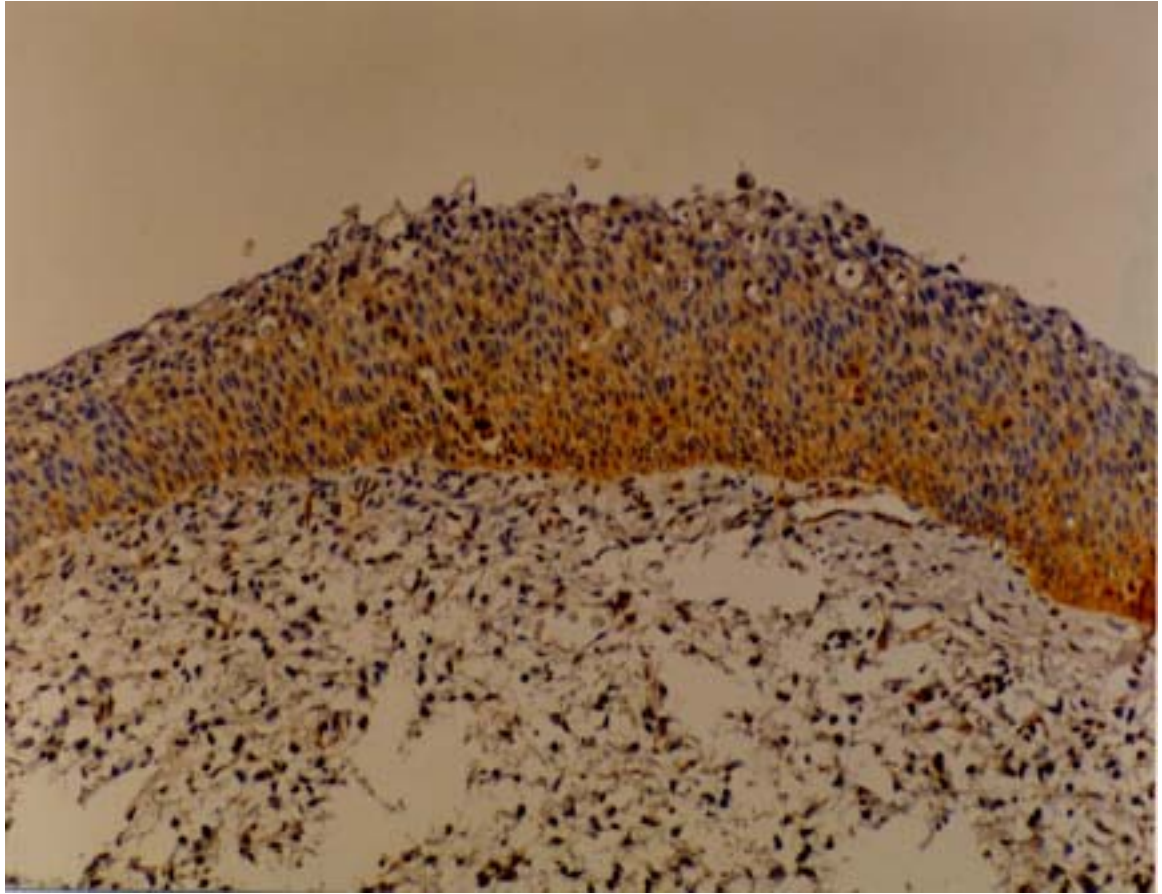




圖三 正常子宮頸內管，其柱狀上皮偶而亦可看到 nm23-H1 蛋白核染色，細胞質及基質則呈低度染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。

