

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

肝癌及肺癌中 cytosolic carbonic anhydrases 差異性表現
與癌瘤細胞生長關係之研究(2/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC92-2320-B-040-047-

執行期間：92年08月01日至93年07月31日

執行單位：中山醫學大學生化學科

計畫主持人：謝易修

計畫參與人員：江蕙玲,楊順發

報告類型：完整報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 93 年 9 月 13 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

肝癌及肺癌中 cytosolic carbonic anhydrases 差異性表現與癌細胞生長關係之研究(2/2)

計畫編號：NSC 92-2320-B-040-012

執行期限：92年08月01日至93年07月31日

子計畫主持人：謝易修 中山醫學大學生化所

計畫參與人員：江蕙玲 中山醫學大學生化所

楊順發 中山醫學大學生化所

一、中文摘要

本計畫主要探討在台灣發生的非小型細胞肺癌組織中碳酸酐異構酶及金屬依賴型基質分解酶中各種蛋白的表現，再深入進行 CAs 及 MMPs 的相關性分析。本研究以 CA activity, immunoblotting, gelatin 及 casein zymography, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 等技術進行分析，結果顯示肺癌組織與其周圍正常組織比較 CA activity 及 CAII 蛋白的表現有明顯下降，具有顯著的差異 ($p < 0.01$, $p < 0.001$)，而 CAII mRNA 的表現下降亦有差異 ($p < 0.05$)，因此推論 CAI 及 CAII 在細胞內的不正常表現，可能使二氧化碳無法完成水解而產生滯留，導致胞內的 pH 值偏向酸性，而促進癌細胞生長。MMP-9 及 MMP-2 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移最有關，實驗結果顯示肺癌組織與其周圍正常組織比較可觀察 proMMP-2；proMMP-9 及 active MMP-2 ($P < 0.01$)，但祇有 15.8% 的肺癌組織中同時具有活化態的 MMP-9，因此推論肺癌組織中缺乏活化態的 MMP-9。在相關性分析實驗中，CAII 蛋白表現及 CAII mRNA 與 MMPs system 的蛋白包括 active/latent MMP-2 皆有不同程度的相關，推論 CAII 的表現下降確實可促使癌組織細胞內 pH 值偏向酸性而營造一個適合 MMP-2 的活化的環境，幫助癌細胞的生長、侵襲及轉移。CAII 與 MMP-2 的關係清楚釐清之後，使用 CA inhibitor 等藥物抑制癌細胞的生長、侵襲及轉移，我們認為將對癌症的治療方向將會是一大貢獻。

關鍵詞：Keywords: Carbonic anhydrase ; 肺癌

二前言

腫瘤(tumor)是身體的某一部位形成一個細胞集團，此細胞集團與周圍的細胞組織不同，並且是具有自律性(autonomy)的細胞集團，腫瘤可分為良性腫瘤及惡性腫瘤，而所謂的癌(cancer)，其廣義的定義是指惡性腫瘤，其主要的特徵是可以侵入周圍的組織(invasion)，並且可以轉移到遠處的其它組織(metastasis)，並且在其它組織增殖，最後會導致宿主死亡，而腫瘤一開始的發展必須要侵入胞外基質(extracellular matrix)，而胞外基質是由 lamina lucida、lamina densa、Lamina fibroreticularis 三層形成膠原蛋白，而 type-IV 膠原蛋白是其主要成份，加上醣蛋白及 proteoglycans 共同組成一個很薄的胞外間質(1)，然後再透過特殊的受體形成一個無組織的胞外結構(2-3)，此不定形的間質稱為基底膜。而腫瘤細胞穿透基底膜遷移入周圍 interstitial stroma 是侵襲的第一個訊號(2,4)，由良性腫瘤轉變成惡性腫瘤的關鍵是基底膜結構發生改變，具侵入性的腫瘤細胞要通過基底膜必須在腫瘤形成期間分解並穿透完整的基底膜(5)。而惡性腫瘤細胞會產生胞外基質分解酵素，包括有 serine proteinase、metalloproteinases (MMPs)、cathepsins、plasminogen activator 及 heparanitase (6)，其中 MMP-9 及 MMP-2 在基底膜的破壞扮演著重要角色，與癌症的侵襲及轉移最有關(7)，惡性腫瘤細胞本身會製造 MMPs，在癌症等級增加時某些 MMPs 亦會相對的增加，而 MMPs 具有蛋白分解活性可分解膠原蛋白，在腫瘤破裂的基底膜處可測得大量

