

行政院國家科學委員會補助
大專學生參與專題研究計畫研究成果報告

* *****
* 計 畫
* : Cx43 與 Cav-1 基因交互作用與肺癌的相關性
* 名 稱
* *****

執行計畫學生： 陳毓婷
學生計畫編號： NSC 100-2815-C-040-032-B
研究期間： 100年07月01日至101年02月28日止，計8個月
指導教授： 李輝

處理方式： 本計畫可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學醫學系

中華民國 101年03月30日

一、摘要

根據文獻報告，癌症之產生及轉移與 GJIC 有重要之關聯性。其中組成 GJIC 的主要蛋白 Cx43 的蛋白表現量，在數種癌組織切片上，皆有過低之表現。而在肺癌組織中，Cx43 蛋白的表現量亦顯著降低。本研究室過去的研究發現肺腫瘤細胞的 Cx43 表現位置會由正常的膜表面位置改變至核或細胞質，並偵測到 Cx43 基因的突變。另一個與癌症相關的蛋白 Cav-1，被發現在不同的癌症中可能有抑癌或致癌的功能，並且其表現量與癌症的轉移、惡化有關。此外，有研究指出 Cx43 需藉由與 Cav-1 的交互作用才能發揮其對細胞的抑癌功能。為了瞭解 Cx43 與 Cav-1 蛋白在肺癌組織中所扮演的角色，本研究以免疫組織化學染色法分析 78 位肺癌患者的腫瘤組織切片，分析肺腫瘤組織中 Cx43 與 Cav-1 蛋白表現的相關性以及其與臨床因子及預後的相關性。有 74 位患者可測得 Cx43 表現，但其中 52 位(70.3%)的蛋白表現在細胞質或細胞核；有 77 位患者可測得 Cav-1 表現，表現位置改變的有 35 位佔 45.7%，此二蛋白在細胞中的表現具有正相關，顯示需藉由與 Cav-1 的交互作用才能發揮其功能。與臨床因子的相關性分析僅 Cx43 蛋白的表現位置與分期有關。轉染突變型 Cx43 基因確實使肺癌細胞增生能力增加，因此推測 Cx43 蛋白異位表現可能導致 NSCLC 患者的疾病惡化。

二、研究動機與問題

本實驗室過去在肺癌患者腫瘤組織切片中發現，有一部份的組織具有正常的Cx43蛋白表現量，但是其並不表現在細胞膜上，而是在細胞質及細胞核中，且發現其表現位置改變與其基因突變有關，但此基因突變是否影響Cx43的抑癌作用仍不清楚。

此外，過去有研究指出細胞中的Cx43蛋白與Cav-1蛋白C端結合，也有研究顯示Cx43的抑癌作用是需要藉由Cav-1蛋白，因此推測肺癌細胞中突變的Cx43會加速細胞癌化的過程可能是因為其與Cav-1的交互作用受到影響所致。因此本研究想了解的Cx43/Cav-1之間的交互作用是否因其基因突變而改變並進一步了解與肺癌形成的關連性。

本研究希望藉由檢體免疫組織化學染色法與細胞培養兩個方面的實驗，了解Cx43蛋白與Cav-1蛋白在肺癌組織中的交互作用，並藉由下列各項分析釐清此問題：

1. 肺腫瘤組織中Cx43與Cav-1蛋白的相關性。
2. 肺腫瘤組織中Cx43與Cav-1蛋白及其臨床因子、預後的相關性。
3. 肺腫瘤細胞中Cx43與Cav-1蛋白的交互作用。
4. 肺腫瘤細胞中突變之Cx43的影響。

藉由上述研究結果可了解Cx43/Cav-1交互作用在肺細胞癌化、轉移所扮演的角色。

三、文獻回顧與探討

根據衛生署統計資料顯示，自民國七十一年以來，惡性腫瘤一直是國內十大死亡原因之首位（衛生署、生命統計，1984-2000）。而 15% 至 20% 癌症死亡人數是由肺癌所造成的。肺癌初期不易發現，因此病人術後的五年存活率並不高，第一期及第二期病人的五年存活率約 25-45%（Ihde et al., 1991），而第 IIIa 期及第 IIIb 期病人的五年存活率則分別僅有 15% 及 5%。因此建立一個可靠的癌症轉移及預後指標，將對選擇肺癌治療方法時，提供良好可靠之根據。

GJIC 是細胞膜上的通道。其主要功能在進行相鄰細胞間訊息之傳遞或是小分子物質 (< 1 KD) 的運輸，例如 cAMP、鈣離子、inositol triphosphate 等小分子之交換的通道 (Lawrence et al., 1978; Saez et al., 1989)。GJIC 是由六個 Cx 為次單位，所構成的聚合體稱之為 Connexon。在數種癌症組織之中皆可觀察到 GJIC 與 Cx 蛋白表現減少，以北方墨點法、西方墨點法和免疫組織化學染色法來比對老鼠與人類肺癌細胞中的 Cx 蛋白，皆顯示出較低的表現量 (Cesen-Cummings K et al., 1998 Jan)。當 Cx43 被植入轉形的腎臟上皮細胞時，會抑制細胞的增生能力 (Chen et al., 1995)。Mesnil 等人 (1997) 的研究結果顯示，不論在體內或體外實驗均發現 Cx26 具有抑制 HeLa cell 增生的功能，因此認為 Cx26 可能是抑癌基因的一員 (Mesnil et al., 1997)。另外在其他腫瘤細胞株中轉植入 Cx 基因後，均會抑制細胞的增生。因此推測 Cx 可能在細胞癌化的過程中扮演了抑癌的角色。

在 21 種 Cx 蛋白之中，Cx43 是含量最多的 GJIC 蛋白 (Laird DW et al., 2005)，並且 Cx43 蛋白的表現可調節、影響 GJIC 的降解 (Frank DK et al., 2006)。Cx43 蛋白為 Cx43 基因轉錄的 43-kDa 蛋白，主要表現在平滑肌、上

皮、內皮、間葉細胞和肺上皮細胞的 GJIC 上(Goodenough DA et al., 1996 ; Bruzzone R et al., 1996)。本研究室利用腫瘤組織及腫瘤組織周圍之 1-5 公分之非腫瘤組織分析 Cx43 基因的變化，結果發現離腫瘤組織愈近之非腫瘤組織其蛋白的表現愈少，且癌細胞由淋巴結轉移的能力似乎與 Cx43 蛋白的減少有關。該研究更進一步分析 Cx43 蛋白，發現其減少的原因是因 Cx43 基因起始區的甲基化，使得轉錄因子無法與起始區結合啟動 Cx43 基因的轉錄作用，進而導致 Cx43 基因的不表現。由以上之研究結果推測偵測肺組織中之 Cx43 基因表現應可用來作為肺癌早期診斷之生物指標 (Chen et al., 2003)。