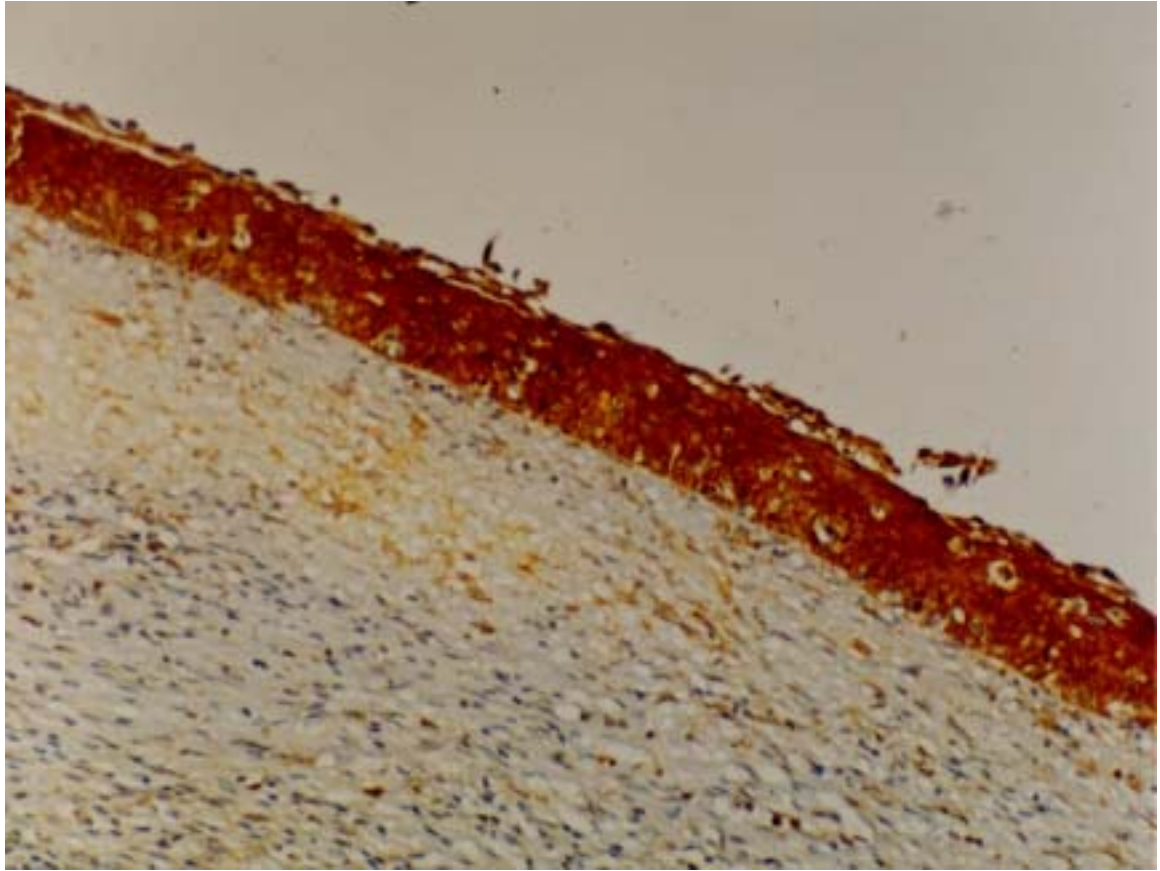


圖四 於子宮頸低度鱗狀上皮內病變且有 koilocytic atypia 病例組織裏，其整層鱗狀上皮之 nm23-H1 蛋白免疫染色均呈低度染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。

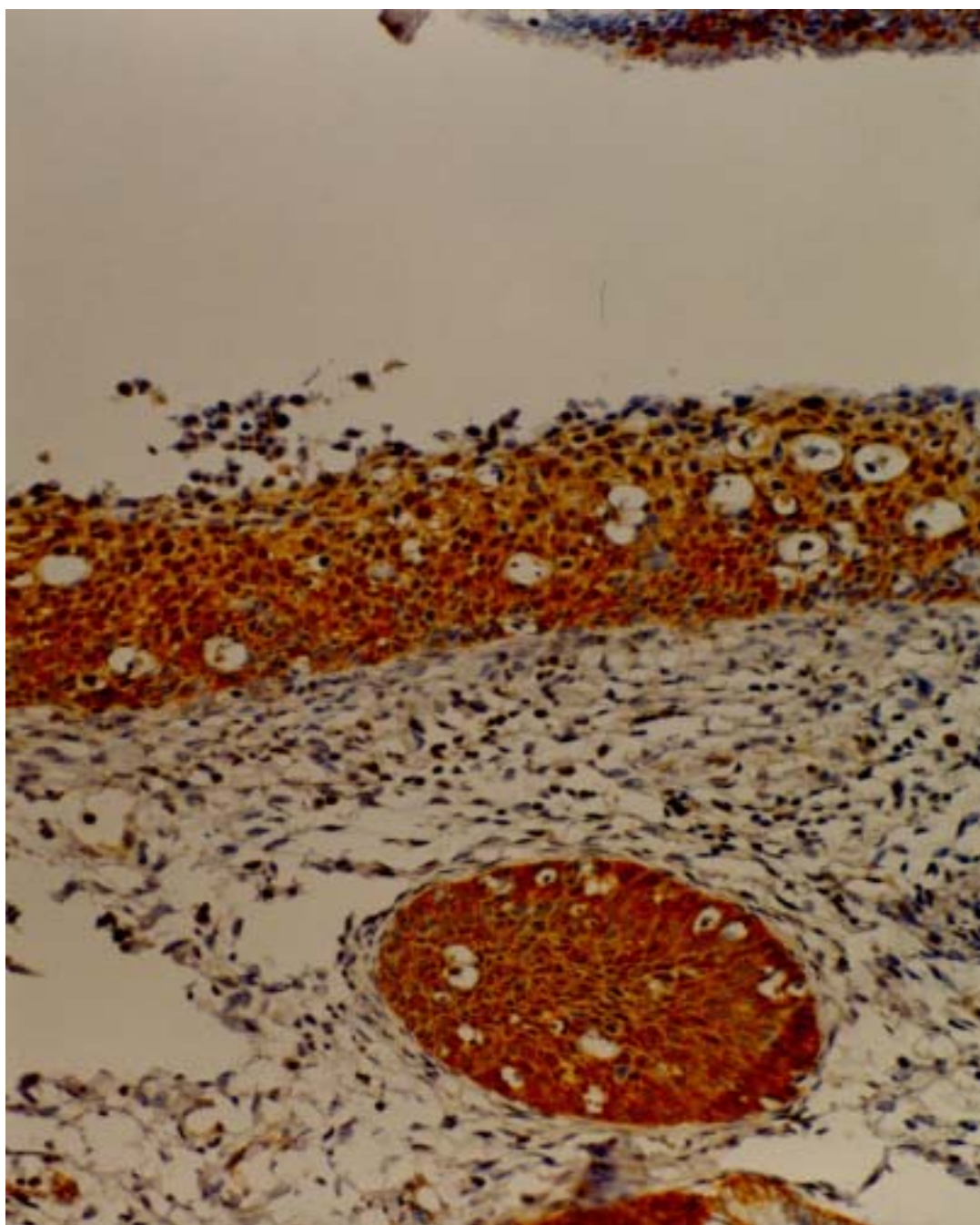


圖五 子宮頸高度鱗狀上皮內病變(原位癌病例)，nm23-H1 蛋白呈低度細胞質染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。