的 MMPs，現已證實是用來作局部侵襲和遠處轉移，主要在於助長癌細胞穿透基底膜，由血管滲入組織而達轉移之目的。

Carbonic anhydrase (CA)是一種含鋅離子的金屬酵素，其分子量約為 30,000 左右，在 1933 年首先於紅血球中被發現(41)，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(42)，在二氧化碳的輸送、鈣化及光合作用 (photosynthesis) 方面非常重要(43)，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 (Na^+/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%(44)。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(45-46)。
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(47)。而 CAVI 與 CAII 一樣具有水解 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(48)，在腎癌病人組織中更有大量表現。(49)

三研究目的

目前研究顯示在腫瘤的侵襲與轉移中，MMPs 扮演著非常重要的角色。而 CAs 在 nervous system tumors 因變異性太大故無顯著相關性；在 Pancreatic and colorectal tumors 中 CAI & CAII 則是顯著降低，所以可當作 cell proliferation index；而 CAIX (MN protein) 在 cervical carcinoma 如 HeLa cells、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 overexpression 現象；至於與 lung cancer 的關係直至目前尚未有文獻提出，而國人罹患肺癌且因而死亡人數相當高，所以值得深入探討 MMP 及 CAs 與肺癌之間關係如何？研究目的含以下四點：

- (1). 以 immunoblot 分析 100 個肺癌患者其 tumor tissues 與 adjacent normal tissues 中 cytosolic CAI, CAII, CAIII 及 MMP-2,-9 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 分析肺癌患者其 tumor tissues 與 adjacent normal tissues 中 CA 活性是否隨著 CAI, CAII, CAIII 及 MMP-2,-9 蛋白量的變化而改變
- (3). 以 RT-PCR 分析肺癌組織中 CAI, CAII, CAIII 及 MMP-2,-9 以獲知影響肺癌 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
- (4) 進行 hCA isoform genes 選殖，及 transfection 至肺癌細胞株以獲知 cytosolic CAI, CAII, CAIII 及 MMP-2,-9 蛋白表現量變化對肺癌細胞生長之影響。

三、材料與方法

1. 檢體來源:

檢體來源來自台中榮總一般外科。

2. 組織研磨萃取:

每 1mg 組織以 10 μl 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 μ l sample(蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ l loading buffer，將 sample denature (99 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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

取老鼠肝臟組織約 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 μ l, chloroform 100 μ 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 $^{\circ}$ C 冰箱靜置，直到要使用時再拿去離心 (12000g，4 $^{\circ}$ C，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-H₂O 溶解

RNA，測量其 260nm 吸光值並計算 RNA 濃度。

6. RT-PCR

RT (reverse transcription)：取 2 μ g 的 RNA，加入適量的 DEPC-H₂O 後到 33 μ l，以 70 $^{\circ}$ C 處理 5 分鐘。再加入 RNase inhibitor (40U/ μ l) 0.25 μ l，再加入 5X RT buffer 10 μ l 及 dNTP(2.5mM) 4 μ l，和 Oligo dT 1 μ l (50 pmole/ μ l)及 RTase 1 μ l (200U/ μ 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 μ l cDNA 加入適量的 DEPC-H₂O 至 26 μ l，加入 primer-5'和 primer-3' 各 5 μ l，加入 3.2 μ l dNTP (2.5mM)及 5 μ l 10X PCR buffer 最後再加入 DNA polymerase 1 μ l (2U/ μ 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 μ l 的 PCR 產物加上 2 μ 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 μ g/ml Ethidium bromide 染色，再以 ddH₂O 退染，於 UV 燈下分析並記錄。