Caveolins 是一種膜蛋白，C-端與 N-皆在細胞質中，協助細胞中的多種訊息傳遞。Cav-1 為 Caveolin 蛋白的一員，21-24kDa，是組成 caveolae 的重要成分之一，參與許多生化感應，包括癌症的發展(R. G. Parton et al., 2007)。Cav-1 被發現會釋放一種複合物，同時有制癌與抑癌功能 (Burgermeister E et al., 2008 ; Williams TM et al., 2005)。Felicetti 等人(2009)的研究指出，原生態的 Cav-1 在黑色素瘤會促進其細胞增生、入侵、轉移(Felicetti et al., 2009 October)；同時， Li 等人(2006)在乳癌的研究報告卻顯示 P132L 突變型 Cav-1 會增加乳房細胞對雌激素的敏感性，在乳房細胞的癌化扮演重要的角色(Li et al., 2006 June)。但是在大腸癌細胞的研究之中，卻發現 Cav-1 蛋白表現量顯著降低(F. C. Bender et al., 2000)。根據以上的資料，推測 Cav-1 針對不同癌症細胞、不同受質有著相異的功能。

Cx43 蛋白的抑癌機制目前還不甚清楚，其中一個可能的機轉是透過 Cav-1 蛋白。日前有研究以免疫共沉澱法以及共定位法確定 Cav-1、Cav-2 蛋白與 Cx43 蛋白在老鼠的上皮角質細胞有交互作用，細胞中的 Cx43 蛋白與 Cav-1 蛋白在 C 端會有直接的接觸，並且 Cav 蛋白可調控 GJIC (Langlois S

et al., 2005)。進一步的研究則顯示同樣的結果也出現在人類的角質生成細胞，並且有初步的證據顯示 Cx43/Cav-1 交互作用會抑制角質生成細胞的癌化現象，確定 Cx43 的抑癌作用需要藉由 Cav-1 蛋白來執行(Stephanie Langlois et al., 2010)。因此本研究針對 Cx43 與 Cav-1 蛋白在組織的表現進行討論，觀察此二蛋白的相關性，並進一步了解 Cx43 基因突變對肺癌細胞的影響。

四、研究方法及步驟

(一)組織檢體之來源

肺癌病患肺腫瘤組織切片由台中榮民總醫院胸腔外科，彰化基督教醫院胸腔外科及中山醫學大學附設醫院病理科所取得之肺癌組織，先請病理部提供蠟塊及切片進行Cx43蛋白表現分析。組織取得均已通過人體試驗委員會同意。

(二)Cx43、Cav-1 蛋白之免疫組織染色法

(Immunohistochemistry, IHC)

將手術切除下來的組織以 4%的福馬林固定，再以石蠟包埋。將包埋好的組織以切片機切成每片厚度為 2.5 μ m，將其放在玻片上，置於 37 $^{\circ}$ C 烘箱 14-16 個小時。將組織切片放於 58-59 $^{\circ}$ C 烘箱約 10 分鐘，迅速泡入二甲苯 (Xylene) 中 20 分鐘，使組織完全脫蠟。再浸於 100%酒精 10 分鐘，95%、80%、75%酒精各 5 分鐘，最後放入一次水 (dH₂O) 中浸泡 30 秒，使組織覆水。將組織切片浸泡在 3% H₂O₂ 作用 15 分鐘，此步驟目的在於避免組織中之 peroxidase 干擾最後的呈色結果。接著放入 0.01M citrate buffer (pH=6.0) 中，以微波加熱 3 次，每次加熱 5 分鐘，待 citrate buffer 冷卻後，泡在一次水 30 秒，再將組織切片浸泡在 1xPBS 緩衝液中 5 分鐘，此步驟的目的是要將組織抗原呈現出來。以上為組織切片進行組織免疫化學染色法的前處理步驟。首先以 DAKO pen (DAKO corporation Carpinteria, CA) 將組織的部分圈選出來，置於事先裝好水的潮濕盒中。將 Cx43 與 Cav-1 一次抗體皆以 1:50 稀釋，直接將稀釋的抗體加在組織切片上，在室溫反應 2 小時後，用 1xPBS 緩衝溶液洗 3 次，每次 5 分鐘。再加入 LSAB Kit (DAKO, LSAB 2 Kit peroxidase)，於室溫作用 30 分鐘，再以 1xPBS 緩衝溶液洗 3 次，DAB

呈色 3 分鐘。呈色後的組織切片需以 haematoxylin (Merck) 染背景色，以水沖 5 分鐘，使背景呈藍紫色以方便觀察染色結果。將組織切片將切片以不同濃度的酒精 75% - 100% 等四種脫水，並以 xylene 將酒精置換出來後，再以阿拉伯膠 (Merck) 封片並進行判讀。判讀方法以 < 5% 細胞表現為負反應以 "-" 表示， $\geq 5\%$ 細胞表現為正反應以 "+" 表示，表現位置分為細胞膜、細胞質 (C)、細胞核 (N)，因細胞膜為其正常表現位置故不另外標記。

(三) 肺癌細胞株之培養

肺癌細胞株是以含 10% FBS 的 RPMI1640 培養基於 5% CO₂ 的 37°C 培養箱中進行培養。

(四) 突變型 Cx43 基因轉染細胞株之建立：

利用 PCR 反應放大原生型與 2 種突變型 Cx43 (Cx43-18 與 Cx43-57) 之全長基因，以 DNA 定序儀進行定序確認。將此片段以 GENE CLEAN III kit 純化並在 pcDNA3.1/V5-His TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, California, USA) 中與載體進行 ligation。將 ligation 後的產物送入 JM109 competent cells (ampicillin 選殖)，培養後萃取載體 DNA，再用定序儀確認接入基因之方向性及序列之正確性。將重組之 DNA 片段放大、PlasPrep Kit 純化後，以 DOTAP 轉染至 CL-3 肺癌細胞株。培養之後，加入含有 G418 的培養基以挑選穩定表現上述基因的細胞。

(五) 致腫瘤能力的改變：以 soft agar assay 方式分析

將基因轉染改變標的基因的細胞 5000 個種於含有 1% base agar 及 0.35% top agar 的培養基中培養 14-21 天，並以顯微鏡觀持查並測量其 colony 大小及數量。

(六)統計學分析

使用 SPSS statistical soft-ware program (SPSS Inc., Chicago, IL) 進行統計學的分析。Cx43/Cav-1 蛋白在肺癌細胞中的表現與肺癌預後因子 (年齡、性別、腫瘤大小、淋巴侵犯、腫瘤分期、腫瘤類型、吸菸)的相關性使用 Pearson Chi-square test、Fisher's exact test 和 Likelihood ratio test。存活曲線使用 Kaplan-Meier method and ，並且用 log-rank test 計算存活率。

五、實驗結果

5.1. Cx43 蛋白與臨床因子的關係

本研究共收集 78 位早期肺癌患者之腫瘤組織，以免疫組織化學染色法 (IHC) 進行 Cx43 和 Cav-1 的蛋白表現分析。至於 78 位肺癌患者，包括：31 位腺細胞癌 (AD) 患者及 47 位鱗狀上皮細胞癌 (SCC) 患者；若以腫瘤分期則包含：56 位第 I 期患者及 22 位第 II 期患者。結果發現，在 78 位肺癌患者的腫瘤組織中，有 74 位可測到 Cx43 正反應 (圖.1 A-D)，其陽性率為 94.9% (74/78)，包括：正常表現在細胞膜 22 位 (22/74；29.7%)，異位表現在細胞質或細胞核的有 52 位 (52/74；70.3%)。Cav-1 蛋白的免疫組織染色則顯示在 78 位患者中有 77 位患者呈現正反應 (圖.1 E-H)，陽性率 98.7%，包括：42 位正常表現在細胞膜 (42/77；54.5%)，35 位異位表現在細胞質或細胞核 (35/77；45.5%)。

