

國立臺灣大學牙醫專業學院臨床牙醫學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Clinical Dentistry

School of Dentistry

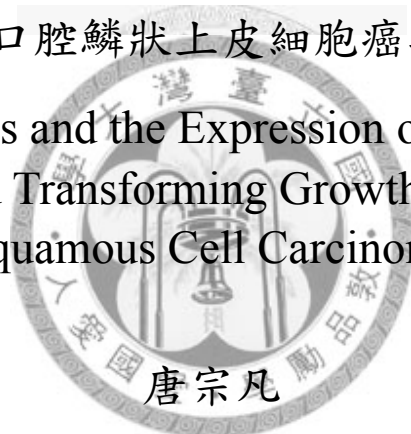
National Taiwan University

Master Thesis

調節性 T 細胞與介白素-1 β 、介白素-6 以及變形生長因子

- β 於口腔鱗狀上皮細胞癌之表現

Regulatory T cells and the Expression of Interleukin-1 β ,
Interleukin-6 and Transforming Growth Factor- β in Oral
Squamous Cell Carcinoma



Tang, Tzung-Fan

指導教授：賈景山 教授

李正喆 臨床副教授

Advisor: Prof. Chia Jean-San

Associate Prof. Lee Jang-Jaer

中華民國 99 年 6 月

June, 2010

目錄

中文摘要.....	6
英文摘要.....	8
第一章 序論及文獻回顧.....	10
1.1 第一節 口腔鱗狀上皮細胞癌之概論.....	10
1.1.1 口腔鱗狀上皮細胞癌之流行病學.....	10
1.1.2 口腔鱗狀上皮細胞癌之危險因子.....	10
1.1.2.1 菸草製品.....	11
1.1.2.2 酒精.....	11
1.1.2.3 檳榔.....	11
1.1.2.4 其他因素.....	12
1.1.3 口腔鱗狀上皮細胞癌之治療及預後.....	12
1.2 第二節 免疫與癌症.....	13
1.2.1 腫瘤的微環境.....	13
1.2.2 腫瘤微環境中的免疫細胞.....	13
1.2.3 發炎與癌症.....	14
1.2.4 腫瘤逃逸的機制.....	15
1.3 第三節 調節性 T 細胞.....	15
1.3.1 Treg 細胞調控免疫的機制.....	16
1.3.2 Treg 細胞與癌症.....	16
1.3.3 Treg 細胞與口腔鱗狀上皮細胞癌.....	17
1.4 第四節 細胞激素的調控.....	17
1.4.1 介白素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β).....	18
1.4.1.1 IL- 1 β 對免疫反應的影響.....	18
1.4.1.2 IL- 1 β 對細胞癌化的影響.....	19
1.4.1.3 IL- 1 β 對腫瘤侵入性的影響.....	19
1.4.1.4 IL- 1 β 與口腔鱗狀上皮細胞癌.....	20

1.4.2 介白素-6(Interleulin-6, IL-6).....	20
1.4.2.1 IL-6 與口腔鱗狀上皮細胞癌.....	21
1.4.3 變形生長因子-β(Transforming growth factor-β, TGF-β).....	21
1.4.3.1 TGF-β 對免疫系統的調控.....	22
1.4.3.2 TGF-β 與口腔鱗狀上皮細胞癌.....	22
第二章 材料與方法.....	24
2.1 第一節 實驗樣本.....	24
2.2 第二節 標本之固定與包埋.....	24
2.3 第三節 免疫組織化學染色.....	24
2.3.1 反應藥劑.....	24
2.3.2 初級抗體的選擇.....	24
2.3.3 實驗步驟.....	25
2.4 第四節 免疫組織化學染色後之觀察與記錄.....	26
第三章 結果.....	28
3.1 第一節 Interleukin-1β、interleukin-6、transforming growth factor-β 以及 Foxp3 於口腔鱗狀上皮細胞癌之表現.....	28
3.2 第二節 Interleukin-1β、interleukin-6、transforming growth factor-β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果之間的相關性.....	28
3.3 第三節 Interleukin-1β、interleukin-6、transforming growth factor-β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與各項臨床變數間及組織病理學參數的關係.....	28
3.4 第四節 Interleukin-1β、interleukin-6、transforming growth factor-β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與各項風險因子的關係.....	30
3.5 第五節 Interleukin-1β、interleukin-6、transforming growth factor-β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與存活時間的關係.....	31
第四章 討論.....	32
第五章 結論.....	36
第六章 附表與附圖.....	37
參考文獻.....	65

表目錄

表 1 : IL-1 β 、IL-6 及 TGF- β 於 OSCC 腫瘤細胞上之陽性染色之標記指數(Labeling Index)、強度(Intensity)及平均標記分數(Labeling score)	37
表 2 : IL-1 β 、IL-6 及 TGF- β 於 OSCC 基質細胞及浸潤之免疫細胞上陽性染色之標記指數(Labeling Index).....	38
表 3 : IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp3 於 OSCC 中各項標記指數、強度、標記分數之相關性.....	39
表 4 : 年齡與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	40
表 5 : 性別與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	41
表 6 : 腫瘤位置與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	42
表 7 : 腫瘤大小(T)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	43
表 8 : 淋巴結轉移(N)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	44
表 9 : 腫瘤分期期數(Stage)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	46
表 10 : 腫瘤細胞分化程度與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	47
表 11 : 淋巴管或血管侵犯與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	48
表 12 : 轉移淋巴結之膜外擴散與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	49
表 13 : 腫瘤復發與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	50

表 14：酒精攝取與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	51
表 15：嚼食檳榔與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	52
表 16：抽菸與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性.....	53



圖目錄

圖 1: IL-1 β 於 OSCC 組織切片中的表現.....	54
圖 2: IL-6 於 OSCC 組織切片中的表現.....	55
圖 3: TGF- β 於 OSCC 組織切片中的表現.....	56
圖 4: Foxp3 於 OSCC 組織切片中的表現.....	57
圖 5: Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-1 β 癌細胞標記指數之關係.....	58
圖 6: Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-1 β 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係.....	59
圖 7: Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-6 癌細胞標記指數之關係.....	60
圖 8: Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-6 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係.....	61
圖 9: Kaplan-Meier 生存曲線與 TGF- β 癌細胞標記指數之關係.....	62
圖 10: Kaplan-Meier 生存曲線與 TGF- β 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係.....	63
圖 11: Kaplan-Meier 生存曲線與 Foxp3 之標記指數之關係.....	64



中文摘要

背景：口腔鱗狀上皮細胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)的發生以及生長與發炎反應有很高的相關性，而發炎反應則是由介白素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)以及介白素-6(interleukin-6, IL-6)等促發炎反應的細胞激素來調控。然而在腫瘤的微環境中適應性免疫細胞卻是被抑制的。調節性 T 細胞(regulatory T cell, Treg)的功能主要是藉由變形生長因子(Transforming growth factor- β , TGF- β)等細胞激素的調控，對免疫系統造成抑制。調節性 T 細胞的抗發炎能力，或許有助於腫瘤的控制，然而也有可能幫助腫瘤逃離免疫系統的監測，進而幫助腫瘤的生長。因此本研究欲觀察，能產生抗發炎反應的 Treg 細胞以及 TGF- β ，與能促進發炎反應的 IL-1 β 以及 IL-6 於 OSCC 中的表現，以及其與臨床以及組織病理上各項參數之相關性。

材料與方法：本研究利用免疫組織化學染色方法，觀察 Foxp3、TGF- β 、IL-1 β 以及 IL-6 於 71 例於 1999 年至 2004 年間於台大口腔顎面外科接受手術切除治療之 OSCC 患者組織中的表現。並分別評估 Foxp3、TGF- β 、IL-1 β 以及 IL-6 於 OSCC 腫瘤細胞以及基質中的表現。Foxp3、TGF- β 、IL-1 β 以及 IL-6 於 OSCC 中之表現與各項臨床與病理之參數的關係，則使用 Pearson product-moment correlation coefficient、Student's t test、Kruskal-Wallis H test 以及 Mann-Whitney U test 來評估。Foxp3、TGF- β 、IL-1 β 以及 IL-6 於 OSCC 中之表現與患者存活之關係則使用 Kaplan-Meier survival analysis 來評估。