9. CA 之活性測定

首先製備 SDS-聚丙醯胺板膠電泳之下層膠為 15% Separating gel，上層膠為 4% Stacking gel，置於電泳裝置槽中，並加入電泳緩衝液(1xTank buffer)，取蛋白總量 20 μ g 加入 5 μ l loading buffer (4 μ l loading buffer +1 μ l β -MSH)，總體積為 20 μ l 不足則以 PBS 補足，最後將 sample denature (99 $^{\circ}$ C，10 min)後，立刻將 sample 置於冰上 5 min 後，再將 sample loading 到電泳片中，以 140 伏特進行電泳分離。大約 3.5 小時後，將下層膠取下後利用 Triton X-100 洗去 SDS (renature) 二次，每次 30 分鐘。最後加入 25% isopropanol 置於 4 $^{\circ}$ C 1 小時，之後利用 20mM Tris-HCl pH8.1 清洗 10 分鐘，再進行染色 30 分鐘後，添加 50ml 飽和 CO₂ 水，觀察膠片上顏色的變化若出現黃色帶及立刻拍照。

10. gelatin zymography

首先製備 0.1 % Gelatin-8 % SDS-PAGE

電泳膠片，置於電泳槽中，並加入電泳緩衝液。取 16 μ L sample (蛋白總量 20 μ g)，加入 4 μ L loading buffer，將 sample 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，加入 50 mL 的 washing buffer，在室溫下洗 30 分鐘，共兩次。倒掉 washing buffer 之後，加入 50 mL 的 reaction buffer，於 37°C 恆溫箱下反應 12 個小時。將反應完後的 gel，以 staining buffer 染色 30 分鐘，之後再以退色液退染觀看結果

四、結果與討論

Carbonic anhydrase 在肺癌組織中的表現
1. Total Carbonic anhydrase 活性分析 使用在 SDS-PAGE 上呈色的方法進行 total CA 活性分析，結果顯示在 TNM 分期 1~3 中肺癌組織與其周圍正常組織比較並無顯著的差異 ($P > 0.05$)，TNM stage IV 中肺癌組織中 CA 活性較其周圍正常組織低，在統計學上有差異 ($P < 0.05$) (Fig 1)。
2. Carbonic anhydrase isoenzymes 分析。 使用在 Western immunoblot 的方法進行 Carbonic anhydrase isoenzymes (CAI 及 CAII) 分析，結果顯示在所有肺癌周圍正常組織檢體 30 KDa 處有明顯的 band 出現，而肺癌組織檢體相對較弱，因此認為在肺癌組織中 CA 的蛋白表現較其周圍正常組織低，經統計學分析 CAI 在 TNM I 及 IV 期中肺癌組織與其周圍正常組織比較有極顯著的差異 ($P < 0.001$)，TNM stage II 及 III 有顯著的差異 ($P < 0.01$)。而 CAII 在 TNM stage I 及 II 期中肺癌組織與其周圍正常組織比較有顯著的差異 ($P < 0.01$)，TNM stage III 及 IV 則有極顯著的差異 ($P < 0.001$) (Fig 2)。進一步將類表皮癌 (squamous carcinoma) 及腺癌 (adenocarcinoma) 分類觀察 CAI 及 CAII 的蛋白表現，也都具有統計學的意義。
3. MMP-2; 9 之分析 本實驗使用 gelatin zymography 進行 MMP-2; 9 活化態與未活化態活性之分析。結果中可觀察到有四個被 gelatinase 水解的 band，分別為 92 KDa 的 proMMP-9，84 KDa 的 active MMP-9，72 KDa 的 proMMP-2 及 66 KDa 的 active MMP-2。肺癌組織與其周圍正常組織中 MMP system 實際的比例在 Fig 8 中可清楚觀察到，而詳