Cx43 及 Cav-1 蛋白表現位置和臨床因子 (年齡、性別、腫瘤大小、淋巴侵犯、癌症分期、腫瘤類型、吸菸習慣) 之相關性如表.1.1-1.2 所示，發現僅癌症分期與 Cx43 表現位置具低度相關性 ($P=0.075$ 、 $P=0.094$)，第 I 期相較於第 II 期患者有較高之 Cx43 正常表現率，顯示 Cx43 表現與癌化程度可能有正相關，但是因樣本不足而未有足夠之信賴水準。其餘臨床因子與 Cx43 和 Cav-1 蛋白的表現位置都沒有統計上的相關性。

5.2. Cx43、Cav-1 蛋白的表現位置具相關性

過去的研究顯示，Cav-1 與 Cx43 會在細胞膜有交互作用，因此本研究進一步 Cx43 與 Cav-1 蛋白在肺癌組織中的表現位置相關性 (表.3)，結果表示當 Cx43 表現在細胞膜時，Cav-1 也表現在細胞膜的機率較高 (17/22；

77.3%); Cx43 異常表現在細胞質或細胞核時, Cav-1 異常表現的機率也較高 (29/35; 82.9%), 且此結果具有顯著意義($P=0.010$ 、 0.007 、 0.008), 推測此二蛋白在肺癌組織中的表現可能會相互影響, 造成表現位置的不同。

本研究進一步將 Cx43 與 Cav-1 蛋白表現進行分析, 觀察這兩個蛋白交互作用與臨床因子的相關性 (表.4)。在 7 項臨床因子中, 發現期別、腫瘤大小與 Cx43、Cav-1 蛋白異位表現具有低度顯著結果($P=0.091$ 、 $P=0.070$), Cx43 與 Cav-1 蛋白異位表現者在第二期患者顯著高於第一期, T2、T3 的腫瘤細胞異位表現數目也高於 T1, 表示此二蛋白異位表現的患者腫瘤惡化的可能性較高。

5.3. Cx43、Cav-1 與存活率具有相關性

我們接著依據資料繪出存活曲線並且計算存活率。結果顯示具 Cx43 異常表現的患者存活率顯著低於蛋白質正常表現在細胞膜者(圖.2); Cav-1 異常表現與存活率則有低度顯著之相關性, 異常表現之者存活率低於正常表現者(圖.3)。合併 Cx43 與 Cav-1 資料分成: 兩個蛋白皆正常表現在細胞膜、其中一個蛋白正常表現在細胞膜、兩個蛋白皆不表現在細胞膜三組, 發現 Cx43 與 Cav-1 蛋白同時正常表現在細胞膜的存活率最高, 只一個蛋白表現的存活率次之, 而兩個蛋白都不表現在細胞膜的患者則有最低的存活率(圖.4), 顯示 Cx43 與 Cav-1 交互作用與會影響其抑癌功能, 進一步影響患者之存活率, 增加樣本數有機會可以提高其信賴水準。

5.4. 突變型 Cx43 基因會使肺癌細胞的致腫瘤能力增加

本研究進一步利用突變型 Cx43 基因轉染至肺癌細胞, 希望了解 Cx43 基因突變與細胞增生能力的相關性。實驗發現突變型 Cx43 基因轉染的肺癌

細胞株其 Cx43 蛋白表顯位置會改變，而轉染原生型 Cx43 基因的肺癌細胞其 Cx43 則正常表現在細胞膜上。此外，本研究亦發現轉染突變型 Cx43 基因到肺腺瘤細胞(CL-3 cell line)時細胞的生長速度加快(圖.5)。由上述實驗推測肺腫瘤組織中的 Cx43 3 蛋白異位表現可能是基因突變所致。且會造成腫瘤細胞的增生能力增加。

六、討論

6.1. Cx43 表現與臨床因子

本研究室過去的研究發現 Cx43 蛋白在肺癌組織的表現量會降低,如 Chen 等人的實驗發現肺腫瘤組織中的 Cx43 mRNA 表現量有降低的情形(Chen et al., 2003) ; Jinn 等人用 IHC 檢驗 Cx43 蛋白並計算其陽性細胞數,發現分化較差的肺癌細胞,陽性數目顯著降低,表示 Cx43 在肺癌組織的表現與腫瘤惡化具有相關性(Jinn et al., 1998)。但在本實驗室過去在肺癌患者腫瘤組織切片中發現,有一部份的組織具有 Cx43 蛋白表現量,卻不表現在細胞膜上,而是在細胞質及細胞核中。為觀察此現象,我們進一步分析早期肺癌患者肺腫瘤組織中的 Cx43 蛋白表現情形,在 78 位患者的腫瘤切片中,有 52 個 Cx43 蛋白異位表現(52/78; 66.7%)。過去 Cx43 蛋白異位表現的報告有出現在精原細胞瘤,顯示 Cx43 蛋白異會異常堆積在細胞質,細胞膜表現量很低或偵測不到,並且此細胞 GJIC 的破壞與腫瘤的惡化有相關性(Roger et al., 2004; Mauro et al., 2008)。另一份報告則指出,大腸直腸癌的組織切片染色中 Cx43、Cx32 蛋白表現從細胞膜轉移至細胞質(Luza et al., 2010)。上述研究均顯示 Cx43 蛋白異位表現與細胞癌化具有相關性。而我們將 Cx43 表現位置與臨床因子做相關性分析,發現 Cx43 蛋白異位表現與癌症分期具有低度顯著意義(表.1.1-1.2),與精原細胞瘤、大腸直腸癌的研究有相似的結果。

6.2. Cav-1 表現與臨床因子

過去有關 Cav-1 蛋白與肺癌的相關性研究均指出 Cav-1 表現位置改變者其臨床預後較差。Yoo 等人以 IHC 染色檢測出 31.7%的 SSC 肺癌患者具有 Cav-1 蛋白表現於細胞質及細胞核,且此蛋白表現改變與腫瘤大小及期別等

臨床因子有相關性:T3 及 T4 患者之 Cav-1 蛋白陽性率遠大於 T1 及 T2 患者; 第 III 期腫瘤之 Cav-1 蛋白陽性率也高於第 II 及第 II 期(Yoo et al., 2003)。在我們報告中測得的陽性反應高達 98.7%，應是所定義的陽性反應為染色>5%，且使用聯集的方式統計結果的緣故，並且本研究室所使用的抗體也與該份報告不同。另外，針對 Cav-1 在肺癌組織的表現位置以往的研究沒有提供太多統計上的意義。我們用年齡、吸菸狀態、性別、腫瘤型態、腫瘤大小、期別、淋巴侵犯等臨床因子下去統計，也無顯著意義(表. 2.1-2.2)，但是在存活率出現低度顯著的結果($P=0.077$; 圖. 2B)，顯示 Cav-1 異位表現的患者可能會有較不好的預後。此外，有幾份研究則指出 Cav-1 蛋白在不同型態的肺癌組織扮演著不同的角色(Tatsuya Kato et al., 2004; Noriaki S et al., 2004)。但是我們統計出的 Cav-1 蛋白表現與腫瘤型態並無顯著相關性。