結果：所有的病例皆表現 Foxp3 以及 IL-6，而 IL-1 β 以及 TGF- β 則各有一個病例未表現。Foxp3、TGF- β 、IL-1 β 以及 IL-6 之各項表現於彼此之間或是細胞激素本身互有相關性。於早期的腫瘤中 Foxp3 的表現量較晚期腫瘤為高，而晚期的腫瘤中 IL-1 β 於腫瘤細胞中表現則較早期為高。此外，TGF- β 於超過 50%的腫瘤細胞中表現則患者的累積存活率越好。

結論：OSCC 是一高度發炎的腫瘤，IL-1 β 於較具侵犯性的腫瘤之腫瘤細胞中表現較高，Foxp3 則於較早期的腫瘤細胞表現較高。具有菸酒檳榔等不良習慣的患者，IL-1 β 於腫瘤細胞中，而 IL-6 於腫瘤基質中的表現較高，但 Treg 的表現較低，使腫瘤偏向發炎的環境。另外，TGF- β 於腫瘤中表現超過 50%腫瘤細胞，則累積存活率較高，表示 TGF- β 對 OSCC 的預後是有幫助的。於本研究中，Foxp3、IL-1 β 以及 IL-6 對於 OSCC

的存活率以及預後是沒有影響的。



Abstract

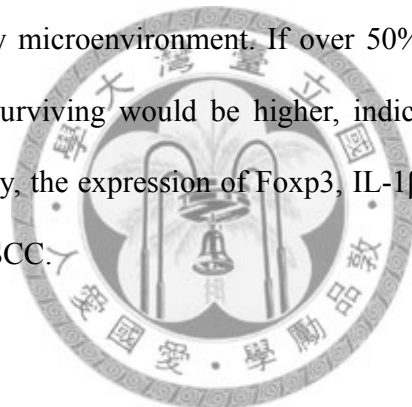
Background: The occurrence and progression of oral squamous cell carcinoma (OSCC) are highly correlated with inflammation, which is mediated by pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6). But the adaptive immune cells are suppressed in the tumor microenvironment. Regulatory T cells (Tregs) suppress immune response through transforming growth factor- β (TGF- β) mediation. Tregs may suppress inflammatory response and help the control of tumor, but also may support tumor to escape from immune surveillance and promote tumor progression. The study was to investigate the expression of Treg and TGF- β , which exert anti-inflammation, and IL-1 β and IL-6, which promote inflammatory response in OSCC and their associations with clinical and pathological features.

Materials and methods: Surgical specimens from 71 patients treated for OSCC at Department of Oral and Maxillofacial Surgery, National Taiwan university hospital, were evaluated for Foxp3, TGF- β , IL-1 β and IL-6 expression by immunohistochemical staining. The expression of Foxp3, TGF- β , IL-1 β and IL-6 in OSCC cancer and stromal cells were evaluated respectively. Associations of Foxp3, TGF- β , IL-1 β and IL-6 expression with clinical and pathological features were evaluated by using Pearson product-moment correlation coefficient, Student's t test, Kruskal-Wallis H test and Mann-Whitney U test. Associations of Foxp3, TGF- β , IL-1 β and IL-6 expression with survival of patients from OSCC were evaluated by using Kaplan-Meier survival analysis.

Results: All patients showed Foxp3 and IL-6 expression. IL-1 β and TGF- β have one case didn't show any positive expression in tumor and stromal cells respectively. The expression of Foxp3, TGF- β , IL-1 β and IL-6 were correlated with themselves or each

others. Compared early stage with advanced stage tumor, the expression of Foxp3 was higher in early stage, and the expression of IL-1 β in tumor cells was higher in advanced stage. The higher expression of TGF- β in tumor cells was associated with better cumulative proportion surviving.

Conclusions : OSCC is a highly associated with inflammatory response, and the expression of IL-1 β was higher in more invasively tumor, and Foxp3 expression was higher in early stage tumor. If the patients had smoking and/or alcohol drinking and/or betel quid chewing, the expression of IL-1 β was higher in cancer cells and IL-6 was higher in stromal cells, but the amount of Tregs were lower. This result indicates that these habits deviate tumor to more inflammatory microenvironment. If over 50% tumor cells express TGF- β , the cumulative proportion surviving would be higher, indicating TGF- β associated with better prognosis. In this study, the expression of Foxp3, IL-1 β , IL-6 have no impact on the survival and prognosis of OSCC.



第一章 序論及文獻回顧

1.1 第一節 口腔鱗狀上皮細胞癌之概論

1.1.1 口腔鱗狀上皮細胞癌之流行病學

全球每年口腔癌的發生病例為275000人，佔所有惡性腫瘤的2.5% (Ferlay J 2002)。而口腔鱗狀上皮細胞癌 (Oral squamous cell carcinoma, OSCC)為口腔中發生率最高之癌症，尤其是於較低收入的社會階層，其中以年齡較高的男性更為常見。而超過45歲而得到口腔鱗狀上皮細胞癌的群組，有90%都曾接觸過如菸、酒等已知的危險因子 (Ferlay J 2002)。

OSCC是世界上發生率第八高的癌症，但是在部分地區如法國北部、東歐、南美洲以及東南亞具有更高的盛行率 (Moore et al. 1999; Moore et al. 2000a; Moore et al. 2000b)。在印度更是高達所有癌症中的30%至40% (Desai 1983)。

依據中華民國行政院衛生署的統計資料，於2006年，口腔癌已經成為台灣發生率第六名的癌症，且為台灣男性發生率第四名的癌症。而死亡率則從1986年的每十萬人中2.2人，提升至2008年的每十萬人中9.6人，於20年間增加了4.36倍。男性於2008年口腔癌死亡率更高達每十萬人中17.9人。口腔癌的發生從1989至1993年間，主要年齡層集中在50至59歲之間。然而從1993到2000年間，口腔癌好發的年齡層則降至40至49歲之間。同樣的趨勢也發現在死亡率上，口腔癌的死亡年齡中位數與其他癌症相比是較為年輕的，從1989年至1999年的十年間，從58歲降至54歲，然而在1999至2008年間，並沒有明顯的變化。

OSCC明顯的好發於男性，一研究分析1985至1996於南臺灣的703位OSCC患者，發現男女的比例為51:1 (Chen et al. 1999)。也有研究報告指出，OSCC的患者組成約為90%至93%男性與7%至10%女性 (Liao et al. 2008)，顯示了男性與女性的差距，這可能是因為女性嚼食檳榔的比例較少的緣故 (Chen et al. 2008)。

1.1.2 口腔鱗狀上皮細胞癌之危險因子

OSCC的細胞來源為oral keratinocyte，細胞的DNA突變可能是自發性的，然而接觸到致癌因子可以增加突變的機率。此外，人體內異質物代謝酵素(Xenobiotic metabolizing enzyme, XME)的基因變異，也會影響到致癌因子的代謝 (Scully et al.