細活性高低則摘要於 Table 3。所有的肺癌組織與其周圍正常組織都可觀察 proMMP-2； proMMP-9 及 active MMP-2，而 active MMP-9 只在 15.8% (19/120) 的肺癌組織中發現。Active/proMMP-2 及 Active/proMMP-9 在肺癌組織中皆有顯著的差異 ($P < 0.01$) (Fig3)。基於上述實驗觀察所得祇有 15.8% 的肺癌組織中具有活化態的 MMP-9，在進行相關性分析時組數偏低，因此不列入統計中。
4. 所有肺癌組織中 CA 酵素活性與 MMP-2 之相關性分析 CA 酵素活性與 active/latent MMP-2 經 Regression Wizard 分析其相關性，得到迴歸係數 $y = 0.9614 + (-0.3161)x$ ， $R = 0.09$ ， $p = 0.03$ (Fig -4)。CA 酵素活性與 active/latent MMP-2 並無統計學上的相關但有差異存在。
5. 所有肺癌組織中 CAII 蛋白表現與 MMP-2 之相關性分析 CAII 蛋白表現與 active/latent MMP-2 經 Regression Wizard 分析其相關性，分別得到迴歸係數 $y = 0.3211 + (-0.479)x$ ， $R = 0.32$ ， $p = 0.04$ ，CAII 蛋白表現與 active/latent MMP-2 在統計學上呈現相關及具有差異存在 (Fig- 5)。

CAII 與 MMP-2 這兩大酵素家族間的關係清楚釐清之後，我們將培養不同器官的細胞株，以分生的技術將 CA 基因進行轉殖，探討 CA 的表現促使癌細胞的生長、侵襲及轉移的機轉。另外使用致癌物質刺激或 CA 抑制劑了解癌發生過程將對癌症的治療將會是一大貢獻，這些將是後續必須繼續探討的重要課題。

五、參考文獻

1. Schleef, R. R., Podor, T. J., Dunne, E., Mimuro, J., and Loskutoff, D. J. The majority of type 1 plasminogen activator inhibitor associated with cultured human endothelial cells is located under the cells and is accessible to solution-phase tissue-type plasminogen activator. *J. Cell Biol.* 1990: 110:155-163
2. Yoon, S.O., Kim, M.M., Chung, A.S. Inhibitor effect of selenite on invasion of HT108 tumor cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:20085-92.
3. Garbisa S, Sartor L, Biggin S, Salvato B,