6.3. Cx43 與 Cav-1 表現之相關性與臨床意義

在人類的角質生成細胞中，Cx43 蛋白會與 Cav-1 蛋白 C 端結合，且 Cx43/Cav-1 交互作用會抑制角質生成細胞的癌化現象(Langlois et al., 2010)。另一份研究則以免疫共沉澱法確定老鼠的肺泡上皮細胞的 Cx43 蛋白與 Cav-1 蛋白亦有直接的接觸，且使用藥物破壞肺泡細胞後，Cav-1 蛋白的表現從細胞膜轉移到細胞質(Barth et al., 2005)。本研究分析肺癌組織 Cx43 及 Cav-1 蛋白的表現位置，發現兩者表現具有統計上的正相關(表. 3)。同時，針對臨床因子、存活率的統計則發現此二蛋白與肺癌組織的腫瘤期別、腫瘤大小及存活率有低度相關性(表. 4; 圖. 4)，推測正常的 Cx43/Cav-1 蛋白交互作用與 Cx43 的抑癌作用有關，進而影響肺癌細胞的癌化現象。

6.4. 突變型 Cx43 基因對肺癌細胞的影響

本研究室過去的研究指出 Cx43 基因轉錄起始區的甲基化，會使得轉錄因子無法與起始區結合啟動 Cx43 基因的轉錄作用，進而導致 Cx43 基因的不表現(Chen et al., 2003)。此外，本研究室過去的研究亦發現在 Cx43 蛋白異位表現的患者中，Cx43 基因突變的機率遠大於 Cx43 蛋白正常表現者。因此本研究將其中 2 種突變型 Cx43 基因轉染到肺癌細胞中，確實可導致 Cx43 蛋白異位表現在細胞質，顯示 Cx43 蛋白表現位置異常與基因突變確實有關。此外，亦發現轉染突變型 Cx43 基因的細胞其增生能力顯著增加(圖.5)，推測 Cx43 基因突變會增加肺癌細胞的致腫瘤能力。

七、結論

肺癌的初期症狀並不明顯，當出現臨床症狀時常已經有轉移的現象，因此死亡率極高。本研究以 IHC 偵測方式觀察 Cx43、Cav-1 蛋白在肺癌組織的表現，發現 Cx43 蛋白表現位置與腫瘤惡化具有相關性，並且此二蛋白的交互作用可能影響肺癌細胞的癌化現象。進一步的細胞實驗則證實突變型 Cx43 基因與肺癌細胞的致腫瘤能力有關。由此結果，除提供 IHC 早期偵測肺癌的方法之外，也初步研究 Cx43、Cav-1 蛋白在肺癌細胞的運作機轉，未來一方面可擴大樣本，增加實驗的信心水準；另一方面則應進行 Cav-1 與 Cx43 的細胞實驗，以期了解完整的作用路徑。

七、參考文獻

- Burgermeister E, Liscovitch M, Röcken C, Schmid RM, Ebert MP. Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 2008;268:187 - 201.
- Cesen-Cummings K, Fernstrom MJ, Malkinson AM, Ruch RJ. Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 1998 Jan;19(1):61-7.
- Federica F, Isabella P, Lisabianca B, Katia F, Maria CE, Carla R, Mauro B, Francesca S, Michael P. Lisanti, Massimo S, and Alessandra C. Caveolin-1 tumor-promoting role in human melanoma. *Int J Cancer.* 2009 October 1; 125(7): 1514 - 1522.
- Frank DK, Szymkowiak B, Hughes CA. Connexin expression and gap junctional intercellular communication in human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2006 Nov;135(5):736-43.
- Chen JT, Cheng YW, Chou MC, Lin TS, Lai WW, William L. Ho, and Lee H, The Correlation between Aberrant Connexin 43 mRNA Expression Induced by Promoter Methylation and Nodal Micrometastasis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Res.*, 9: 4200-4204, 2003.
- Laird DW, Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1711:172-82.
- Lawrence TS, Beer WH, Gilula NB, (1978) Hormonal stimulation and cell

communication in cocultures. *Nature* . 272, 501-506.

Langlois S, Cowan KN, Shao Q, Cowan BJ, Laird DW. Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. *Mol Biol Cell*, 19:921-28, 2005.

Mesnil M, Piccoli C, Yamasaki H, (1997) A tumor suppressor gene, Cx26, also mediates the bystander effect in HeLa cells. *Cancer Research* . 57, 2929-2932.

Stephanie L, Kyle N. Cowan, Qing Shao, Bryce J. Cowan, and Dale W. Laird. The tumor-suppressive function of connexin43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1. *Cancer Res*;70(10) May 15, 2010.

Li TH, Federica S, Magalis A. Vuolo, Li M, Yang WC, Richard G. Pestell, Joseph A. Sparano, and Michael P. Lisanti. Caveolin-1 Mutations in Human Breast Cancer :Functional Association with Estrogen Receptor α -Positive Status. *Am J Pathol.* ; 168(6): 1998 - 2013. 2006 June.

Williams TM, Lisanti MP. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer and metastasis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2005;288:494 - 506.

Goodenough DA. Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 475-502.

Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.

- Bender F.C., Reymond M.A., Bron C., Quest A.F., Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity, *Cancer Res.* 60 (2000) 5870 – 5878
- Parton R.G., Simons K., The multiple faces of caveolae, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 185 – 194.
- Roger C, Mograbi B, Chevallier D, Michiels JF, Tanaka H, Segretain D, Pointis G, Fenichel P. Disrupted traffic of connexin 43 in human testicular seminoma cells: overexpression of Cx43 induces membrane location and cell proliferation decrease. *J Pathol.* 2004 Feb;202(2):241-6
- LUIZA KK, MARIUSZ K, STANISLAW S, ANDRZEJ W, BOGDAN Z and MARIOLA S, Gradual Loss of Functional Gap Junction within Progression of Colorectal Cancer – A Shift from Membranous CX32 and CX43 Expression to Cytoplasmic Pattern During Colorectal Carcinogenesis , *in vivo* 24: 101-108 (2010)
- Mauro V., Chevallier D., Gilleron J., Defamie N., Carette D., Gasc J.M., Senegas-Balas F., Segretain D. and Pointis G., Aberrant Cytoplasmic Accumulation of Connexin 43 in Human Testicular Seminoma, *The Open Biomarkers Journal*, 2008, 1, 20-27
- Rafael M, Amalia FM, Rosa R, Lisardo B, and Paloma MS, Dispensability and Dynamics of Caveolin-1 During Liver Regeneration and in Isolated Hepatic Cells, *Hepatology* Volume 46, Issue 3, Article first published online: 25 JUL 2007
- Elena S, Silvia M, Mimma M, Giuseppina DS, Silvana C, Antonella T, Binding of nuclear caveolin-1 to promoter elements of

growth-associated genes in ovarian carcinoma cells,
Experimental Cell Research, 2007

Noriaki S, Kuniharu M, Makoto S, Different Roles for Caveolin-1 in the
Development of Non-Small Cell Lung Cancer versus Small Cell
Lung Cancer, Cancer Res, 2004

Tatsuya K, Masaki M, Kentaro K, Yasushi C, Tomoo I, Toshiaki M, Shunichi
O, Satoshi K, Toshiro O, Hiroyuki K, Difference of caveolin-1
expression pattern in human lung neoplastic tissue. Atypical
adenomatous hyperplasia, adenocarcinoma and squamous cell
carcinoma, Cancer Letters , 2004

Yoo SH, Park YS, Kim HR, Sung SW, Kim JH, Shim YS, Lee SD, Choi YL,
Kim MK, Chung DH, Expression of caveolin-1 is associated with
poor prognosis of patients with squamous cell carcinoma of the
lung, Lung Cancer, 2003