2000a; Scully et al. 2000b; Scully et al. 2000c)。許多危險因子能夠增加細胞突變的機率，尤其是使用菸草製品與喝酒的影響特別重要。其他如嚼檳榔、日光的曝曬、游離輻射、人類乳突病毒(Human papilloma virus, HPV)或是其他的感染，以及免疫力不全的狀態皆與口腔鱗狀上皮細胞癌的發生有關係。

1.1.2.1 菸草製品(Tobacco)

菸草製品的使用為OSCC的主要危險因子之一 (Hirota et al. 2008; Vallecillo Capilla et al. 2007)。這包括了有煙菸草製品以及無煙菸草製品 (Warnakulasuriya and Ralhan 2007)，雖然有學者提出無煙菸草製品對於致癌風險的影響是較小的 (Boffetta 2008)。

菸草製品的使用會產生致癌物質，如TSNA (tobacco-specific nitrosamines)，一種自由基，會造成許多酵素的改變 (Brunnemann et al. 1996; Hoffmann and Hoffmann 1997)。

重度的菸草製品使用者產生OSCC的風險為一般人的20倍，並且存在著劑量-反應關係(dose-response relationship)，表示風險會隨著每天所抽菸的數量以及所抽的時間增加。其他形式的菸草製品也是危險因子，有研究證實在印度Trivandrum市，菸草的嚼食是產生OSCC最強的危險因子，並且也存在著劑量-反應關係 (Muwonge et al. 2008)。

1.1.2.2 酒精(Alcohol)

酒精(乙醇/ethanol)會被醇脫氫酶(alcohol dehydrogenase/ADH)氧化成乙醛(acetaldehyde)，乙醛可能是一種致癌物質 (Boccia et al. 2009)，之後乙醛會被醛脫氫酶(aldehyde dehydrogenase/ALDH)分解為不具致癌性的醋酸鹽(acetate)。重度的酒精攝取會使OSCC產生的機率提高五倍，並且具有劑量-反應關係 (Pelucchi et al. 2008)。重度的菸草使用者與酒精攝取，對於產生OSCC的風險會比兩者產生的風險相乘還要來的更高 (Hashibe et al. 2009)。酒精的攝取會誘導黏膜以及肝臟中cytochrome P450-2E1-dependent microsomal biotransformation system 的啟動，而使菸草產生的致癌前驅物活化 (Seitz and Cho 2009)。

1.1.2.3 檳榔(betel-quad)

檳榔已經被證實對人體會有致癌的可能 (Carpenter et al. 2005; Guh et al. 2007;

Jacob et al. 2004; Merchant et al. 2000; Reichart and Nguyen 2008; Thomas et al. 2007; Thomas et al. 2008)，而全球約有20%的族群有嚼食檳榔的習慣 (Cogliano et al, 2004)。檳榔子(areca nut)中的檳榔素(arecoline)可能會阻斷腫瘤抑制基因(Tumor suppressor gene, TSG) p14、p15以及p16，以及抑制p53 TSG，造成上皮細胞的DNA無法修復，並促進DNA的傷害 (Chen et al. 2008; Cheong et al. 2009; Park et al. 2008; Takeshima et al. 2008; Tsai et al. 2008)。檳榔導致的致癌風險也與檳榔的種類有關，食用檳榔花具有最高的風險，檳榔葉則具有較低的風險 (Lee et al. 2005)。在台灣，嚼食檳榔與口腔癌的發生有很強的相關性，將近80%因口腔癌而死亡的患者有嚼食檳榔的習慣。同時具有嚼食檳榔、吸菸和飲酒的人較無上述口腔習慣的人，其罹患口腔癌的機率高出123倍，而其中三種口腔習慣的比較，又以單獨嚼食檳榔罹癌的機率最高 (Liao et al. 2008)。

1.1.2.4 其他因素(other factors)

全世界大約有25%的口腔癌患者歸因於菸草製品的使用(包括抽菸或嚼食菸草)，7-19%是因為飲酒，10-15%是因為營養不良，而在嚼食檳榔盛行的區域則有超過50%的患者有嚼食檳榔的習慣 (Petti 2009)。然而，也有部分的病例無法歸因於攝取菸酒檳榔等不良習慣而導致癌症，尤其是女性以及年輕人 (Hashibe et al. 2009; Llewellyn et al. 2001)。許多研究顯示HNSCC中含有HPV的DNA，尤其在口咽癌之中。OSCC在有大量性伴侶以及較年輕就擁有性行為的人之中發生率也會增高。另外在子宮頸癌的女性患者以及其性伴侶，OSCC的發生率也會增加 (Scully 2002; Scully 2005)。口腔衛生不良也可能會使OSCC的發生率增高，牙周疾病以及牙齒缺失可能會使OSCC的機率增加，口腔中的細菌如streptococci以及neisseria也可能會從酒精中合成乙醛。在接受器官移植、Fanconi 貧血症、先天性角化不全症(dyskeratosis congenital)、糖尿病以及硬皮症(scleroderma)等會影響個體免疫能力的疾病，OSCC的發生率也會增加 (Dikshit et al. 2006)

1.1.3 口腔鱗狀上皮細胞癌的治療及預後

手術治療仍然是大多數口腔癌症的主要方式，僅接受手術切除能有有效的控制80%以上患者的原發腫瘤 (Ichimiya et al. 2005; Makitie et al. 2007)。但在AJCC分期較高，如第三、第四期的患者，或是有高度復發可能的患者通常需接受放射治療或放射治療合併化學治療。然而期別越高的患者其預後越差，在口腔癌患者中的五年存活

率，第一期為72-90%、第二期為39-85%、第三期為27-70%、第四期為12-50% (Ko et al. 1995; Liao et al. 2008; Liao et al. 2007)。

1.2 第二節 免疫與癌症 (Immunity and cancer)

1.2.1 腫瘤的微環境 (tumor microenvironment)

癌症是一種漸進性的疾病，通常都需要細胞的突變來啟始，然而，僅是細胞的突變並不足以造成惡性腫瘤的形成 (Hanahan and Weinberg 2000)。惡性腫瘤的組成需要許多不同的細胞，其中包括：基因變異的癌細胞，以及在腫瘤微環境中被活化或是召集來的基質細胞；其中有纖維母細胞(fibroblast)、內皮細胞(endothelial cell)以及壁內細胞(mural cell)來形成血管以及淋巴的通路；以及先天性免疫細胞(innate immune cell)與適應性免疫細胞(adaptive immune cell)，這些細胞都存在胞外基質(extracellular matrix, ECM)之中，並共同調控惡性腫瘤的發展 (Bissell and Radisky 2001; Coussens and Werb 2002; Kiaris et al. 2004; Mueller and Fusenig 2004; Tlsty 2001)。

在健康的組織中，ECM中的各種細胞會存在於平衡的狀態。但是一旦開始進行癌化的過程，基質的功能以及結構會產生戲劇性的變化(Mueller et al, 2004)。纖維母細胞會有更高的增殖率，並且基質中會有許多的免疫細胞浸潤以及活化 (Benitez-Bribiesca et al. 2001; Duncan et al. 1998; Imada et al. 2000; Takanami et al. 2000; Tomita et al. 2000; Toth-Jakatics et al. 2000)。更進一步，基質內會產生許多沒有組織性的血管，組織間質液壓(interstitial fluid pressure, IFP)會上升，淋巴通路的結構也會改變 (Achen et al. 2005; Bergers and Benjamin 2003; Hashizume et al. 2000; Heldin et al. 2004; McDonald and Baluk 2002)。腫瘤細胞、活化的纖維母細胞以及炎症細胞接著開始製造生長因子與蛋白酶，重塑ECM的結構蛋白以及基底膜，導致組織的平衡受到破壞，使得細胞遷移並且侵入其他部位的組織 (Egeblad and Werb 2002)。

1.2.2 腫瘤微環境中的免疫細胞

腫瘤微環境中會有許多免疫細胞的浸潤，其中包括了適應性免疫系統的T淋巴球、樹突細胞(dendritic cell, DC)，偶而會有少量的B細胞；先天性免疫系統的巨噬細胞(macrophage)、多型核白血球(polymorphonuclear leukocyte)以及很少的自然殺手細胞(natural killer cell, NK cell) (Whiteside 2006b)。