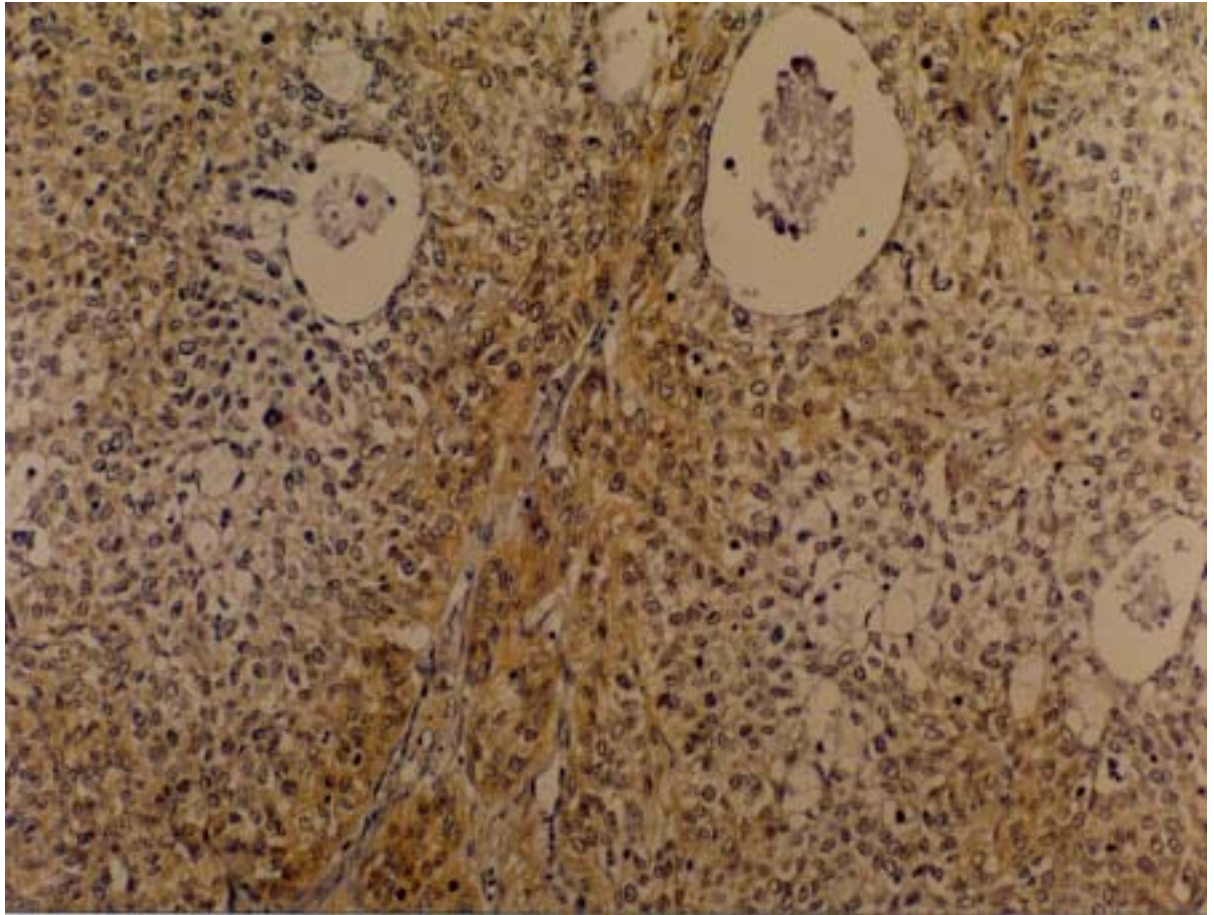




圖六 子宮頸高度鱗狀上皮內病變(原位癌病例)，nm23-H1 蛋白呈高度細胞質染色；免疫組織化學染色，圖放大約 100 倍。

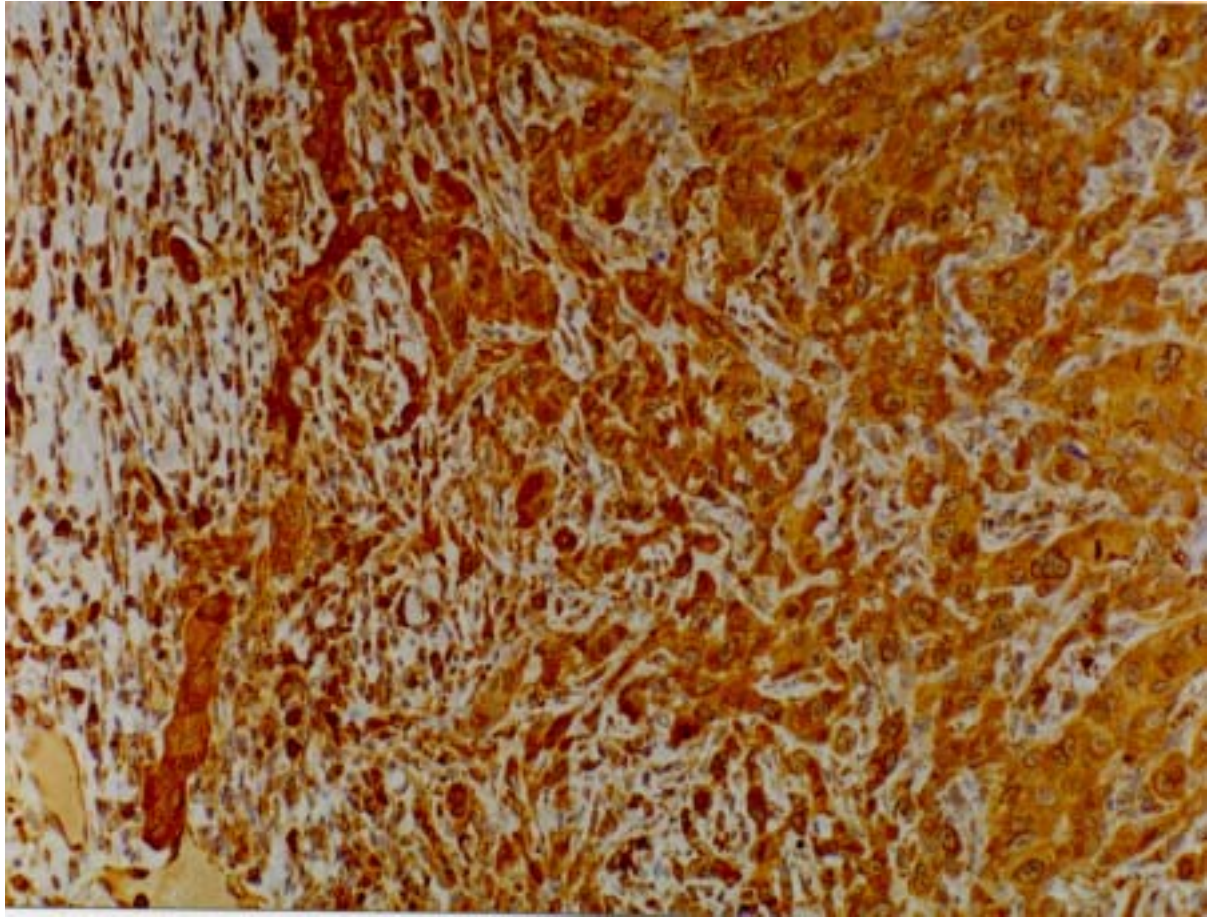


圖七 子宮頸高度鱗狀上皮內病變(原位癌且合併腺体侵犯病例), nm23-H1  