Yasuto J, Masahiko I, Fumiaki M, Expression of connexin32 and
connexin43 gap junction proteins and E-cadherin in human lung
cancer, Cancer Letters, 1998

Barth K., Gentsch M., Bla"sche R., Pfu"ller A., Parshyna I., Koslowski
R., Barth G., Kasper M., Distribution of caveolin-1 and
connexin43 in normal and injured alveolar epithelial R3/1 cells,
Histochem Cell Biol, 2005

八、表與圖

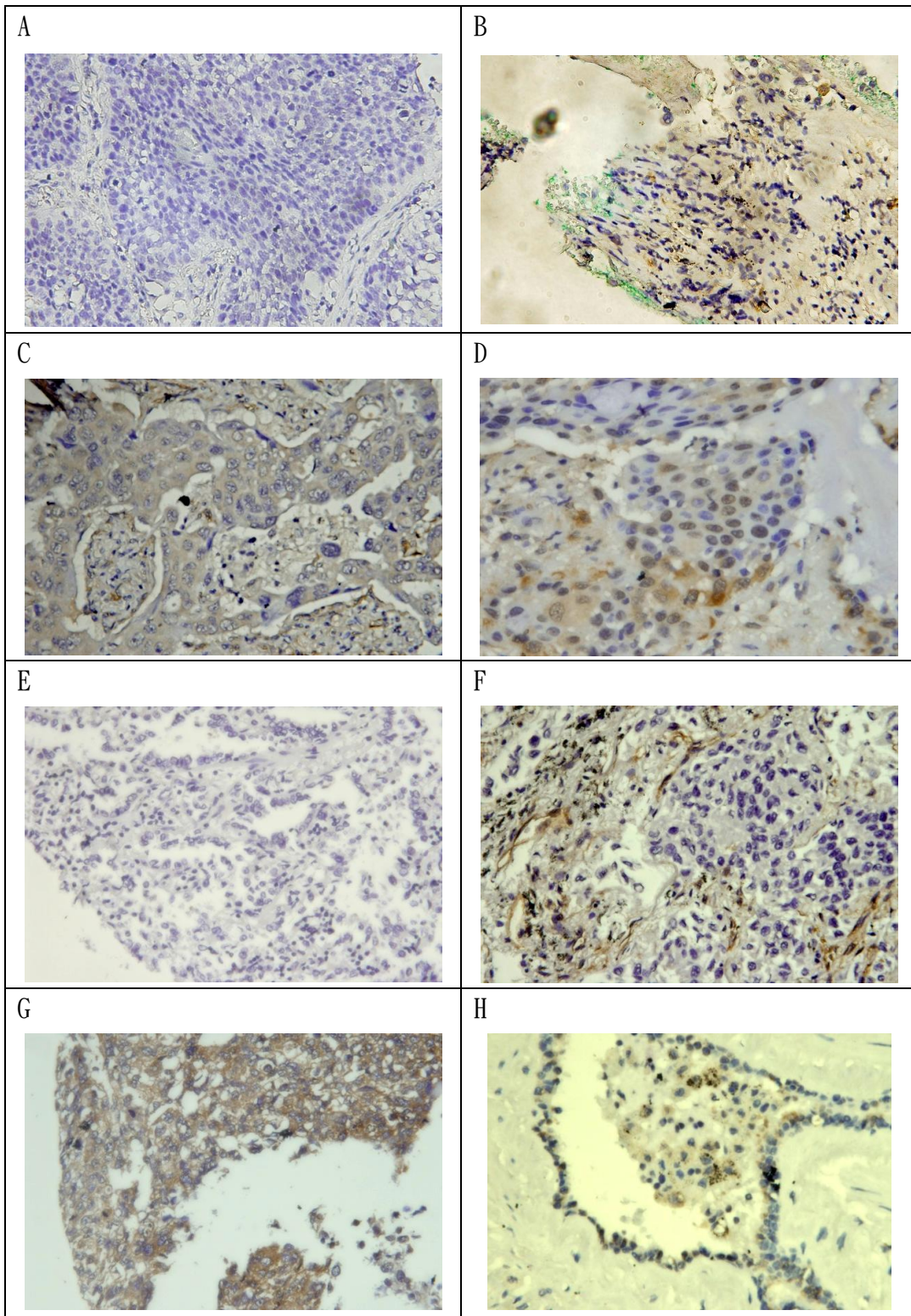


圖. 1 Cav-1、Cx43 免疫染色結果(400X) A. Cx43 負反應 B. Cx43 細胞膜正反應, C. Cx43 細胞質正反應, D. Cx43 細胞核正反應, E. Cav-1 負反應, F. Cav-1 細胞膜正反應, G. Cav-1 細胞質正反應, H. Cav-1 細胞核正反應

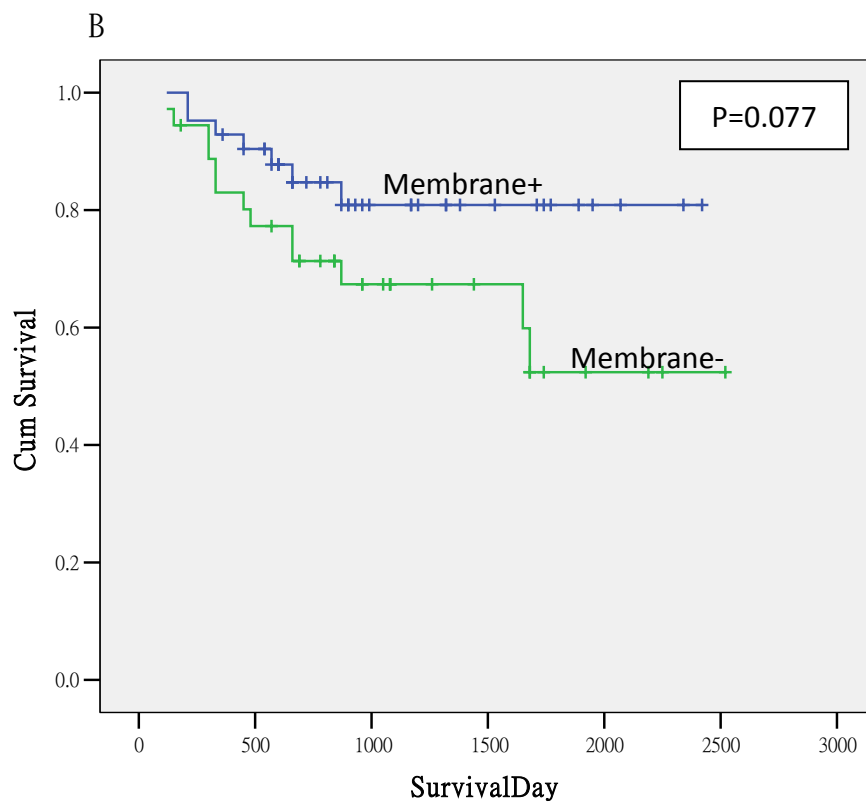
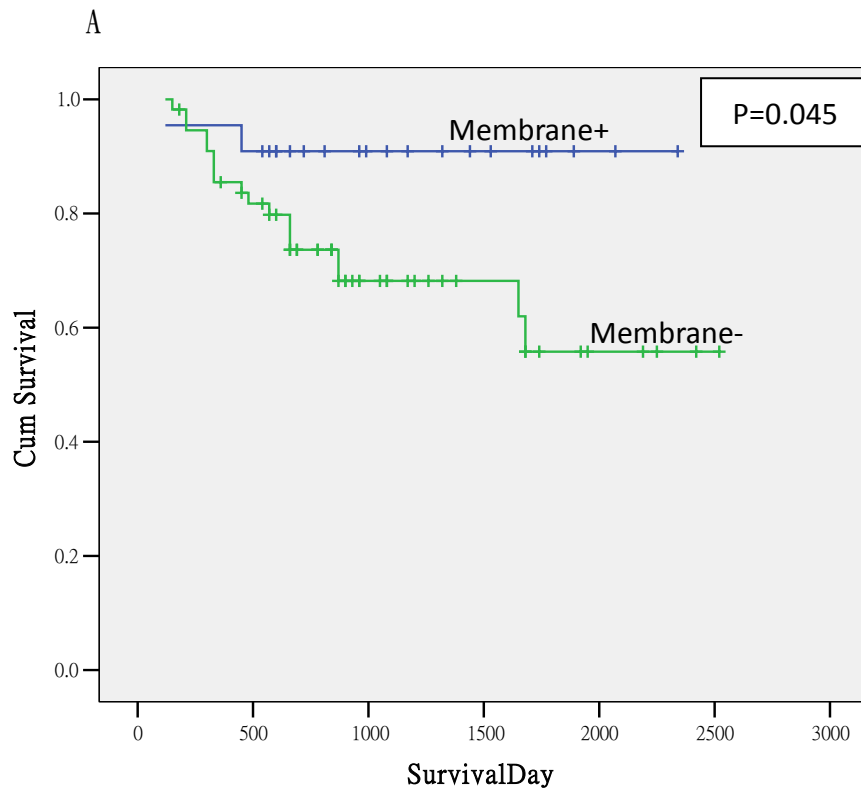