腫瘤浸潤的淋巴球(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)，包括了CD3⁺CD4⁺ T細胞以

及CD3⁺CD8⁺T細胞，通常是腫瘤微環境中的主要成分，這之中許多T細胞都對腫瘤相關抗原(tumor-associated antigen)有特異性(Miescher et al. 1987)。然而TIL之中卻有一部分T細胞為CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺細胞，這些細胞稱為調節性T細胞(Regulatory T cell, Treg cell)。Treg細胞能夠分泌IL-10、TGF-β，並經由直接接觸來抑制腫瘤微環境中其他T細胞的生長 (Strauss et al. 2007)。另外一種CD4⁺T細胞的子類型，Th17細胞也可能會表現在腫瘤的微環境中，雖然目前還沒有明確的證據，但是Th17細胞可能在不同的環境下會表現抗腫瘤的反應或是促進腫瘤生長的能力 (Zou and Restifo 2010)。

腫瘤微環境中的巨噬細胞稱作腫瘤相關巨噬細胞(tumor-associated macrophage, TAM)，這些細胞會釋放一些抑制性的細胞激素如IL-10、前列腺素(prostaglandin)或活性氧化物質(reactive oxygen species, ROS)來抑制T淋巴球的功能(Mantovani et al. 2002; Martinez et al. 2008)。另外腫瘤中聚積的骨髓抑制細胞(myeloid suppressor cell, MSC)會增進腫瘤的生長以及抑制免疫細胞的功能 (Ochoa et al. 2007)。此外，腫瘤也會分泌許多因子，包括IL-10、VEGF、GM-CSF來召集MSC聚集到腫瘤處，以抑制DC的成熟以及抑制淋巴球的功能 (Serafini et al. 2006)。

1.2.3 發炎與癌症

在人體以及實驗性的惡性病灶上的通常都有白血球的浸潤，而這些免疫細胞的增加不只是因為癌症進展時組織變化的結果，而是在致癌過程的調控機轉中扮演著重要的角色。臨床的觀察免疫反應在腫瘤的生長以及發展中扮演著雙重的角色；若免疫反應較傾向抗腫瘤T淋巴球反應(anti-tumor T lymphocytes response)，則與較佳的疾病預後有關；然而若腫瘤微環境中的免疫反應傾向於慢性活化先天性免疫細胞，則通常與較差的預後有關 (Abe et al. 2003; Chiba et al. 2004; Funada et al. 2003; Nakakubo et al. 2003; Oshikiri et al. 2003; Wakabayashi et al. 2003; Zhang et al. 2003)。

既然基因改變的細胞是能夠被適應性免疫系統辨認的目標，有許多研究嘗試使用一些疫苗來引起有腫瘤特異性的CD8⁺T細胞反應(tumor-specific CD8⁺T cell response)，然而只有少數的病例能夠成功的產生抗腫瘤的適應性免疫反應來控制以及使腫瘤縮小 (Rosenberg et al. 2004)。這可能是因為腫瘤會將免疫的環境轉換成適合腫瘤生長的環境 (Balkwill et al. 2005)。腫瘤微環境中出現的先天性免疫細胞；如MSC，以及Treg細胞會進一步的抑制系統性或局部性的抗腫瘤適應性免疫反應 (Bronte et al.

2000; Curiel et al. 2004; Kusmartsev and Gabrilovich 2002; Sakaguchi 2005; Serafini et al. 2004)。而腫瘤中的腫瘤相關巨噬細胞(Tumor-associated macrophage, TAM)以及Th17細胞則會促進微環境中的發炎反應 (Zou and Restifo 2010)。流行病學的研究也指出許多慢性發炎障礙(chronic inflammatory disorder)、慢性發炎以及慢性的機械及化學性刺激會使癌症較容易產生 (Ness and Cottreau 1999; Shacter and Weitzman 2002; Thun et al. 2004; Weitzman and Gordon 1990)。也有證據顯示長期使用非固醇類抗發炎藥物 (Non-steroidal anti-inflammatory drug, NSAID) 的患者，產生癌症的機率較低 (Cotterchio et al. 2001; Garcia-Rodriguez and Huerta-Alvarez 2001; Sharpe et al. 2000)。而在台灣的OSCC患者中，腫瘤內巨噬細胞浸潤的數目與腫瘤的大小、淋巴的轉移、臨床期數、復發以及死亡率都有顯著的相關性，且可以用作OSCC預後的一個指標 (Lu et al. 2010)。

1.2.4 腫瘤逃逸(Tumor escape)的機制

腫瘤的微環境一旦建立，就表示腫瘤擁有了一層有效對抗免疫反應的屏障。因為腫瘤並不是被動的成為宿主免疫力的目標，相反的，腫瘤會主動的藉由各種不同的策略以及機制來調控抗腫瘤的免疫能力 (Whiteside 2008)。有些機制是直接由腫瘤製造的一些因子來調控，有些則是因為癌症的產生而改變正常組織的homeostasis造成。Genetic instability以及molecular changes是所有惡性腫瘤的特色，這些改變也增加了腫瘤細胞對於免疫監測(immune surveillance)的抵抗力。此外，大多數腫瘤都能介入免疫細胞的發育、分化、遷移、細胞毒性等一或多個階段來調控免疫細胞的生長及功能 (Whiteside 2006a)。

1.3 第三節 調節性T細胞 (Regulatory T cell, Treg cell)

早期的研究指出，在colorectal cancer的患者中，如果腫瘤浸潤的淋巴球有較高的CD8⁺/CD4⁺ T cell ratio，則有較好的預後 (Diederichsen et al. 2003)。這表示了若CD4⁺ T細胞的比例越高，則抗腫瘤的能力會較差。而CD4⁺ T細胞中的一種subtype，Treg細胞，引起了大家的注意。Treg細胞表現了高量的CD25，當小鼠中的CD25⁺細胞被移除，會造成自體免疫疾病 (Sakaguchi et al. 1995)。而在癌症患者中，若在peripheral blood、tumor microenvironment以及tumor-draining lymph node中CD4⁺CD25^{high} Treg濃度較高

的患者，這些被萃取出來的Treg細胞在in vitro研究中都具有免疫抑制的能力 (Fattorossi et al. 2004; Liyanage et al. 2002; Woo et al. 2001)。因此Treg可能藉由提供腫瘤一種免疫逃逸的機制，使腫瘤能夠躲過免疫細胞的監測和破壞 (Knutson et al. 2007)。

1.3.1 Treg細胞調控免疫的機制

在In vitro study中，human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg細胞能夠藉由直接接觸來阻斷許多先天性及適應性的免疫細胞，包括了DC、NK cell以及活化的T細胞 (Maggi et al. 2005)。Treg會用細胞上的CTLA-4以及TGF-β1與作用性T細胞(effector T cell)上的B7和TGF-β接受器結合，導致作用性T細胞上高親和性IL-2接受器(high affinity IL-2 receptor)的向上調控(upregulation)被阻斷 (Annunziato et al. 2002)。此外，CD4⁺CD25⁻ T細胞與CD4⁺CD25⁺ T細胞在一起的時候，會啟動TGF-β的信息傳遞路徑(signaling pathway)以及TGF-β-inducible gene的向上調控 (Nakamura et al. 2004)。除了經由B7以及TGFβR的訊息傳遞之外，Treg也可能經由granzyme B或是perforin來誘導T cell的凋亡(apoptosis)或是壞死(necrosis) (Grossman et al. 2004)。

Human CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cell不只調控T細胞的作用，也會影響其他的作用性免疫細胞(immune effector)。Treg能夠抑制myeloid dendritic cell的成熟以及細胞激素的製造 (Houot et al. 2006)。NK細胞在癌症患者中的細胞活性則與Treg的數量呈現負相關的關係，表示Treg也能抑制NK細胞的活性。在in vitro study中，Treg能夠阻斷NK-mediated cytolysis以及IFN-γ的製造，也會向下調控NK-activating receptor NKG2D (Ghiringhelli et al. 2005a)。

1.3.2 Treg細胞與癌症

腫瘤可能會製造一些因子或細胞激素來增加CD4⁺ Treg細胞在淋巴以及周邊血液的產生，藉此阻斷對腫瘤抗原具有特異性的免疫反應產生。在頭頸癌、肝癌、胃癌、乳癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤(melanoma)、腎細胞癌以及胰臟癌中，周邊血液的CD4⁺ Treg細胞的濃度都會增加 (Li et al. 2005; Liyanage et al. 2002; Okita et al. 2005; Schaefer et al. 2005)。有研究顯示，癌症患者中CD4⁺CD25⁺ T細胞的量大約佔了所有CD4⁺ T細胞的13-52% (Wolf et al. 2003)。其中CD25^{high}或是Foxp3⁺的細胞，約佔所有CD4⁺ T細胞的4-10%，這比正常人的1-2%高出許多 (Cesana et al. 2006; Ormandy et al.