蛋白呈高度細胞質染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。

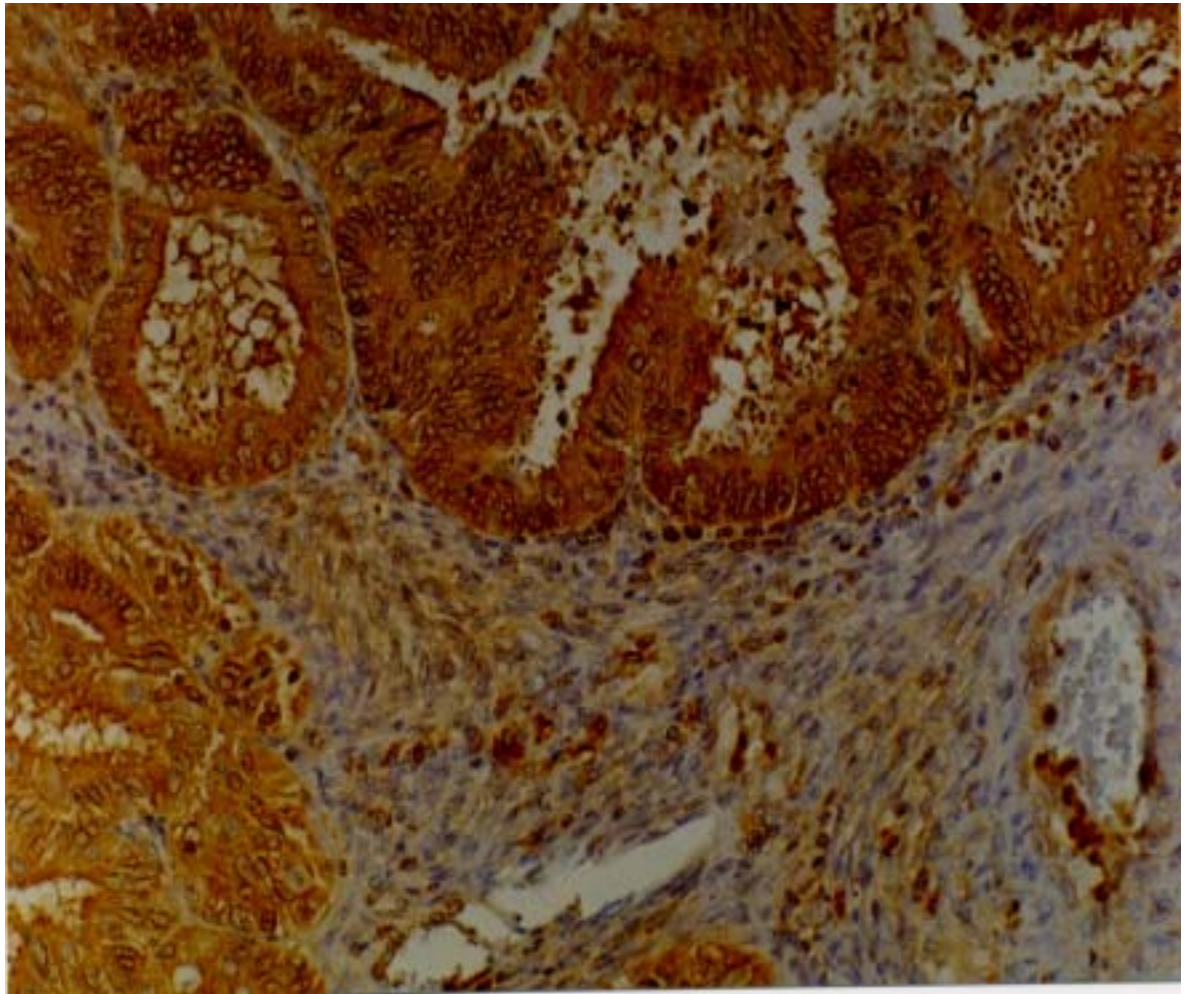


圖八 子宮頸鱗狀上皮癌中度分化病例，nm23-H1 蛋白呈低度細胞質染色；  
免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。