圖.2 蛋白質的膜表現之存活曲線；A. Cx43蛋白 B. Cav-1蛋白

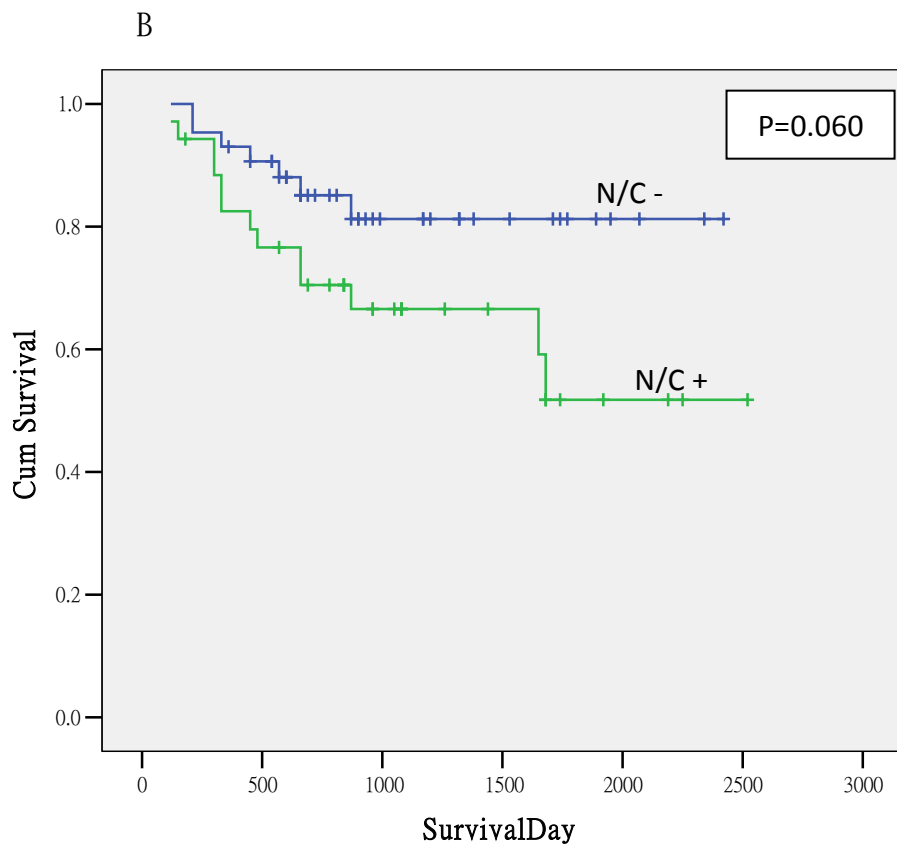
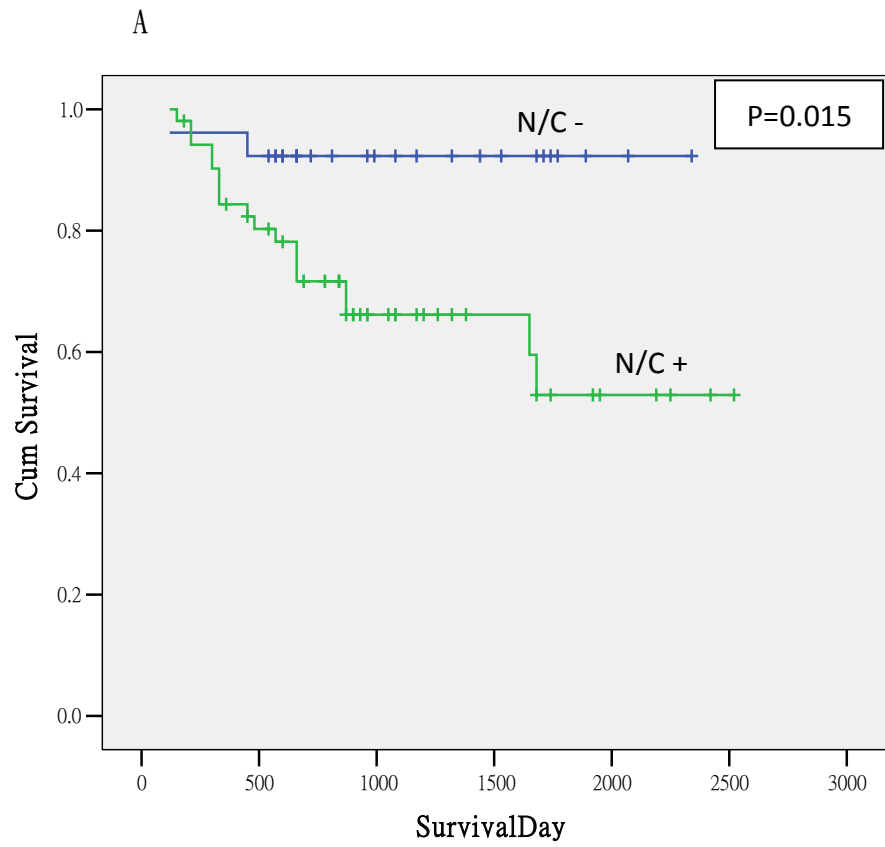