2005)。此外，在子宮頸癌、子宮內膜癌、胃癌以及黑色素瘤的患者中，腫瘤引流淋巴結(tumor draining lymph node)中的Treg細胞會增多 (Fattorossi et al. 2004; Kawaida et al. 2005; Matsuura et al. 2006)。有研究指出，在胃癌患者中，Treg在越靠近腫瘤的引流淋巴結中濃度會越高。在黑色素瘤中，在靠近腫瘤的淋巴結中，即使沒有腫瘤的侵犯，其Treg的濃度也會上升 (Viguier et al. 2004)。在許多癌症中，包括乳癌、卵巢癌、肺癌、非何杰金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、肝癌以及黑色素瘤中，腫瘤中都會產生 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ Treg細胞的浸潤 (Chen et al. 2005b; Leong et al. 2006; Unitt et al. 2006; Unitt et al. 2005; Woo et al. 2001)。而在卵巢癌中，不管腫瘤的分級為何，腫瘤中 $CD4^+CD25^+$ T細胞的數量越多，則臨床預後越差 (Curiel et al. 2004)。也有其他研究指出卵巢癌中，腫瘤內Foxp3濃度的增加與存活率的降低有高度的相關 (Wolf et al. 2005)。然而在某些腫瘤的研究當中，卻無法確定 $Foxp3^+$ T細胞與存活率的關係 (Alvaro et al. 2005; Badoual et al. 2006)。

1.3.3 Treg細胞與口腔鱗狀上皮細胞癌

在HNSCC的患者中，其周邊血液單核球細胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)中的 $CD4^+$ 以及 $CD8^+$ T細胞的比例與健康的人的PBMC相比是低很多的，然而 $CD4^+/CD8^+$ 細胞比是沒有太大差異的，此外NK細胞的比例也比健康族群低很多。然而，HNSCC患者PBMC中的 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ T細胞的比例卻比健康族群的人高出許多。這顯示了HNSCC患者的確有受到免疫抑制的現象，而這可能受到Treg細胞的調節 (Bose et al. 2008)。Th1細胞分泌的細胞激素：IL-12、tumor necrosis factor- α (TNF- α)以及interferon- γ (IFN- γ)在HNSCC的患者中也會被向下調控；而Th2細胞分泌的細胞激素：IL-4、IL-6、IL-10則會增加 (Lathers et al. 2003)。OSCC的腫瘤組織中也被發現會表現Treg細胞，且表現量比正常組織來的要高 (Schwarz et al. 2008)。雖然在許多腫瘤的研究當中提出Treg細胞的增加可能會使患者的預後變差，卻有研究發現在HNSCC中卻發現腫瘤組織中Treg細胞數量越多，腫瘤的局部區域控制(locoregional control)會越好，而這可能有助於患者的預後 (Badoual et al. 2006)。

1.4 第四節 細胞激素的調控

慢性發炎能促進癌症的發展，其中TAM、Treg以及MSC對於促進腫瘤的生長以及

腫瘤對免疫反應的逃逸機制扮演了重要的角色，然而免疫細胞之間的連結則是經由各種細胞激素的調控，而腫瘤細胞本身也會分泌細胞激素與這些免疫細胞相互作用。藉由細胞激素的調控能夠抑制或是增加抗腫瘤的免疫反應，並使腫瘤的微環境偏向有利於生長的狀態或是抑制腫瘤的生長。IL-1 β 以及IL-6是促進發炎反應的重要細胞激素，而Treg以及TGF- β 則是在調控抗發炎反應上扮演著重要的角色。因此在OSCC中，IL-1 β 以及IL-6調控的促發炎反應，與Treg以及TGF- β 調控的免疫抑制反應兩者之間的關係以及對於OSCC的影響，是很值得探討的。

1.4.1 介白素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)

IL-1是一種多效性(pleiotropic)的細胞激素，與許多急性或慢性發炎疾病，如敗血症或風濕性關節炎，以及惡性腫瘤的致病原因有關 (Apte and Voronov 2008)。IL-1能夠由很多種類的細胞製造並分泌，包括了基質細胞、單核球(mononuclear cell)、TAM以及惡性腫瘤細胞。IL-1與TNF α 被稱作alarm cytoline，經常由巨噬細胞分泌以起始發炎反應。IL-1與TNF α 會刺激自己或是彼此的分泌產生正向的回饋 (Apte et al. 2006a; Apte et al. 2006b; Apte and Voronov 2002)。IL-1的成員包括了IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1Ra(interleukin-1 receptor antagonist)以及IL-18與IL-33 (Dunn et al. 2001; Pizarro and Cominelli 2007; Sims et al. 2001)。而其中IL-1 β 在腫瘤的發展中，有著重要的影響。IL-1 β 的前驅物，pro-IL-1 β 在細胞中製造出來後，需要經由IL-1 β 轉換酶(IL-1 β converting enzyme, ICE)的切割，才會被活化成IL-1 β (Dinarello 2002)。IL-1 β 分泌出來後，在局部的低劑量會造成有限的發炎反應，接著啟動特定的免疫機制來對抗腫瘤，然而在高劑量下，廣泛性的發炎會造成周圍組織的破壞，使的腫瘤容易侵入深層的組織 (Song et al. 2005; Song et al. 2003)。

1.4.1.1 IL-1 β 對免疫反應的影響

Th2細胞需要APC以及IL-1 β 才能產生IL-4 receptor，之後才能藉由自泌(autocrine)的方式來刺激Th2細胞的生長 (McArthur and Raulet 1993; Weaver et al. 1988)。阻斷IL-1 β 也會使卵巢癌患者游離出來的APC所誘導產生的Th17減少 (Kryczek et al. 2009)，而Th17所製造的IL-17，又能誘導IL-1的產生，形成一個正向回饋 (Koenders et al. 2005)。另外也有研究顯示，在缺少其他adjuvant的時候，recombinant IL-1 β 能夠提供T細胞足夠的信號對抗原反應 (Apte and Voronov 2002; Li et al. 2007)。在實驗性系統

性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythromatosus, SLE)中，能作為adjuvant，造成對抗自體抗體的免疫反應，進而傷害受影響器官的組織 (Voronov et al. 2006)。而在植入IL-1 β secreting tumor的小鼠身上，MSC在周邊以及脾臟和腫瘤本身的堆積都會增加。進而抑制T細胞的功能。

1.4.1.2 IL-1 β 對細胞癌化的影響

在in vivo study中，使用3-methylcholantrene(3-MCA)，在小鼠身上誘導細胞癌化。發現IL-1 β -/-的小鼠，產生腫瘤的時間要很久，而且不是每隻小鼠都產生。但是在IL-1Ra-/-以及IL-1 α -/-的小鼠全部都在短時間內就產生腫瘤，尤其是IL-1Ra-/-小鼠產生的速度最快。因此，IL-1 β 在促進化學誘導的癌化反應(chemical-induced carcinogenesis)是很重要的 (Apte and Voronov 2008)。在受放射線誘導之急性骨髓白血病(radiation-induced myelogenous leukemia)的小鼠身上，發現其IL-1 β 的基因會受到受到改變，這可能是起始白血病發生原因之一 (Silver et al. 1989)。