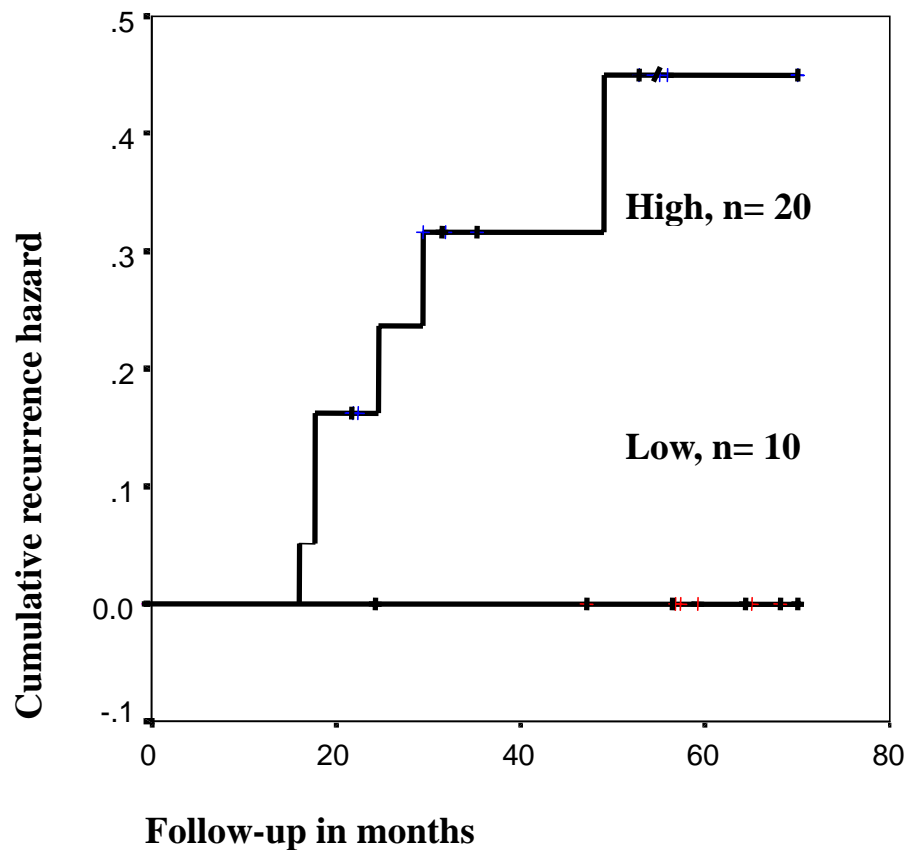


圖九 子宮頸鱗狀上皮癌低度分化病例，nm23-H1 蛋白呈高度細胞質染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。



圖十 子宮頸腺癌中度分化病例，nm23-H1 蛋白呈高度細胞質染色；免疫組織化學染色，圖放大約 200 倍。





圖十一 子宮頸鱗狀上皮癌病人依 nm23-H1 蛋白免疫組織化學表現高 (病人數：20) 和低 (病人數：10) 分成兩組，以 Kaplan-Meier 曲線來評估病人累計復發危險性，nm23-H1 蛋白高表現群有較高累計復發危險性，且有統計上的意義 (log-rank 試驗:  $p$  值= 0.0486, 自由度=1)。Cumulative recurrence hazard: 累計復發危險性。

表一 Nm23-H1 蛋白在子宮頸正常鱗狀上皮、低度和高度鱗狀上皮內病變及癌組織的免疫組織化學表現情形。

	Nm23-H1 表現	
	低	高 <sup>c</sup>
子宮頸鱗狀上皮癌 <sup>a</sup>	10	20
子宮頸高度鱗狀上皮內病變 <sup>b</sup>	8	11
子宮頸低度鱗狀上皮內病變	11	2
正常子宮頸鱗狀上皮組織	20	0

統計分析：卡方 (Chi-square) 或 Fisher's exact 試驗；卡方趨勢檢定 (Chi-square test for trend)

<sup>a</sup> 子宮頸鱗狀上皮癌和子宮頸低度鱗狀上皮內病變檢體 ( $P = 0.002$ ) 及子宮頸鱗狀上皮癌和正常子宮頸鱗狀上皮組織檢體 ( $P < 0.001$ ) 呈有意義的差異。

<sup>b</sup> 子宮頸高度鱗狀上皮內病變和子宮頸低度鱗狀上皮內病變檢體 ( $P = 0.016$ ) 及子宮頸高度鱗狀上皮內病變和正常子宮頸鱗狀上皮組織檢體 ( $P < 0.001$ ) 呈有意義的差異。

<sup>c</sup> 由卡方趨勢檢定發現由子宮頸正常鱗狀上皮、低度和高度鱗狀上皮內病變至癌組織，nm23-H1 蛋白呈現有意義上升趨勢 ( $P < 0.05$ )。

表二 Nm23-H1 蛋白在子宮頸癌不同組織型態的免疫組織化學表現情形。

	Nm23-H1 表現	
	低	高
子宮頸鱗狀上皮癌(病例數=30)	10	20
子宮頸腺細胞癌(病例數=3)		3
子宮頸明亮細胞癌(病例數=1)		1

表三 早期子宮頸鱗狀上皮癌病例 nm23-H1 免疫反應和臨床病理特徵之關係。

	N	Nm23-H1	表現	<i>P</i> <sup>a</sup>
	(總數= 30)	低	高	
年齡	30			0.431
≥ 50 歲	21	6	15	
< 50 歲	9	4	5	
分化等級	25			0.344
好，中等	19	5	14	
差	6	3	3	
基質侵犯深度	26			0.003
≥ 1/2 基質侵犯深度	10	0	10	
< 1/2 基質侵犯深度	16	10	6	
轉移 <sup>b</sup>	9	1	8	0.204
淋巴轉移	6	1	5	0.363
子宮頸旁轉移	4	1	3	0.626
陰道轉移	4	0	4	0.260
沒有轉移	21	9	12	

