

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

人類乳癌中 cytosolic carbonic anhydrases 差異性表現與  
癌瘤細胞生長關係之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2320-B-040-061-

執行期間：93年08月01日至94年07月31日

執行單位：中山醫學大學醫學系生物化學科

計畫主持人：謝易修

共同主持人：葉坤士

報告類型：精簡報告

處理方式：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 94 年 10 月 17 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

## 人類乳癌中 cytosolic carbonic anhydrases 差異性 表現與癌瘤細胞生長關係之研究

計畫編號：NSC 93-2320-B-040-061

執行期限：93年08月01日至94年07月31日

計畫主持人：謝易修 中山醫學大學生化所

計畫參與人員：楊順發 中山醫學大學生化所

葉坤土 彰化基督教醫院病理科

### 一、中文摘要

carbonic anhydrase(CA)廣泛的存在於許多組織中。而 CA 也在離子平衡及酸鹼恆定中扮演著很重要的角色。而目前亦有許多文獻證明不同的 CA 在腫瘤形成的過程中十分重要。例如在 Pancreatic and colorectal tumors 中 CAI & CAII 則是顯著降低，所以 CA 可當作是 cell proliferation index。而 CAIX (MN protein)在 cervical carcinoma、colorectal tumors 及 renal cell carcinoma 中則是顯著升高，故可當成 tumor marker；以及 CAXII 在 renal cell carcinoma 中被發現有 over-expression 現象。而我們實驗室也發現在肺癌病人的肺臟組織中及肝癌病人的肝臟組織中其 CA I、II 及 III 的蛋白濃度及 mRNA 濃度都比鄰近正常組織來的低。而在組織免疫染色中也看到相同的結果。從以上的結果，我們發現 CA 的確在一些癌症的發生過程中扮演著很重要的角色。至於 CA I、II 及 III 與 breast cancer 的關係直至目前尚未有文獻提出，因此我們利用 CA 的活性分析方法、RT-PCR 及 western blotting 分析 60 位罹患乳癌病人的檢體組織中 carbonic anhydrases 的含量。我們發現在乳癌病人的檢體組織中，其 CA 的活性都比鄰近正常組織來的高。而在 protein 及 mRNA 的分析中，也發現 CAII 的濃度有相同的結果。但 CAI 及 CA III 卻出現相反的結果。另外，我們利用病人的 stage 來做區分，發現 Stage IV 的 CA activity 遠高於 stage I ( $P < 0.05$ )。另外，我們也利用線性分析發現其 tumor sizes 和 CA activity 有明顯的相關性 ( $R = 0.48$   $P < 0.05$ )。從以上的結果，我們發現在乳癌病人的檢體組織中其 CA 的活性及 CAII 的 mRNA 濃度及都偏高。因此我們猜

測在腫瘤的侵襲與轉移過程中，CA 扮演著非常重要的角色。

關鍵詞：Keywords: Carbonic anhydrase ;乳癌

### 二前言

碳酸酐酶素 (carbonic anhydrase, CAs, E.C. 4.2.1.1)是一種 zinc metalloenzyme,廣泛存在於Archaea 原核生物 (prokaryotes) 及真核生物 (eukariotes)中[1-5]。於這些生物 CAs 共演化成三個不同基因群 (gene family):  $\alpha$ -CA,  $\beta$ -CA 及  $\gamma$ -CA; 所有哺乳動物的 CA 屬 $\alpha$ -CA, 結構為monomer; 植物及eubacteria 的CA是  $\beta$ -CA, 結構為 octamer; archaeobacterium, algae and green plants細胞質中的 CA 屬  $\gamma$ -CA, 結構為 hexamer [1-5]。在高等脊椎動物中目前已有 14 種不同的 CA 異構酶素 (CA isozymes) 或 CA- 相關蛋白質被鑑定出 [2-14]。這些蛋白質其正常生理角色為參與呼吸 (respiration), 參與代謝中組織與肺臟之間 (metabolizing tissues)  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  運送, 維持組織與肺臟之 pH 值平衡 (pH homeostasis), 參與許多組織器官電解質的分泌 (electrolyte secretion), 參與多種生物合成反應例如 lipogenesis、gluconeogenesis、ureagenesis [1-14]。