1.4.1.3 IL-1 β 對腫瘤侵入性的影響

在in vivo study的動物以及癌症患者身上，局部IL-1濃度的增加通常與腫瘤的侵入性以及較差的預後有關。外生性的IL-1能夠誘導腫瘤微環境中的基質細胞、白血球以及腫瘤細胞產生如MMP、VEGF、纖維母細胞生長因子以及CXC chemokine等因子來促進腫瘤的生長及侵犯性。雖然沒有比較性的研究，但是由於IL-1 β 會大量分泌出細胞之外，而IL-1 α 主要是在存在細胞內，因此這些作用可能都是由IL-1 β 來誘導 (Apte et al. 2006a; Apte et al. 2006b; Apte and Voronov 2002)。另外在murine B16 model中，注入recombinant IL-1 β ，或是注入Lipopolysaccharide(LPS)來誘導IL-1的產生，會增加腫瘤產生肝臟轉移的機率 (Vidal-Vanaclocha et al. 1996; Vidal-Vanaclocha et al. 1994)。但是在IL-1 β -/-或ICE-/-的小鼠，肝臟轉移的機率會下降 (Vidal-Vanaclocha et al. 2000)。因為IL-1 β 會使肝竇狀隙內皮細胞(hepatic sinusoidal endothelial cell, HSE)上vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)以及very late antigen-4(VLA-4)的表現增加。這些adhesion molecule的增加使得腫瘤細胞容易附著在HSE上，因此增加了肝臟轉移的機會。IL-1 β 不但能促進發炎反應，也能增加血管新生。在一個 in vivo study中，IL-1 β 能增加小鼠角膜中的血管新生 (Nakao et al. 2005)。另一個 in vitro study中，IL-1 β 能增加人類腫瘤細胞株之中hypoxia inducible factor-1(HIF-1)的表現，而使腫瘤細胞分泌

VEGF (Jung et al. 2003)。

將IL-1 β 的cDNA轉送到纖維母細胞細胞株(fibrosarcoma cell line)中，發現IL-1 β transfected fibrosarcoma tumor會比原本的母細胞株更具侵犯性。當將此腫瘤細胞植入小鼠體內，腫瘤的生長速度會變快，而小鼠也較早死亡。且腫瘤的侵犯性與IL-1 β 的表現量相關。且腫瘤細胞分泌VEGF的量也會增加，腫瘤中血管新生也會增加 (Song et al. 2003; Werman et al. 2004)。在Breast carcinoma中，IL-1 β 的表現與其他breast cancer的指標都有相關 (Miller et al. 2000)。

1.4.1.4 IL-1 β 與口腔鱗狀上皮細胞癌

許多研究觀察到HNSCC的腫瘤組織內有高濃度IL-1，且在in vitro研究中發現SCC的細胞株有製造以及分泌IL-1 β 的能力 (Ahn et al. 1993; Woods et al. 1998a)。然而在HNSCC患者的周邊血液單核球與健康的人相比，IL-1 β 的分泌量並沒有顯著差異 (Gallo et al. 1993)。另外，雖然有研究指出IL-1 β 基因的變異會增加胃癌的發生率，然而卻與OSCC的發生沒有關係 (Vairaktaris et al. 2008)。

1.4.2 Interleukin 6(IL-6)

IL-6是一種強效的多效性發炎細胞激素，並且被認為是一種重要的生長促進因子 (growth-promoting factor) 以及抗凋亡因子 (anti-apoptotic factor) (Ishihara and Hirano 2002)。IL-6的接受器是由IL-6 receptor α 以及glycoprotein 130(gp130)組成。活化gp130會啟動Janus kinase 1(JAK1)，造成signal transducers and activator of transcription protein 1(STAT1)、STAT2以及STAT3 protein的磷酸化。STAT3蛋白的訊息傳導與惡性腫瘤細胞的生長以及存活有關，而STAT1的訊息則會抑制腫瘤的生長 (Osborne et al. 1999)。JAK-mediated STAT tyrosine phosphorylation具有改變某些特定基因的能力，而這些基因通常與細胞的apoptosis的進行或抑制有關，這也強調了IL-6在癌化過程的重要性 (Haura et al. 2005; O'Shea et al. 2002)。JAK-mediated STAT tyrosine phosphorylation能夠使特定的目標基因產生雙聚合作用(dimerization)、核轉移(nuclear translocation)或是活化，而這些目標基因通常都與細胞周期的進展或是細胞凋亡的抑制有關 (Haura et al. 2005; O'Shea et al. 2002)。

IL-6被認為在卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)以及多發性骨髓瘤(Multiple myeloma)的致病過程中扮演了重要的角色 (Bommert et al. 2006; Osborne et al. 1999)。

血液循環中的IL-6也可能增加何杰金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)的發生機率 (Cozen et al. 2004)。此外，在breast cancer的患者中，IL-6基因的promotor region的變異會使細胞製造大量的IL-6，與較差的預後有關 (Berger 2004)。在多發性骨髓瘤中，IL-6是由骨髓中的基質細胞製造的，這些IL-6會與惡性變化的漿細胞(plasma cell)反應，促進惡性細胞的生長，腫瘤細胞本身也會製造IL-6，並藉由autocrine的方式促進生長 (Chauhan et al. 1996; Jago et al. 2006)。抑制IL-6的信號，能夠減緩chemical-induced colitis-associated colon cancer(CAC)的生長 (Greten et al. 2004)。

1.4.2.1 IL-6與口腔鱗狀上皮細胞癌

在in vitro研究中，SCC細胞株會分泌IL-6，並且當p53基因突變的時候，IL-6分泌的量會大幅增加。此外，IL-1也會大幅度的增加IL-6的分泌 (Woods et al. 1998a)。HNSCC的腫瘤組織中也會表現大量的IL-6，且與組織型態的分級無關 (Woods et al. 1998b)。此外許多研究也指出OSCC患者的唾液或血清中，IL-6的濃度會提高(Rhodus et al. 2005)。在HNSCC患者的周邊血液單核球與健康族群相比，也會製造大量的IL-6 (Gallo et al. 1993)。另外在OSCC患者的DNA中，檢測出與IL-6基因的變異有高度相關，因此OSCC的發生或許與IL-6的製造有很大的關係 (Vairaktaris et al. 2008)。

1.4.3 變形生長因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β)

TGF- β 不僅是一種強效的免疫抑制以及抗發炎的細胞激素，也是調控Treg細胞生長以及功能的主要角色 (Becker et al. 2006; Chen and Wahl 2003; Ghiringhelli et al. 2005b)。TGF- β 的訊號主要是經由啟動SMAD transcription factor來傳遞。TGF- β 在腫瘤的微環境中會由腫瘤細胞、基質細胞以及浸潤的免疫細胞分泌 (Moutsopoulos et al. 2008)。TGF- β 有抑制colon epithelial cell生長的能力，如果type II TGF- β receptor(T β RII)的突變造成TGF- β 訊號傳遞有缺陷，則會提高結腸癌(colon cancer)的發生率 (Kim et al. 2000; Parsons et al. 1995)。這似乎顯示了TGF- β 在癌化時作為腫瘤抑制者的重要性。

有研究指出，TGF- β 的訊號在晚期的Colitis associated colon cancer中可以抑制IL-6的分泌，進而控制腫瘤的生長。而IL-6活化的STAT3訊號則會抵消TGF- β 調控的細胞抑制作用 (Becker et al. 2004; Jenkins et al. 2005)。因此TGF- β 與IL-6在某些癌症中可能有互相拮抗的功能。

儘管TGF- β 有顯著的抗發炎能力以及抑制初期腫瘤生長的能力，在某些腫瘤

TGF- β 也能促進腫瘤的生長。有研究指出Carcinoma常常分泌大量的TGF- β ，並且能幫助腫瘤的侵入和轉移 (Derynck et al. 2001)。此外，TGF- β 也能誘導微環境改變，增加血管新生，抑制CD8+ T cell，進而促進了腫瘤的生長 (Chen et al. 2005a)。因此TGF- β 在腫瘤中扮演了促進或是抑制的角色，可能與腫瘤的期別以及類型有關。