統計分析：Fisher's exact 試驗；*P*<sup>a</sup> < 0.05 定義為有統計意義；轉移<sup>b</sup>

指子宮頸鱗狀上皮癌病例至少有一處轉移，並和沒有轉移病例比較。

附錄

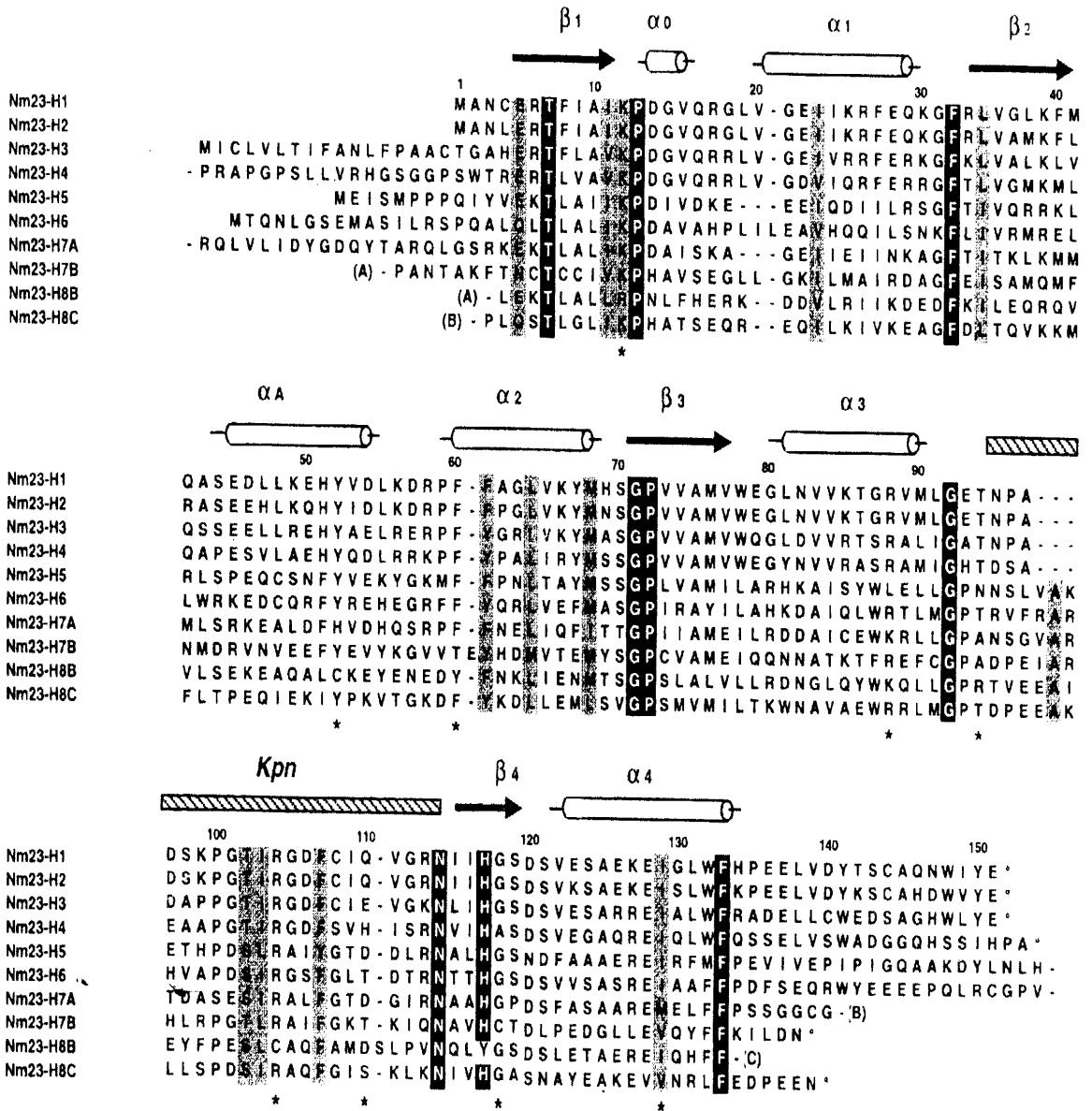
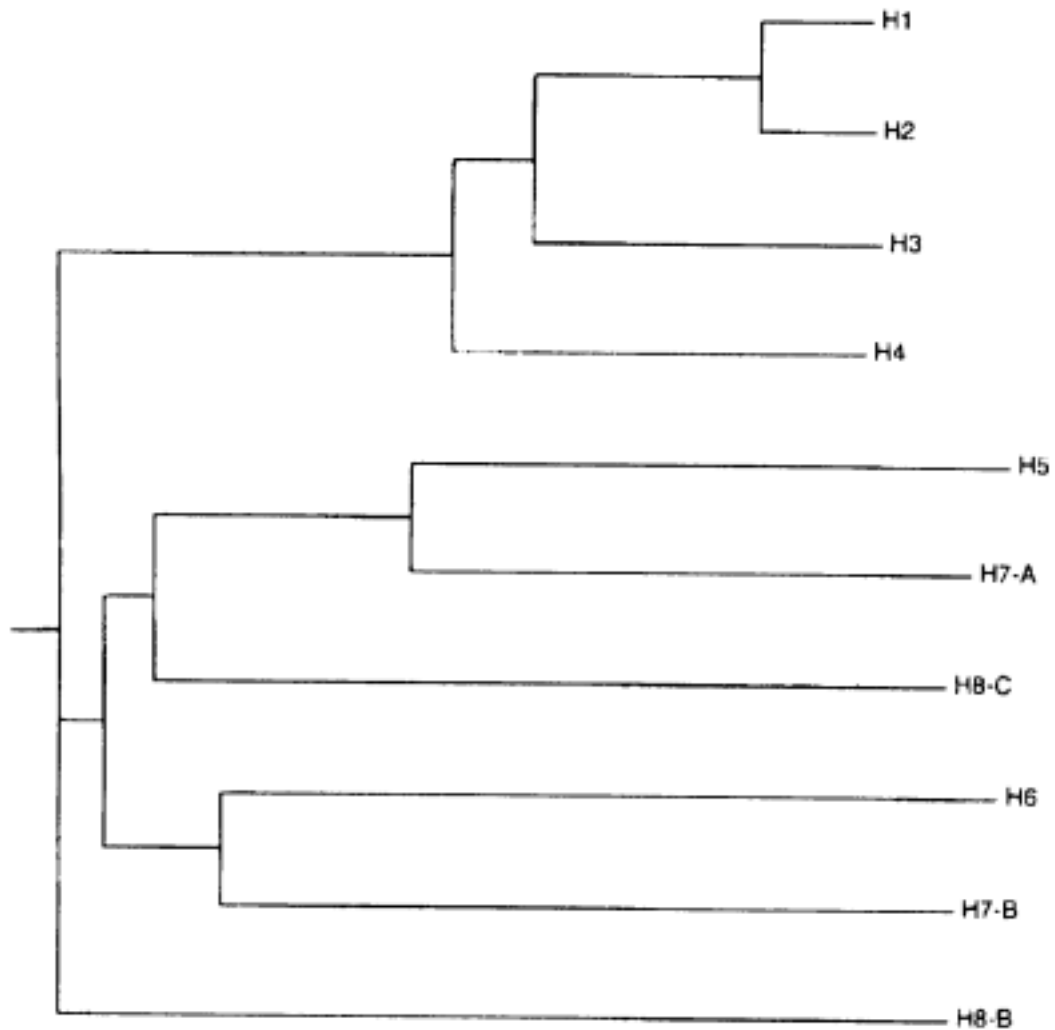