而CA其分子量約為30,000左右, 在1933年首先於紅血球中被發現[15], 1940年以後發現腎小管中亦含有高濃度的CA, CA廣泛分佈於動、植物, 主要是催化 $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ 可逆性水解反應[16], 在二氧化碳的輸送、鈣化及光合作用(photosynthesis)方面非常重要[17], 在哺乳動物中維持離子平衡及酸鹼恆定亦扮演重要角色。

## A. Carbonic anhydrase family

1. 存於細胞質的 CAI、II、III：負責離子交換( $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ， $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ )，CAI 是人類紅血球中除了血紅素外最主要的蛋白質，含量大約是 CAII 的 5~6 倍，但活性卻只有 CAII 的 15% [18]。CAII 分布非常廣泛，包括骨組織的噬骨細胞、肝細胞、腎臟細胞、紅血球等。
2. 與細胞膜相關的 CAIV：含量較少，主要是負責幫助二氧化碳排出細胞外。
3. 存於粒線體的 CAV：是負責幫助二氧化碳排出粒線體外，在肝臟粒線體之肝醣生成及尿素生成反應中也扮演重要的角色 [19-20]。
4. 分泌型 CAVI、CAVII：CAVI、CAVII 主要表現在唾液腺，包括唾液中碳酸根離子的分泌[21]。而 CAVI 與 CAII 一樣具有水解  $\text{CO}_2$  的能力，亦可調節唾液中的 pH 值。
5. CAIX 及 CA-related protein: CAIX 是位於細胞表面上的 transmembrane protein，分子量大約為 58kDa，在癌症組織中均有發現[22]，在腎癌病人組織中更有大量表現 [23]。

## 三、研究目的

目前研顯示 CAs 與 nervous system tumors progression 的程度並無相關性 [24,25]; pancreatic 及 colorectal tumors 中 CAI 及 CAII 則是顯著降低 [26-29]; 而且與 tumors progression 的程度呈反相關性[27]。而 CAIX (MN protein) 在 cervical carcinoma, colorectal tumors 及 renal cell carcinoma 中則是顯著升高 [30-43]，CAIX 在 renal cell carcinoma 中則是有 overexpression 現象[44-48]; 而我們實驗室也發現在肺癌病人的肺臟組織中及肝癌病人的肝臟組織中其 CAI、II 及 III 的蛋白濃度及 mRNA 濃度都比鄰近正常組織來的低。而在組織免疫染色中也看到相同的結果[49-50]。至於 CA 與 breast cancer 的關係直至目前尚未有文獻提出，而國人罹患乳癌且因而死亡人數相當高，所以值得深入探討 CAs 與乳癌之間關係如何？研究目的含以下三點：

- (1). 以 immunoblot 分析 60 個乳癌患者其 tumor tissues 與 adjacent normal tissues 中 cytosolic CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量變化以及探討其變化量

是否與 tumor progression 的程度有相關性？

- (2). 以 enzyme assays 分析乳癌患者其 tumor tissues 與 adjacent normal tissues 中 CA 活性是否隨著 CAI, CAII 及 CAIII 蛋白量的變化而改變
- (3). 以 RT-PCR 分析乳癌的組織中 CAI, CAII 及 CAIII 以獲知影響乳癌 tumor tissue 與 adjacent normal tissue 中 CAI, CAII 及 CAIII 蛋白表現量的變化是在蛋白質層次或在 RNA 層次。

## 四、材料與方法

### 1. 檢體來源:

檢體來源來自彰化基督教醫院病理科。

### 2. 組織研磨萃取:

每 1mg 組織以 10  $\mu\text{l}$  PBS buffer 研磨萃取，之後離心 10000g, 30 分鐘，所取得上清液是為細胞質部份(cytosol)。

### 3. 蛋白濃度測定

蛋白質的定量是採用 Bradford protein assay 方法，其原理為蛋白質可與 Coomassie brilliant blue G-250 形成藍色複合物，當藍色越深表示蛋白含量越高。測試方法首先以一系列已知濃度 BSA 加入五分之一體積的 Bradford protein dye，以波長 595nm 可見光之吸光度做一標準曲線，再以同樣的方法測得樣品之 O.D. 值，即可根據標準曲線求得樣品蛋白之濃度。