1.4.3.1 TGF- β 對免疫系統的調控

在腫瘤微環境中，TGF- β 是一種發炎細胞的強效recruitment factor，TGF- β 不只扮演免疫監測(immune surveillance)的角色，卻也能夠建立一個使腫瘤逃逸免疫監測的環境。TGF- β 與Treg細胞的分化以及功能有很重要的關連性，並且能夠誘導Foxp3的表現 (Chen et al. 2003; Wahl et al. 2006)。Treg能夠經由TGF- β 的調控來抑制作用性T細胞的功用 (Strauss et al. 2007)。TGF- β 也具有誘導Treg聚集到腫瘤微環境中的功能 (Chen et al. 2003)。

TGF- β 與IL-6以及IL-21是Th17細胞的分化因子(differentiation factor)，藉由活化STAT3會誘導retinoic-acid-related orphan receptor(ROR γ t)產生，ROR γ t能進一步控制Th17分化 (Ivanov et al. 2006; Korn et al. 2007)。Th17細胞會分泌IL-17，在腫瘤處過度表現的IL-17與召集吞噬細胞到腫瘤有關，並且增加腫瘤內的血管新生 (Numasaki et al. 2005)。局部堆積的IL-17會使腫瘤容易生長，而系統循環的IL-17則會使遠端轉移的機會增加 (Kryczek et al. 2007; Stockinger et al. 2007)。TGF- β 也能誘導CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺Treg細胞的聚集以及生成使其進行免疫抑制的作用，使tumor-specific CD8⁺ response受到影響 (Chen et al. 2003; Chen and Wahl 2003; Strauss et al. 2007; Wahl et al. 2006)。

腫瘤產生的TGF- β 會干擾DC的移動以及DC將抗原傳送到淋巴系統的功能，此外也會使DC逐漸的apoptosis，以減少DC的數量，並且會抑制MHC class II molecule以及costimulatory molecule的表現 (Ito et al. 2006; Khazaie and von Boehmer 2006)。TGF- β 也能刺激VEGF以及其他angiogenic factor的表現，其中VEGFR-3以及VEGF-C的表現會與HNSCC的delay neck metastasis有關，而VEGF-A則會增加HNSCC患者的微血管密度、疾病的進展速度，以及減少成熟的DC，在會在周邊產生許多不成熟的DC，當T細胞受到不成熟的DC表現的訊號，會表現與Treg細胞一樣的marker，並進一步分泌TGF- β 、IL-10、VEGF-A (Strauss et al. 2005; Warburton et al. 2007)。

1.4.3.2 TGF- β 與口腔鱗狀上皮細胞癌

HNSCC的患者中，與正常的黏膜相比，TGF- β 在腫瘤旁的癌前病變中，有大量的表現，因此TGF- β 在HNSCC的發展早期可能就有影響 (Lu et al. 2004)。在HNSCC中，有研究指出TGF- β 是一種強效的腫瘤抑制劑 (Xie et al. 2003)。然而也有研究指出TGF- β 1，TGF- β 的三種同種異構物(isoform)之一，會藉由活化gelatinase以及MMP-2來增加OSCC的侵入性 (Takayama et al. 2009)。這可能是因為TGF- β 在不同階段或是不同濃度下所活化的路徑不同，因此造成這樣的差異。In vitro研究的HNSCC小鼠模型中，在TGF- β 正常的訊號傳遞時，TGF- β 是一種主要的腫瘤抑制劑，然而當TGF- β 的訊號傳遞出現問題的時候，會啟動PI3K/AKT路徑，促進細胞的癌化 (Bian et al. 2009)。



第二章 材料和方法

2.1 第一節 實驗樣本

本實驗之樣本從 1998 到 2004 年間，71 例於臺大醫院牙科部口腔顎面外科求診之口腔鱗狀上皮細胞癌病患，其診斷均經常規之組織病理學臨床切片確認。其中包括男性 65 例，女性 6 例，平均年齡 53 歲，其腫瘤位置、TNM 狀況及病理分期與口腔習慣等之詳細分布，可參閱附表。所有標本之取得及使用均經病人同意並簽署同意書。

2.2 第二節 標本之固定與包埋

新鮮的標本在切取後，立即浸泡於足量的 10% 中性福馬林(formalin)溶液中，固定至少 24 小時以上，再經例行性的脫水程序後，以石蠟 (paraffin)包埋，包埋之組織切成 4 μ m 厚的切片，經酸洗過程及 0.001% poly-L-lysine (PLL)塗覆於載玻片上後，放置於 56°C 烘箱中熱處理 4 小時，以作進一步的免疫組織化學染色。

2.3 第三節 免疫組織化學染色 (immunohistochemical stain)

2.3.1 反應藥劑

免疫組織化學染色法是採取二次抗體結合技術，即利用初級抗體(primary antibody)與細胞中抗原 (antigen)結合後，加入生物素化的次級抗體 (biotinylated secondary antibody)與初級抗體結合，再藉由鏈黴菌卵白素-過氧化氫酶複合物 (streptavidin-peroxidase conjugate)與生物素之間的強結合力，使之與次級抗體結合，最後加入呈色劑 (chromogen)來偵測抗原所在位置。

本實驗亦採取實驗樣本之切片，滴入不加任何初級抗體之抗體稀釋液 (antibody dilutor)，並進行一整套的免疫組織化學染色程序，作為陰性對照組，結果顯示無任何反應。

2.3.2 初級抗體的選擇

本實驗所採用的初級抗體為 anti-IL-1 β 、anti-IL-6、anti-TGF- β 與 anti-Foxp3 四種抗體。本實驗將四種抗體，以抗體稀釋液 (antibody dilutor, Ventana Medical Systems) 分別稀釋成 1:50、1:100、1:150、1:200、1:250、1:500 等梯次濃度進行試驗性染色，觀察呈色效果，四種抗體皆以 1:100 的稀釋濃度所表現之染色鑑別力最佳，且反應時間恰當，故皆以 1:100 之稀釋濃度進行實驗。

2.3.3 實驗步驟

1. 脫蠟及復水 (deparaffinization & rehydration)

(1) 將切片次第浸泡於三缸純二甲苯 (xylene) 溶液中脫蠟，每缸分別浸泡 10 分鐘。

(2) 脫蠟後依序浸泡於濃度遞減之酒精溶液中復水：100%無水酒精兩缸，95%、85%、75%、50%酒精各一缸，每缸分別浸泡三分鐘。再置於流動自來水 (running water) 中沖洗 10 分鐘。

2. 組織抗原性恢復處理 (antigen retrieval)

採用微波爐加熱法，將組織標本玻片浸入 0.01 M 檸檬酸水溶液加熱至沸騰，於 850W 功率下，持續加熱直至溶液再沸騰 10 分鐘，之後以流動之自來水冷卻 10 分鐘。

3. 阻斷內生性過氧化氫酶 (blocking endogenous hydrogen peroxidase)

將組織切片浸漬於 3%過氧化氫-甲醇溶液 (methanolic H₂O₂ solution) 10 分鐘，用以阻斷內生性過氧化氫酶，防止偽陽性反應，之後置於一缸的蒸餾水及三缸的 PBS 中各潤洗 5 分鐘。

4. 阻斷非特異性抗原 (non-specific antigen) 的結合

欲加入 antibody 的切片上分別滴上 10%山羊血清 (non-immune goat serum, Histostain®-Plus, Invitrogen, Camarillo, CA)，混合均勻後靜置 10 分鐘，用以阻斷非特異性的背景染色。

5. 初級抗體作用

切片上加上足量 (約 100 μ l) 稀釋好的抗體溶液 (Anti-IL- β 1:100; Anti-IL-6 1:100; Anti-TGF- β 1:100; Anti-Foxp3 1:100)，在 4 $^{\circ}$ C 下隔夜作用。於次日早晨，再以 PBS 潤洗三次，每次分別為 5 分鐘。