Fig. 1. Primary sequence comparison between the NDP kinase domains of the human Nm23/NDP kinase proteins. The above numbering refers to the Nm23-H1 sequence. Gaps are indicated by dashes and the COOH terminal residue by (°). The consensus sequence represents identical (black boxes) and conserved (grey boxes), according to Hanks *et al.* 1988) residues within all sequences. (\*) Indicates the residues involved in catalysis and stability. Residue 96 is the site of the Kpn mutation found in *Drosophila*. Secondary structural elements, defined in Moréra *et al.* (1995) are also indicated.

附圖一 人類 Nm23/NDP kinase 蛋白家族 NDP kinase 部分主要結構之比較  
(Reference 13)。



**Fig. 2.** Phylogenetic tree for the isoforms of the human *nm23/NDP* kinase gene family. The tree was drawn using the Phylodendron program. Information for the tree was obtained from a ClustalW alignment of sequences in Fig. 1 by using the default values and the Phylip output format option.

附圖二 人類 nm23/NDP kinase 基因家族系統圖 (Reference 13)。

附表一 人類 nm23/NDP kinase 家族 (Reference 13)。

Table 1. The Human Nm23/NDP Kinase Family

Isoform	Size (aa)	Mass (Da)	pI	Locus	Tissular expression <sup>b</sup>	Subcellular localization <sup>c</sup>	NDPK activity	Comments
Nm23-H1	152	17,149	5.83	17q21.3	Ubiquitous <sup>1</sup> (kidney, liver, intestine, brain)	Cytoplasmic	Yes	Overexpressed in tumors; inverse correlation with metastatic potential
Nm23-H2	152	17,298	8.52	17q21.3	Ubiquitous <sup>2</sup> (heart, liver, pancreas, kidney)	Cytoplasmic, nuclear	Yes	Overexpressed in tumors; transcription factor (PuF) for <i>c-myc</i> proto-oncogene
Nm23-H3	168	18,903	6.91	16q13 <sup>a</sup>	Ubiquitous <sup>1</sup> (pituitary gland, cerebellum, adrenal gland)	Cytoplasmic	Yes	Overexpression suppresses granulocyte differentiation and induces apoptosis of myeloid cells. N-terminus of 17 aa
Nm23-H4	187	20,659	10.3	16p13.3	Ubiquitous <sup>2</sup> (prostate, liver, heart)	Mitochondrial	Yes	Associated with mitochondrial membranes (contact sites?); N-terminus of 33 aa
Nm23-H5	212	24,236	5.89	5q21.3	Testis (traces in brain and kidney) <sup>2</sup>	Nd <sup>d</sup>	Not found	Expressed in male germinal cells C-extension of 51 aa
Nm23-H6	186	21,142	8.51	3p21.3	Ubiquitous (skeletal muscle, placenta) <sup>2</sup> (kidney, heart, spleen) <sup>3</sup>	Mitochondrial, Cytoplasmic	Yes	A role in regulation of cell growth and cell cycle progression?
Nm23-H7	376	42,492	6.03	1q24	Mainly in testis, <sup>3</sup> (also in liver, heart, brain, ovary, small intestine, and spleen)	Nd <sup>d</sup>	Nd	Duplicated NDP kinase domain. N-terminus of 85 aa
Nm23-H8	588	67,270	4.9	7	Mainly in testis <sup>3</sup>	Nd <sup>d</sup>	Nd	N-terminal thioredoxin domain; triplicated NDP kinase domain; human dynein IC1 equivalent?

<sup>a</sup> Another chromosomal localization was reported in 16p13.3 (GenBank acc. no: AL031718).

<sup>b</sup> The tissular expression was analyzed by hybridization of specific probes to the Human RNA Master blot (1) and to Northern blot (MTN blot) (2), both available from Clontech, and by RT-PCR (3). Tissues which present the highest expression are indicated in parenthesis.

<sup>c</sup> Chromosomal localizations of *nm23*-H1 to -H8 genes were reported by Varesco *et al.* (1992), Backer *et al.* (1993), Martinez *et al.* (1997), Milon *et al.* (1997), Munier *et al.* (1998), Mehus *et al.* (1999), and Tsuiki *et al.* (1999), Mehus and Lambeth (1999), and Mehus and Lambeth, unpublished, based on high throughput genomic DNA sequence from chromosome 7.

<sup>d</sup> nd, not determined.