### 4. Western blotting

首先製備 12.5% SDS-PAGE 電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 $\mu\text{l}$  sample(蛋白總量 20 $\mu\text{g}$ )，加入 4 $\mu\text{l}$  loading buffer，將 sample denature (99 $^\circ\text{C}$ ，10 min)之後再 loading 到電泳片中，以 140 伏特進行電泳分離。大約 3 小時之後，將膠拆下後進行蛋白轉移，將膠體置入冰冷之 transfer buffer，將預先浸濕的 NC paper 蓋在膠體上面後裝入 Transfer Holder，於 4 $^\circ\text{C}$  下，以 100 伏特進行轉漬 1 小時之後，取出 NC paper 加入 Blocking buffer，在室溫下搖動一個小時。然後加入一級抗體於 TBS buffer，在 4 $^\circ\text{C}$  下反應 overnight，之後以 washing buffer(TBS+0.05% Tween 20)清洗三次，每一次 10 分鐘。接著再加入二級抗體於 TBS buffer，於室溫作用二個小時，之後以 washing buffer 清洗三次，每一次 10 分鐘。最後加入 25ml substrate buffer 進行呈色反

應，待 NC paper 上有明顯的 band 出現，即  
以水終止反應，並晾乾。

### 5. 萃取組織 RNA

取組織約 100mg 置入研磨管，加入 1ml  
solution D ( 4M GNTC , 25mM sodium  
citrate , 0.5% sarcosyl , 0.1M 2-mercapto-  
ethanol ) 研磨，研磨完後把研磨液各取 0.5ml  
置入 1.5ml 離心管，加入 Sodium acetate  
(2M , pH4.0) 50 $\mu$ l , chloroform 100 $\mu$ l 及  
phenol ( pH4.0 ) 0.5ml 混合均勻後在冰上靜  
置，再拿起來 mix，重複冰上靜置及 mix，  
再放到冰上靜置 5 分鐘後，離心 (12000g，  
2 分鐘)，取離心管的上層(RNA 及水層)到新的  
離心管，並加入等體積的 chloroform-  
phenol 混合液混合均勻，再離心 (12000g，  
2 分鐘)，吸上層到新的離心管，再加入等  
體積的 chloroform-phenol 混合液混合均  
勻，重複此步驟直到分層中看不見白色蛋白  
質沉澱後，把水層吸到新的離心管並加入等  
體積的 isopropanol，混合均勻後放到-20  
冰箱靜置，直到要使用時再拿去離心  
(12000g，4 分鐘，30 分鐘)，此時 RNA 會形  
成一白色沉澱，將 isopropanol 倒掉後，以  
75% ethanol wash 之後，將 75% ethanol 倒掉  
並吸乾，加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 溶解  
RNA，測量其 260nm 吸光值並計算 RNA 濃  
度。

### 6. RT-PCR

RT (reverse transcription) : 取 2 $\mu$ g 的  
RNA，加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 後到 33 $\mu$ l，  
以 70 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘。再加入 RNase inhibitor  
( 40U/ $\mu$ l ) 0.25 $\mu$ l，再加入 5X RT buffer 10 $\mu$ l  
及 dNTP(2.5mM) 4 $\mu$ l，和 Oligo dT 1 $\mu$ l (50  
pmole/ $\mu$ l)及 RTase 1 $\mu$ l (200U/ $\mu$ l)，在 42 $^{\circ}$ C 反  
應 1 小時之後，改以 99 $^{\circ}$ C 作用 5 分鐘後保  
存在 4 $^{\circ}$ C。

PCR (polymerase chain reaction) : 取 5 $\mu$ l  
cDNA 加入適量的 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 26 $\mu$ l，加  
入 primer-5'和 primer-3' 各 5 $\mu$ l，加入 3.2 $\mu$ l  
dNTP (2.5mM)及 5 $\mu$ l 10X PCR buffer 最後  
再加入 DNA polymerase 1 $\mu$ l (2U/ $\mu$ l)，置於  
溫度循環機 94 $^{\circ}$ C 1 分鐘之後，annealing  
溫度 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 2 分鐘共 30 個循環，  
最後再以 72 $^{\circ}$ C 反應 20 分鐘，並於 4 $^{\circ}$ C 保存。

### 8. DNA 電泳

配置 DNA gel。取 10 $\mu$ l 的 PCR 產物加  
上 2 $\mu$ l 的 6 倍 loading dye，加到 DNA gel。

於電壓 100V，進行電泳 45 分鐘之後，以  
1 $\mu$ g/ml Ethidium bromide 染色，再以 ddH<sub>2</sub>O  
退染，於 UV 燈下分析並記錄。