圖. 3 蛋白質的核或質表現之存活曲線；A. Cx43蛋白 B. Cav-1蛋白

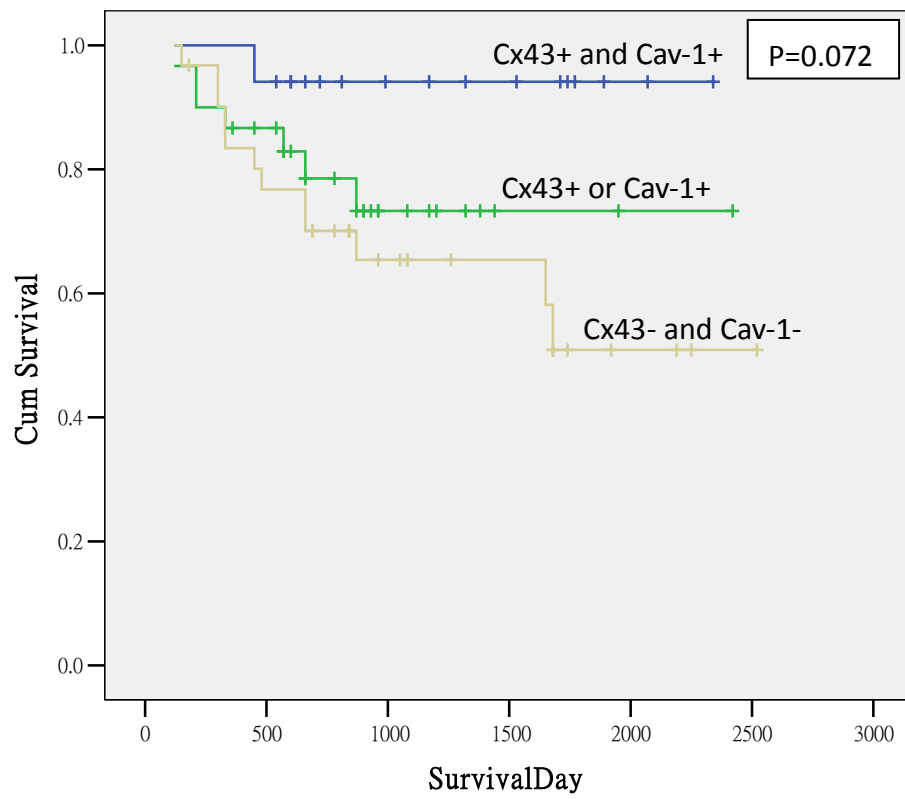


圖. 4 Cx43 與 Cav-1 膜表現之存活曲線

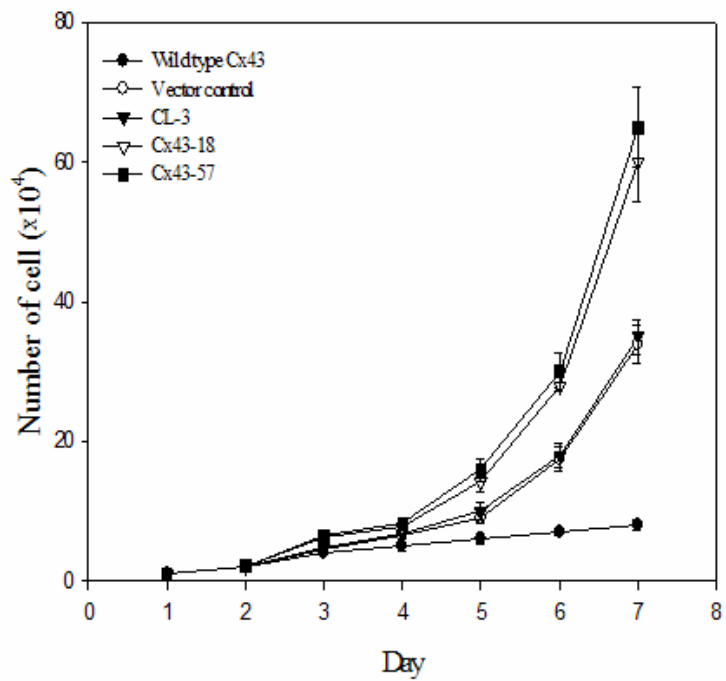


圖.5 不同 Cx43 基因轉染的 CL-3 肺腺瘤細胞之細胞生長情形

表. 1.1 Cx43 蛋白表現位置與臨床因子的關係

| | 病例數 | Cx43 膜 IHC | | P value |
|---------|-----|------------|-----------|---------|
| | | + | — | |
| 總人數 | 78 | 22 | 56 | |
| 年齡 | | | | |
| <59.8 | 29 | 7(9.0%) | 22(28.2%) | P=0.542 |
| ≥59.8 | 49 | 15(19.2%) | 34(43.6%) | |
| Sex | | | | |
| Male | 57 | 18(23.1%) | 39(50.0%) | P=0.278 |
| Female | 21 | 4(5.1%) | 17(21.8%) | |
| Type | | | | |
| AD | 47 | 12(15.4%) | 35(44.9%) | P=0.521 |
| SCC | 31 | 10(12.8%) | 21(26.9%) | |
| 吸菸習慣 | | | | |
| No | 38 | 10(12.8%) | 28(35.9%) | P=0.720 |
| Yes | 40 | 12(15.4%) | 28(35.9%) | |
| 癌症分期 | | | | |
| IA+IB | 56 | 19(24.4%) | 37(47.4%) | P=0.075 |
| IIA+IIB | 22 | 3(3.8%) | 19(24.4%) | |
| 腫瘤大小 | | | | |
| T1 | 17 | 7(9.0%) | 10(12.8%) | P=0.198 |
| T2 | 56 | 14(17.9%) | 42(53.8%) | |
| T3 | 5 | 1(1.3%) | 4(5.1%) | |
| 淋巴侵犯 | | | | |
| N0 | 63 | 20(25.6%) | 43(55.1%) | P=0.157 |
| N1 | 15 | 2(2.6%) | 13(16.7%) | |

＋：Cx43 蛋白表現在 membrane

—：Cx43 蛋白表現在 Cytoplasm、Nucleus 或不表現

AD: adenocarcinoma; SCC: squamous cell carcinoma

表. 1. 2 Cx43 蛋白異位表現與臨床因子的關係

| | 病例數 | Cx43 IHC | | P value |
|---------|-----|-----------|-----------|---------|
| | | 膜+ | 核+/質+ | |
| 總人數 | 74 | 22 | 52 | |
| 年齡 | | | | |
| <59.8 | 27 | 7(9.5%) | 20(27.0%) | P=0.590 |
| ≥59.8 | 47 | 15(20.3%) | 32(43.2%) | |
| Sex | | | | |
| Male | 54 | 18(24.3%) | 36(48.6%) | P=0.268 |
| Femle | 20 | 4(5.4%) | 16(21.6%) | |
| Type | | | | |
| AD | 45 | 12(16.2%) | 33(44.6%) | P=0.476 |
| SCC | 29 | 10(13.5%) | 19(25.7%) | |
| 吸菸習慣 | | | | |
| No | 37 | 10(13.5%) | 27(36.5%) | P=0.613 |
| Yes | 37 | 12(16.2%) | 25(33.8%) | |
| 期別 | | | | |
| IA+IB | 54 | 19(25.7%) | 35(47.3%) | P=0.094 |
| IIA+IIB | 20 | 3(4.1%) | 17(23.0%) | |
| 腫瘤大小 | | | | |
| T1 | 16 | 7(9.5%) | 9(12.2%) | P=0.178 |
| T2 | 53 | 14(18.9%) | 39(52.7%) | |
| T3 | 5 | 1(1.4%) | 4(5.4%) | |
| 淋巴侵犯 | | | | |
| N0 | 60 | 20(27.0%) | 40(54.1%) | P=0.163 |
| N1 | 14 | 2(2.7%) | 12(16.2%) | |