## Clinical Significance of High nm23-H1 Expression in Intraepithelial Neoplasia and Early-Stage Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix

Po-Hui Wang<sup>a</sup> Jiunn-Liang Ko<sup>b</sup> Han Chang<sup>c</sup> Long-Yau Lin<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institute of Medicine, Chung Shan Medical University and Department of Obstetrics and Gynecology, Chung Shan Medical University Hospital; <sup>b</sup>Institute of Toxicology and <sup>c</sup>Department of Pathology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

### Key Words

High nm23-H1 expression · High-grade cervical intraepithelial neoplasia · Cellular proliferation · Squamous cell carcinoma · Deep stromal invasion · Cumulative recurrence hazard

### Abstract

Seventy-two cervical pathology specimens, consisting of samples of cancer and high- and low-grade intraepithelial neoplasia, were used in a study exploring the involvement of nm23-H1/NDP kinase in carcinogenesis or recurrence. Additionally, the relationships between immunohistochemical expression of nm23-H1 and various clinicopathological variables for early-stage cervical cancer were evaluated. The nm23-H1 expression for high-grade cervical intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma samples was significantly elevated when compared to low-grade analogs. Only deep stromal invasion was significantly associated with high nm23 expression. Moreover, a high cumulative recurrence hazard was demonstrated for the high nm23 expression group. In conclusion, high nm23-H1 expression may induce cellular proliferation for the progression from low- to high-

grade intraepithelial neoplasia, with the subsequent emergence of invasive carcinoma as well as deep stromal invasion, and can be used as an indicator of prognosis.

Copyright © 2003 S. Karger AG, Basel

### Introduction

It has been suggested that the nm23 gene is representative of a class of metastasis-associated genes [1]. Further, a relationship has been proposed between the product of the nm23-H1 gene, which has been identified as the nucleoside diphosphate (NDP) kinase A, and the metastatic potential of tumor cells [2]. Favorable clinical significance has been reported for nm23 overexpression in breast, hepatocellular, prostate and gastric cancers, and melanoma [3–7]. By contrast, high levels of nm23 expression have been described for metastatic carcinomas of the lung, colon, pancreas and thyroid [8–11]. Therefore, it has been hypothesized that nm23 may play a tissue-specific role, and that different regulatory mechanisms may act in different tumors.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2003 S. Karger AG, Basel  
0378-7346/03/0551-0014\$19.50/0

Accessible online at:  
www.karger.com/goi

Long-Yau Lin, MD  
Department of Obstetrics and Gynecology  
Chung Shan Medical University Hospital, 110, Section 1  
Chien-Kuo North Road, Taichung 40201 (Taiwan)  
Tel. +886 4 24739595, Fax +886 4 24738493, E-Mail obscmuh@yahoo.com.tw



## Nm23-H1 immunohistochemical expression in multisteps of cervical carcinogenesis

P.-H. WANG\*, H. CHANG†, J.-L. KO‡ & L.-Y. LIN\*

\*Institute of Medicine, †Department of Pathology, and ‡Institute of Toxicology, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

**Abstract.** Wang P-H, Chang H, Ko J-L, Lin L-Y. Nm23-H1 immunohistochemical expression in multisteps of cervical carcinogenesis. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:325-330.

To evaluate the expression of nm23-H1 protein in normal, precancerous, and cancerous tissues of the uterine cervix and its role in cervical carcinogenesis, metastasis and recurrence, 82 cervical specimens, including 30 squamous cell carcinomas (SCC), 19 high- and 13 low-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs and LSILs) and 20 normal samples, were stained using immunohistochemical method with streptavidin-biotin peroxidase immunostaining. The Chi-square and Fisher's exact tests, as well as Chi-square test for trend, were used for comparing nm23-H1 expression among normal, LSIL, HSIL, and cancerous tissues. The correlation of nm23 expression with metastasis or recurrence was analyzed using Fisher's exact test. There were significant differences in levels of nm23-H1 expression between LSIL and HSIL ( $P=0.016$ ) and between LSIL and SCC ( $P=0.004$ ), but not between HSIL and SCC or normal and LSIL samples. Furthermore, a positive relationship was demonstrated for high nm23-H1 protein expression and degree of malignant transformation ( $P<0.05$ ). Among the 30 SCC cases, high nm23-H1 expression did not show significant association with either carcinomatous metastasis or recurrence ( $P=0.123, 0.372$ , respectively). High nm23-H1 expression appears related to critical progression of LSIL to HSIL but not to metastasis or recurrence of SCC.

KEYWORDS: cervical carcinogenesis, Nm23-H1 expression, metastasis, recurrence, squamous cell carcinoma.

The nm23 protein has substantial homology with the protein encoded by a *Drosophila* abnormal wing disc (awd) developmental gene and nucleoside diphosphate (NDP) kinase, which catalyzes the phosphorylation of nucleoside diphosphates into nucleoside triphosphates<sup>(1,2)</sup>. The human nm23 gene family has been identified and includes nm23-H1, nm23-H2, DR-nm23, nm23-H4, nm23-H5 and nm23-H6<sup>(3,4)</sup>. Among these gene isotypes, nm23-H1 was the first

to be identified and has been regarded as the most representative<sup>(5)</sup>. Nm23-H2 gene has been shown to encode a protein with 88% identity to the product of nm23-H1<sup>(6)</sup>. The products of the nm23-H1 and -H2 genes are identical to human NDP kinases A and B, respectively<sup>(7)</sup>. It is well established that nm23-H1 and more questionably nm23-H2 are involved in metastatic control of some tumors. DR-nm23 and nm23-H4 display less sequence homology with the other members of this gene family<sup>(3)</sup>, while nm23-H5 is the most divergent. The roles of DR-nm23, nm23-H4 and -H5 in tumors are still unclear. Lacombe *et al.* using immunohistochemistry demonstrated increased expression of NDP kinase A in various human malignancies, including those of the cervix, but failed to demonstrate any correlation with metastatic potential<sup>(8)</sup>. Many

Address correspondence and reprint requests to: Long-Yau Lin, MD, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology, Chung Shan Medical University Hospital, 110, Section 1, Chien-Kuo North Road, Taichung Taiwan 40201 TAIWAN. Email: obscmuh@yahoo.com.tw.