### 9. CA 之活性測定

CA activity 的測定是採用酵素與受質  
結合的方式，其原理為 CA 會與其受質對硝  
基苯乙酸酯(*p*-nitrophenyl acetate, *p*-NPA)結  
合，產生對硝基酚離子(*p*-nitrophenolate  
anion)此黃色物質，以波長 405nm 測定單位  
時間內對硝基酚離子吸收度的變化，並換算  
成濃度的改變量以求得紅血球中 CA 的活  
性。

### 五、結果與討論

我們收集 60 位罹患乳癌病人的乳房病  
變組織及其週遭的較正常組織，利用 CA  
activity assay 及 western blotting 分析乳癌組  
織中 carbonic anhydrase 的含量。我們發  
現在乳癌病人的乳房組織中，其 CA 總活  
性都比鄰近正常組織來的高( $P < 0.001$ )(Fig.1)。

另外，我們利用 western blotting 分析  
乳癌病人組織中 carbonic anhydrase I、II 及 III  
的蛋白濃度。我們發現在乳癌病人的組織  
中，其 CA II 的蛋白濃度都比鄰近正常組  
織來的高，但其 CA I 及 III 的蛋白濃度卻  
比鄰近正常組織來的低(Fig.2)。

而我們更利用 RT-PCR 來分析乳癌病  
人的組織中 carbonic anhydrase I、II 及 III  
的 mRNA 變化情形。我們發現在乳癌病  
人的組織中，其 CA II 的 mRNA level 都  
比鄰近正常組織來的高，但其 CA I 及 III  
的 mRNA level 卻比鄰近正常組織來的低  
(Fig.3)。

接著我們將這些乳癌病人的期數歸類  
並分析其乳癌的期數與活性的相關性。結  
果我們發現在 abnormal tissue 中的 CA  
activity 和乳癌病人的期數有明顯的相關  
性(Fig.4)。另外我們也利用線性迴歸分  
析 CA activity 與其腫瘤大小的相關性，  
我們發現其 tumor sizes 和 CA activity  
有明顯的相關性 ( $R = 0.48$   $P < 0.05$ )  
(Fig.5)。從以上的結果，我們發現在  
乳癌病人的乳房組織中其 CA 的活性及  
CAII 的蛋白濃度及 mRNA 濃度都偏高。  
因此我們猜測在腫瘤的侵襲與轉移過程  
中，CA 扮演著非常重要的角色。也許抑  
制了 CA 的活性會降低乳癌的擴大及轉  
移。