- Benelli R, Albini A. Tumor gelatinases and invasion inhibited by the green tea flavanol epigallocatechin-3-gallate. *Cancer*. 2001; 91:822-32.
4. Harimaya K, Tanaka K, Matsumoto Y, Sato H, Matsuda S, Iwamoto Y. Antioxidants inhibit TNF alpha-induced motility and invasion of human osteosarcoma cells: possible involvement of NFkappaB activation. *Clin Exp Metastasis*. 2000; 18:121-9.
 5. Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Chung KH. Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res*. 2000; 20:4331-8.
 6. Lee HM, Golub LM, Cao J, Teronen O, Laitinen M, Salo T, Zucker S, Sorsa T. CMT-3, a non-antimicrobial tetracycline (TC), inhibits MT1-MMP activity: relevance to cancer. *Curr Med Chem*. 2001; 8:257-60.
 7. Farina AR, Tacconelli A, Cappabianca L, Masciulli MP, Holmgren A, Beckett GJ, Gulino A, Mackay AR. Thioredoxin alters the matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of metalloproteinase balance and stimulates human SK-N-SH neuroblastoma cell invasion. *Eur J Biochem*. 2001; 268:405-13.
 8. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:178-93.
 9. Roth W, Wild-Bode C, Platten M, Grimm C, Melkonyan HS, Dichgans J, Weller M. Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells. *Oncogene*. 2000; 19:4210-20.
 10. Kim MS, Son MW, Kim WB, In Park Y, Moon A. Apicidin, an inhibitor of histone deacetylase, prevents H-ras-induced invasive phenotype. *Cancer Lett*. 2000; 157:23-30.
 11. Li Y, Bhuiyan M, Alhasan S, Senderowicz AM, Sarkar FH. Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in breast cancer cells by flavopiridol. *Clin Cancer Res*. 2000; 6:223-9.
 12. Tanaka H, Nishida K, Sugita K, Yoshioka T. Antitumor efficacy of hypothemycin, a new Ras-signaling inhibitor. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90:1139-45.
 13. Li Y, Bhuiyan M, Sarkar FH. Induction of apoptosis and inhibition of c-erbB-2 in MDA-MB-435 cells by genistein. *Int J Oncol*. 1999; 15:525-33.
 14. Sakukawa R, Murakami K, Ikeda T, Yamada Y, Saiki I. Effect of 4-[3,5-bis(trimethylsilyl)benzamido] benzoic acid (TAC-101) on the liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. *Oncol Res*. 1998; 10:287-93.
 15. Bu W, Tang ZY, Sun FX, Ye SL, Liu KD, Xue Q, Chen J, Gao DM. Effects of matrix metalloproteinase inhibitor BB-94 on liver cancer growth and metastasis in a patient-like orthotopic model LCI-D20. *Hepatogastroenterology*. 1998; 45:1056-61.
 16. Emenaker NJ, Basson MD. Short chain fatty acids inhibit human (SW1116) colon cancer cell invasion by reducing urokinase plasminogen activator activity and stimulating TIMP-1 and TIMP-2 activities, rather than via MMP modulation. *J Surg Res*. 1998; 76:41-6.
 17. Shao ZM, Wu J, Shen ZZ, Barsky SH. Genistein inhibits both constitutive and EGF-stimulated invasion in ER-negative human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Res*. 1998; 18:1435-9.
 18. Yoneda T, Sasaki A, Dunstan C, Williams PJ, Bauss F, De Clerck YA, Mundy GR. Inhibition of osteolytic bone metastasis of breast cancer by combined treatment with the bisphosphonate ibandronate and tissue
 19. Shou Y, Hirano T, Gong Y, Kato Y, Yoshida K, Ohira T, Ikeda N, Konaka C, Ebihara Y, Zhao F, Kato H. Influence of angiogenic factors and matrix metalloproteinases upon tumour progression in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2001; 85:1706-1712.
 20. Wollina U, Hipler UC, Knoll B, Graefe T, Kaatz M, Kirsch K. Serum matrix metalloproteinase-2 in patients with malignant melanoma. *J Cancer Res Clin*

- Oncol. 2001; 127:631-5.
21. Shamamian P, Schwartz JD, Pocock BJ, Monea S, Whiting D, Marcus SG, Mignatti P. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol.* 2001;189:197-206.
 22. Okada N, Ishida H, Murata N, Hashimoto D, Seyama Y, Kubota S. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 288:212-6.
 23. Itoh Y, Takamura A, Ito N, Maru Y, Sato H, Suenaga N, Aoki T, Seiki M. Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion. *EMBO J.* 2001; 20:4782-93.
 24. Lengyel E, Schmalfeldt B, Konik E, Spathe K, Harting K, Fenn A, Berger U, Fridman R, Schmitt M, Prechtel D, Kuhn W. Expression of latent matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) predicts survival in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2001; 82:291-8.
 25. Ghilardi G, Biondi ML, Mangoni J, Leviti S, DeMonti M, Guagnellini E, Scorza R. Matrix metalloproteinase-1 promoter polymorphism 1G/2G is correlated with colorectal cancer invasiveness. *Clin Cancer Res.* 2001; 7:2344-6.
 26. Salmela MT, Karjalainen-Lindsberg ML, Puolakkainen P, Saarialho-Kere U. Upregulation and differential expression of matrilysin (MMP-7) and metalloelastase (MMP-12) and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-3 in Barrett's oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2001; 85:383-92.
 27. Dong Z, Nemeth JA, Cher ML, Palmer KC, Bright RC, Fridman R. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2 expression in co-cultures of prostate cancer and stromal cells. *Int J Cancer.* 2001; 93:507-15.
 28. Lynch CC, McDonnell S. The role of matrilysin (MMP-7) in leukaemia cell invasion. *Clin Exp Metastasis.* 2000; 18:401-6.
 29. Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A. Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis.* 2001; 16:133-40.
 30. Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sugiyama K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2000; 18:321-7.
 31. Theret N, Musso O, Turlin B, Lotrian D, Bioulac-Sage P, Campion JP, Boudjema K, Clement B. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 2001; 34:82-8.
 32. Papathoma AS, Zoumpourlis V, Balmain A, Pintzas A. Role of matrix metalloproteinase-9 in progression of mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog.* 2001; 31:74-82.
 33. Canning MT, Postovit LM, Clarke SH, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res.* 2001 ; 267:88-94