核+/質+：Cx43 蛋白表現在細胞核或細胞質

膜+：Cx43 蛋白表現在細胞膜

表. 2.1 Cav-1 蛋白表現位置與臨床因子的關係

| | 病例數 | Cav-1 膜 IHC | | P value |
|---------|-----|-------------|-----------|---------|
| | | + | — | |
| 總人數 | 78 | 42 | 36 | |
| 年齡 | | | | |
| <59.8 | 29 | 16(20.5%) | 13(16.7%) | P=0.857 |
| ≥59.8 | 49 | 26(33.3%) | 23(29.5%) | |
| Sex | | | | |
| Male | 57 | 30(38.5%) | 27(34.6%) | P=0.725 |
| Female | 21 | 12(15.4%) | 9(11.5%) | |
| Type | | | | |
| AD | 47 | 25(32.1%) | 22(28.2%) | P=0.887 |
| SCC | 31 | 17(21.8%) | 14(17.9%) | |
| 吸菸習慣 | | | | |
| No | 38 | 21(26.9%) | 17(21.8%) | P=0.808 |
| Yes | 40 | 21(26.9%) | 19(24.4%) | |
| 期別 | | | | |
| IA+IB | 56 | 32(41.0%) | 24(30.8%) | P=0.355 |
| IIA+IIB | 22 | 10(12.8%) | 12(15.4%) | |
| 腫瘤大小 | | | | |
| T1 | 17 | 11(14.1%) | 6(7.7%) | P=0.260 |
| T2 | 56 | 29(37.2%) | 27(34.6%) | |
| T3 | 5 | 2(2.6%) | 3(3.8%) | |
| 淋巴侵犯 | | | | |
| N0 | 63 | 35(44.9%) | 28(35.9%) | P=0.537 |
| N1 | 15 | 7(9.0%) | 8(10.3%) | |

＋：Cav-1 蛋白表現在 membrane

—：Cav-1 蛋白表現在 Cytoplasm、Nucleus 或不表現

表. 2. 2 Cav-1 蛋白異位表現與臨床因子的關係

| | 病例數 | Cav-1 IHC | | P value |
|---------|-----|-----------|-----------|---------|
| | | 膜+ | 核+/質+ | |
| 總人數 | 77 | 42 | 35 | |
| 年齡 | | | | |
| <59.8 | 28 | 16(20.8%) | 12(15.6%) | P=0.731 |
| ≥59.8 | 49 | 26(33.8%) | 23(29.9%) | |
| Sex | | | | |
| Male | 57 | 30(39.0%) | 27(35.1%) | P=0.572 |
| Female | 20 | 12(15.6%) | 8(10.4%) | |
| Type | | | | |
| AD | 46 | 25(32.5%) | 21(27.3%) | P=0.966 |
| SCC | 31 | 17(22.1%) | 14(18.2%) | |
| 吸菸習慣 | | | | |
| No | 37 | 21(27.3%) | 16(20.8%) | P=0.710 |
| Yes | 40 | 21(27.3%) | 19(24.7%) | |
| 期別 | | | | |
| IA+IB | 55 | 32(41.6%) | 23(29.9%) | P=0.314 |
| IIA+IIB | 22 | 10(13.0%) | 12(15.6%) | |
| 腫瘤大小 | | | | |
| T1 | 17 | 11(14.3%) | 6(7.8%) | P=0.275 |
| T2 | 55 | 29(37.7%) | 26(33.8%) | |
| T3 | 5 | 2(2.6%) | 3(3.9%) | |
| 淋巴侵犯 | | | | |
| N0 | 62 | 35(45.5%) | 27(35.1%) | P=0.497 |
| N1 | 15 | 7(9.1%) | 8(10.4%) | |

核+/質+：Cav-1 蛋白表現在細胞核或細胞質

膜+：Cav-1 蛋白表現在細胞膜

表. 3 Cav-1 與 Cx43 表現位置之相關性

| | 病例數 | Cav-1 膜 IHC | | P value |
|--------|-----|-------------|-----------|---------|
| | | + | — | |
| 總人數 | 78 | 42 | 36 | |
| Cx43 膜 | | | | |
| + | 22 | 17(21.8%) | 5(6.4%) | P=0.010 |
| — | 56 | 25(32.1%) | 31(39.7%) | |

+: 蛋白正常表現在細胞膜

—: 蛋白未正常表現在細胞膜

| | 病例數 | Cav-1 核/質 IHC | | P value |
|----------|-----|---------------|-----------|---------|
| | | — | + | |
| 總人數 | 78 | 43 | 35 | |
| Cx43 核/質 | | | | |
| — | 26 | 20(25.6%) | 6(7.7%) | P=0.007 |
| + | 52 | 23(29.5%) | 29(37.2%) | |

+: 蛋白異位表現在細胞核或細胞質

—: 蛋白未表現在細胞核或細胞質

| | 病例數 | Cav-1 IHC | | P value |
|-------|-----|-----------|-----------|---------|
| | | 膜+ | 核+/質+ | |
| 總人數 | 73 | 22 | 51 | |
| Cx43 | | | | |
| 膜+ | 39 | 17(23.3%) | 5(6.8%) | P=0.008 |
| 核+/質+ | 34 | 22(30.1%) | 29(39.7%) | |

膜+: 蛋白正常表現在細胞膜

核+/質+: 蛋白異位表現在細胞核或細胞質

表. 4 Cav-1 與 Cx43 表現位置與臨床因子之相關性

| | 病例數 | Cx43/Cav-1 IHC | | P value |
|---------|-----|----------------|-----------|---------|
| | | — | + | |
| 總人數 | 78 | 17 | 61 | |
| 年齡 | | | | |
| <59.8 | 29 | 7(9.0%) | 22(28.2%) | P=0.702 |
| ≥59.8 | 49 | 10(12.8%) | 39(50.0%) | |
| Sex | | | | |
| Male | 57 | 13(16.7%) | 44(56.4%) | P=0.723 |
| Female | 21 | 4(5.1%) | 17(21.8%) | |
| Type | | | | |
| AD | 47 | 9(11.5%) | 38(48.7%) | P=0.489 |
| SCC | 31 | 8(10.3%) | 23(29.5%) | |
| 吸菸習慣 | | | | |
| No | 38 | 9(11.5%) | 29(37.2%) | P=0.696 |
| Yes | 40 | 8(10.3%) | 32(41.0%) | |
| 期別 | | | | |
| IA+IB | 56 | 15(19.2%) | 41(52.6%) | P=0.091 |
| IIA+IIB | 22 | 2(2.6%) | 20(25.6%) | |
| 腫瘤大小 | | | | |
| T1 | 17 | 7(9.0%) | 10(12.8%) | P=0.070 |
| T2 | 56 | 9(11.5%) | 47(60.3%) | |
| T3 | 5 | 1(1.3%) | 4(5.1%) | |
| 淋巴侵犯 | | | | |
| N0 | 63 | 16(20.5%) | 47(60.3%) | P=0.117 |
| N1 | 15 | 1(1.3%) | 14(17.9%) | |

＋：Cx43 或 Cav-1 蛋白異位表現

—：Cx43 和 Cav-1 蛋白正常表現在細胞膜