### 六、參考文獻

1. Maren TH. The links among biochemistry, physiology and pharmacology in carbonic anhydrase mediated systems. In: Carbonic Anhydrase - From Biochemistry and Generics to Physiology and Clinical Medicine. Botre F, Gros G, Storey BT (Eds.), VCH, Weinheim 1991; 186-207.
2. Supuran CT: Carbonic anhydrase inhibitors. In: Carbonic Anhydrase and Modulation of Physiologic and Pathologic Processes in the Organism. Puscas I (Ed.) Helicon, Timisoara, Romania 1994; 29-111.
3. Hewett-Emmett D: Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families. In: Carbonic Anhydrase - New Horizons. Chegwiddden WR, Edwards Y, Caner N (Eds.), Birkhauser, Basel 2000; 36-124.
4. Hewett-Emmett D, Tashian RE: Functional diversity, conservation and convergence in the evolution of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -carbonic anhydrase gene families. *Mol. Phyl. Evol.* 1996;5:50-77.
5. Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG: Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96:15184- 15189.
6. Cabisco E, Levine RL: Carbonic anhydrase III oxidative modification in vivo and loss of phosphatase activity during aging. *J. Biol. Chem.* 1995; 270:14742- 14747.
7. Parkkila AK, Scarim AL, Parkkila S, Waheed A, Corbett JA, Sly WS: Expression of carbonic anhydrase V in pancreatic beta cells suggests role for mitochondrial carbonic anhydrase in insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:24620-24623.
8. Baird TT, Waheed A, Okuyama T, Sly WS, Fierke CA: Catalysis and inhibition of human carbonic anhydrase IV, *Biochemistry* 1997; 36:2669-2678.
9. Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK et al.: Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology.* 1997; 112:398-408.
10. Lovejoy DA, Hewett-Emmett D, Porter CA et al. Evolutionary conserved. 'acatalytic' carbonic anhydrase-related protein XI contains a sequence motif present in the neuropeptide sauvagine: the human CA-RP XI gene (CA11) is embedded between the secretor gene cluster and the DBP gene at 19q13.3, *Genomics* 1998; 54:484-493.
11. Earnhart JN, Qian M, Tu C, Lakkis MM et al.: The catalytic properties of murine carbonic anhydrase VII. *Biochemistry* 1998; 37:10387-10845.
12. Bellingham J. Gregory-Evans K, Gregory-Evans C: Sequence and tissue expression of a novel human carbonic anhydrase-related protein, CARP-E, mapping to chromosome 19q13.3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; 253:364-367.
13. Turecio, Sahin U, Vplllmar E et al.: Human carbonic anhydrase XII: cDNA cloning, expression and chromosomal localization of a carbonic anhydrase gene that is overexpressed in some renal cell cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:7608-7613.
14. Mori K, Ogawa Y, Ebihara K et al.: Isolation and characterization of CA XIV, a novel membrane-bound carbonic anhydrase from mouse kidney. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:15701-15705.
15. Iverson T.M., Alber B.E., Kisker C., Ferry J.G., Rees D.C.: A closer look at the active site of gamma-class carbonic anhydrase: high-resolution crystallographic studies of the carbonic anhydrase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* 2000; 39:9222-31.
16. Chegwiddden WR, Carter ND. Introduction to the carbonic anhydrase. *EXS.* 2000; 13-28.
17. Ren X, Lindskog S. Buffer dependence of CO<sub>2</sub> hydration catalyzed by human carbonic anhydrase I. *Biochem Biophys Acta.* 1992; 1120: 81-6.
18. Sly WS, Hu PY. Human carbonic anhydrase and carbonic anhydrase deficiencies. *Ann Rev Biochem.* 1995; 64: 375-401.
19. Parkkila A K, Parkkila S, Serlo W, Reunanen M, Vierjoki T, Rajaniemi H. A competitive dual-label time-resolved immunofluorometric assay for simultaneous detection of carbonic anhydrase I and II in cerebrospinal fluid. *Chimica Acta.* 1994; 230:81-9.

20. Parkkila S, Parkkila AK, Juvonen T, Rajaneimi H. Distribution of the carbonic anhydrase isoenzymes I, II and VI in the human alimentary tract. *Gut* 1994; 35:646-50.
21. Cabiscol E, Levine RL. Carbonic Anhydrase III. *J Biol Chem.* 1995; 270:14742-7.
22. Mode A, Gustafsson JA, Jansson JO, Eden S, Isaksson O. Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. *Endocrinology* 1982; 111:1692-7.
23. Earnhardt JN, Qian M, Tu CK, Lakkis MM, Bergenhem NCH, Laipis PJ, Tashian RE, Silverman DN. The catalytic properties of murine carbonic anhydrase VII. *Biochemistry* 1998; 37:10837-45.
24. Nakagawa Y, Perentes E, Rubinstein LJ. Non-specificity of anticarbonic anhydrase C antibody as a marker in human neurooncology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1987; 46:451-60.
25. Parkkila AK, Herva R, Parkkila S, Rajaniemi H. Immunohistochemical demonstration of human carbonic anhydrase isoenzyme II in brain tumours. *Histochem. J.* 1995; 27:974-82.
26. Kivela AJ, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Parkkila TS, Rajaniemi H. Differential expression of cytoplasmic carbonic anhydrases, CA I and II, and membrane-associated isozymes, CA IX and XII, in normal mucosa of large intestine and in colorectal tumors. *Dig. Dis. Sci.* 2001; 46:2179-86.
27. Bekku S, Mochizuki H, Yamamoto T, Ueno H, Takayama E, Tadakuma T. Expression of carbonic anhydrase I or II and correlation to clinical aspects of colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2000; 47:998-1001.
28. Nishimori I, Fujikawa Adachi K, Onishi S, Hollingsworth MA. Carbonic anhydrase in human pancreas: hypotheses for the pathophysiological roles of CA isozymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999; 880:5-16.
29. Nishimori I, Onishi S. Carbonic anhydrase isozymes in the human pancreas. *Dig. Liver Dis.* 2001; 33:68-74.
30. Nogradi A. The role of carbonic anhydrases in tumors. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:1-4.
31. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Haukipuro K, Pastorekova S, Pastorek J, Kairaluoma MI, Karttunen TJ. Immunohistochemical study of colorectal tumors for expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, with potential value as a marker of cell proliferation. *Am. J. Pathol.* 1998; 153:279-85.
32. Murakami Y, Kanda K, Tsuji M, Kanayama H, Kagawa S. MN/CA9 gene expression as a potential biomarker in renal cell carcinoma. *BJU Int.* 1999; 83:743-7.
33. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, de la Taille A, Stifelman MD, Emanuel ER, Bagiella E, Rubin MA, Katz AE, Olsson CA, Sawczuk IS. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer* 1999; 86:492-7.
34. Kaluz S, Kaluzova M, Opavsky R, Pastorekova S, Gibadulinova A, Dequiedt F, Kettmann R, Pastorek J. Transcriptional regulation of the MN/CA 9 gene coding for the tumor-associated carbonic anhydrase IX. Identification and characterization of a proximal silencer element. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:32588-95.
35. Vermylen P, Roufosse C, Burny A, Verhest A, Bosschaerts T, Pastorekova S, Ninane V, Sculier JP. Carbonic anhydrase IX antigen differentiates between preneoplastic malignant lesions in non-small cell lung carcinoma. *Eur. Respir. J.* 1999; 4:806-11.
36. Zavada J, Zavadova Z, Pastorek J, Biesova Z, Jezek J, Velek J. Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *Br. J. Cancer* 2000; 82:1808-13.
37. Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, Pastorek J, Cox GJ, Ratcliffe P, Harris AL. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and