六 圖表

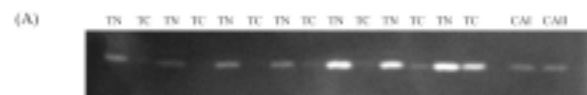


Fig. 1. Analysis of the CA relative density in NSCLC. (A) Detection of CA activity expression by polyacrylamide gels.



Fig. 2. Immunoblot analysis of CAI and CAII expression. CAI and CA II on the blot represent the quantitative controls as described in the Materials and Methods section. TC, tumor fraction of surgical resections; TN, adjacent normal tissue.

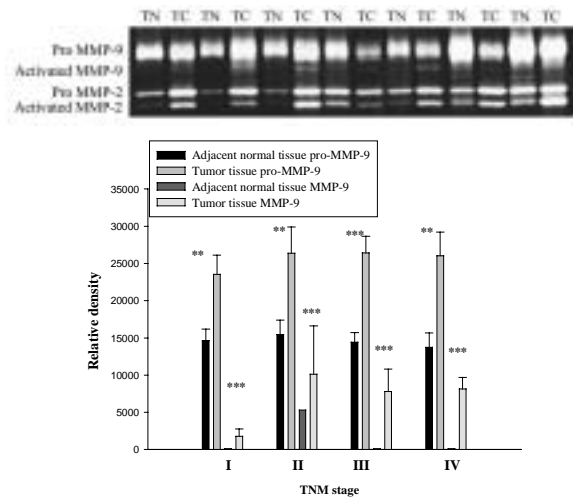


Fig. 3 Analysis of the pro-MMP-9 and active MMP-9 in various stages of NSCLC. (A) Detection of pro-MMP-9 and active MMP-9 expression by zymography. TC, tumor fraction of surgical resections; TN, adjacent normal tissue. (B) Comparison of density of pro-MMP-9 and active MMP-9 in NSCLC patients. Student's t test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

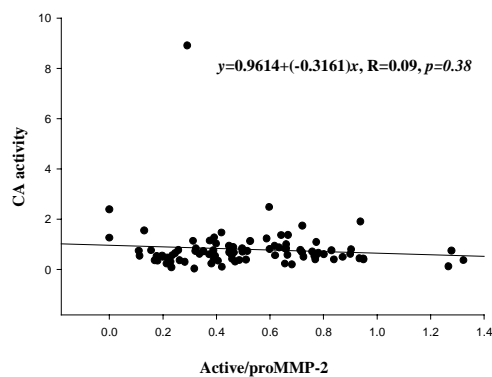


Fig.4 Regression analysis expression of CA activity with MMP-2 in NSCLC.

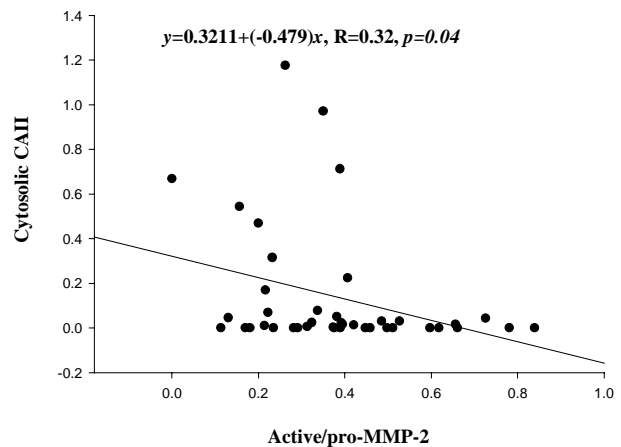


Fig.5 Regression analysis expression of CA II with MMP-2 in NSCLC