- microvessel density. *Cancer Res.* 2001; 61:5262-7.
38. Chia SK, Wykoff CC, Watson PH, Han C, Leek RD, Pastorek J, Gatter KC, Ratcliffe P, Harris AL. Prognostic significance of a novel hypoxia-regulated marker, carbonic anhydrase IX, in invasive breast carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 2001;19:3660-8.
  39. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wykoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res.* 2001; 61:6394-9.
  40. Saarnio J, Parkkila S, Parkkila AK, Pastorekova S, Haukipuro K, Pastorek J, Juvonen T, Karttunen TJ. Transmembrane carbonic anhydrase, MN/CA IX, is a potential biomarker for biliary tumours. *J. Hepatol.* 2001; 35:643-9.
  41. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Sivridis E, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:7992-8.
  42. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Simopoulos K, Pastorek J, Wykoff CC, Gatter KC, Harris AL. Hypoxia-regulated carbonic anhydrase-9 (CA9) relates to poor vascularization and resistance of squamous cell head and neck cancer to chemoradiotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7:3399-403.
  43. Olive PL, Aquino-Parsons C, MacPhail SH, Liao SY, Raleigh JA, Lerman MI, Stanbridge EJ. Carbonic anhydrase 9 as an endogenous marker for hypoxic cells in cervical cancer. *Cancer Res.* 2001; 61:8924-9.
  44. Kivela A, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, Waheed A, Sly WS, Grubb JH, Shah G, Tureci O, Rajaniemi H. Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am. J. Pathol.* 2000; 156:577-84.
  45. Kivela AJ, Parkkila S, Saarnio J, Karttunen TJ, Kivela J, Parkkila AK, Pastorekova S, Pastorek J, Waheed A, Sly WS, Rajaniemi H. Expression of transmembrane carbonic anhydrase isoenzymes IX and XII in normal human pancreas and pancreatic tumours. *Histochem. Cell. Biol.* 2000;114:197-204.
  46. Parkkila S, Parkkila AK, Saarnio J, Kivela J, Karttunen TJ, Kaunisto K, Waheed A, Sly WS, Tureci O, Virtanen I, Rajaniemi H. Expression of the membrane-associated carbonic anhydrase isozyme XII in the human kidney and renal tumors. *J. Histochem. Cytochem.* 2000; 48:1601-8.
  47. Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:905-19.
  48. Wykoff CC, Beasley N, Watson PH, Campo L, Chia SK, English R, Pastorek J, Sly WS, Ratcliffe P, Harris AL. Expression of the hypoxia-inducible and tumor-associated carbonic anhydrases in ductal carcinoma in situ of the breast. *Am. J. Pathol.* 2001; 158:1011-9.
  49. Chiang WL, Chu SC, Yang SS, Li MC, Lai JC, Yang SF, Chiou HL, Hsieh YS. The aberrant expression of cytosolic carbonic anhydrase and its clinical significance in human non-small cell lung cancer. *Cancer Letters* 2002; 188:199-205.
  50. Kuo WH, Chiang WL, Yang SF, Yeh KT, Yeh CM, Hsieh YS, and Chu SC. The differential expression of cytosolic carbonic anhydrase in human hepatocellular carcinoma. *Life Science* 2003; 73: 2211-2223.

## 七、圖表

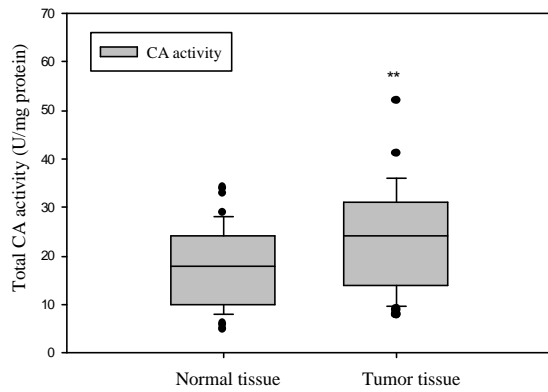


Fig.1. Analysis of the total CA activity in breast cancer.

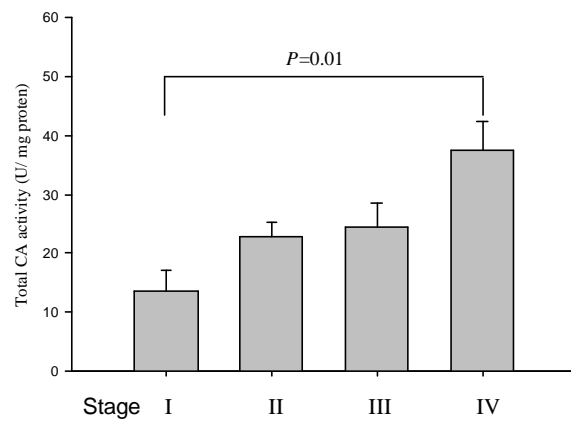


Fig.4. Relative total CA activity in various stages of breast cancer.

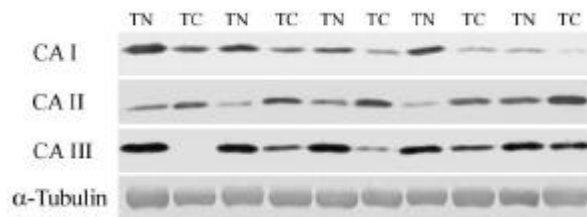


Fig.2. Immunoblot analysis of CAI, CAII and CA III expression. TC, tumor fraction of surgical resections; TN, adjacent normal tissue.

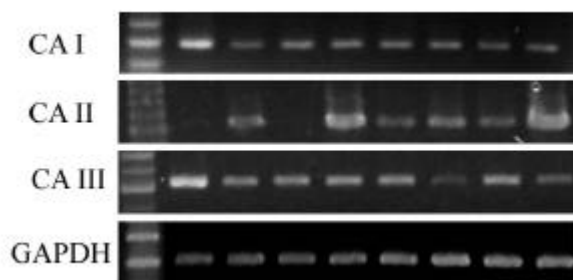


Fig.3. Analysis of CAI, CAII and CAIII expression in tumor tissue and adjacent normal tissue of HCC by RT-PCR

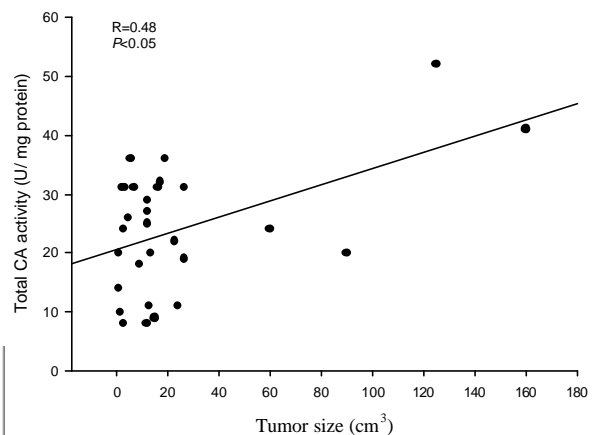


Fig.5. Linear regression analysis of the correlation between the total CA activity and tumor size in breast cancer. ( $R = 0.48$ ,  $p < 0.05$ )