6. 偵測抗原抗體結合系統

滴上生物素化二級抗體 (biotinylated secondary antibody, Histostain®-Plus, Invitrogen, Camarillo, CA)，在室溫下作用 30 分鐘，使之與初級抗體結合，接著再以 PBS 潤洗三次，每次 5 分鐘，以洗去多餘的生物素化次級抗體。再滴加滴加鏈黴菌卵白素-過氧化氫酶複合物 (Streptavidin peroxidase conjugate, Histostain®-Plus, Invitrogen, Camarillo, CA))，置於室溫下作用 30 分鐘，使與生物素化次級抗體結合，再以 PBS 潤洗三次，每次各 5 分鐘以洗去多餘之卵白素-過氧化氫酶複合物。

7. 呈色

使用 DAB Kit (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) 進行呈色，於組織切片上各滴加兩滴，置於室溫下作用，同時並於光學顯微鏡下偵測呈色反應之效果，呈色時間依初級抗體反應效率而異，相同抗體的呈色時間均控制在同樣時間，待褐棕色反應產物出現至適當呈色強度時，將玻片置入蒸餾水中，終止呈色反應並洗去多餘之 DAB。

8. 背景染色

將切片置於 Mayer's 蘇木紫 (hematoxylin) 染色液中 1 分鐘後，以流動之自來水沖洗 10 分鐘。

9. 脫水

接著將玻片浸泡於濃度遞增的酒精溶液中脫水，依序浸漬於 50%、75%、85%、95% 四缸不同濃度酒精溶液中，以及 100% 酒精三缸，每缸各浸泡 3 分鐘，最後置入 75% 二甲苯-25% 酒精混合液中 3 分鐘，再次置入二甲苯三缸，每缸各浸泡 3 分鐘，完成脫水步驟。

10. 封片 (mounting)

切片經脫水後，以組織封片膠 (histomount Entelan) 進行封片，乾燥後即告完成免疫組織染色，並以顯微鏡觀察。

2.4 第四節 免疫組織化學染色後之觀察與紀錄

(一) 觀察：

以光學顯微鏡觀察各染色標記於組織切片上之呈色。

(二) 染色程度的定量

記錄 IL-1 β 、IL-6 與 TGF- β 於腫瘤細胞巢 (tumor nest)，及周邊基質細胞與浸潤免疫細胞之染色反應程度，每一樣本於 100 倍放大倍率下，選擇染色性最強之 5 個區域，觀察陽性染色細胞佔所有癌細胞與基質細胞及浸潤免疫細胞之比例，分別得到陽性癌細胞標記指數 (cancer labeling index, CLI)，以及陽性基質細胞與浸潤免疫細胞標記指數 (stromal and infiltrating immune cell labeling index, SILI)。並將等級定義為 0 (無陽性染色細胞)；1 (0~10% 陽性染色細胞)；2 (10~50% 陽性染色細胞)；3 (50~80% 陽性染色細胞)；4 (80~100% 陽性染色細胞)。並觀察陽性染色細胞於癌細胞中的強度 (intensity score,

IS)，並將等級分為 0(無陽性染色)；1(輕微陽性染色)；2(中度陽性染色)；3(重度陽性染色)。並將標記指數及強度相乘後得到陽性癌細胞標計分數(cancer cell labeling score, CLS)。Foxp3 的標記指數(Labeling index, LI)則以 500 倍放大倍率下，選擇染色性最強的 5 個區域，計算其中陽性染色細胞於腫瘤浸潤的淋巴球中的比例來記錄。

(三) 臨床變數之記錄

複查口腔鱗狀細胞癌患者臨床紀錄之文件來源包括：病歷正本、病歷縮影、與癌症登記室的追蹤資料。記錄的項目包括有：病人的性別、年齡、TNM 臨床分期、癌症發生部位、術後是否復發、復發或死亡時間、口腔鱗狀細胞癌細胞分化程度等。評估病人的 TNM 臨床分期是採用是美國癌症聯合委員會 TNM 分期系統第六版(American Joint Committee on Cancer (AJCC)6th edition TNM staging system)。主要依據術後的病理報告、臨床斷層掃描及核磁共振攝影的結果，決定 TNM 臨床分期。評估參數包括原發腫瘤大小，腫瘤有無侵犯鄰近組織，局部淋巴結轉移，及遠處器官轉移等。

(四)、統計分析

本研究之資料以 IBM SPSS statistics 17(SPSS inc., IBM, Chicago) 統計套裝軟體進行分析。

1. 利用 Pearson 積差相關係數(Pearson product-moment correlation coefficient)來評估 IL- β 、IL-6、TGF β 及 Foxp3 於 OSCC 中表現的相關性。
2. 利用 Student's t 檢定、Kruskal-Wallis H 檢定以及 Mann-Whitney U 檢定分析 IL- β 、IL-6、TGF- β 及 Foxp3 於 OSCC 的表現與臨床參數間的差異性。
3. 利用 Kaplan-Meier survival analysis 分析 IL-1 β 、IL-6、TGF β 及 Foxp3 表現與存活率之關係。再利用 Log-rank test 進一步推論 IL-1 β 、IL-6、TGF β 及 Foxp3 於 OSCC 之表現是否與 OSCC 患者的存活時間有統計上相關性。各項統計分析均以 $p < 0.05$ 判定為有意義。

第三章 結果

3.1 第一節 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Transforming Growth Factor- β 以及 Foxp3 於口腔鱗狀上皮細胞癌之表現

本研究使用 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 及 Foxp3 之多株抗體，以免疫組織化學染色方法來檢測 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 及 Foxp3 於 OSCC 之表現。結果顯示 IL-6 於所有 OSCC 病例之癌細胞中皆有表現(71/71, 100%)，而 IL-1 β 及 TGF- β 則各有一個病例沒有表現(70/71, 98%)。IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 皆會表現於腫瘤細胞之細胞質中及細胞膜上，IL-1 β 及 IL-6 的陽性染色在基底細胞通常較深且表現於細胞質中，而基底上細胞則較常表現於細胞膜上且染色較淺。TGF- β 則於基底上細胞上呈現較強的表現，且主要皆表現於細胞質中。IL-1 β 的 CLI 為 5.6 ± 3.9 ，IL-6 為 5.9 ± 3.9 ，TGF- β 為 6.8 ± 3.7 。

所有病例之基質細胞及浸潤之免疫細胞皆表現 IL-6 陽性染色(71/71, 100%)，IL-1 β 有 5 例未表現(66/71, 70%)，TGF- β 則有 1 例未表現(70/71, 98%)。IL-1 β 的 SILI 為 2.8 ± 1.3 ，IL-6 為 2.6 ± 1.1 ，TGF- β 為 2.9 ± 0.9 。Foxp3 則皆表現於免疫細胞之上，且主要集中於腫瘤周圍。Foxp3 陽性細胞於腫瘤浸潤免疫細胞表現的平均標記指數為 6.3 ± 4.0 (%)。(表 1、表 2)(圖 1、圖 2、圖 3、圖 4)

3.2 第二節 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Transforming Growth Factor- β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果之間的相關性

IL-1 β 、IL-6 及 TGF- β 於腫瘤細胞中的表現(CLI)分別與其強度(IS)以及基質與浸潤免疫細胞中的表現(SILI)呈正相關。此外 IL-1 β 於腫瘤細胞中的表現也與 IL-6 於腫瘤細胞以及基質與浸潤之免疫細胞中的表現呈正相關，IL-1 β 於基質以及浸潤之免疫細胞中的表現也與 IL-6 於基質以及浸潤之免疫細胞中的表現呈正相關。IL-1 β 於腫瘤細胞中的表現也與 TGF- β 於腫瘤細胞以及基質與浸潤之免疫細胞中的表現呈正相關。IL-6 於腫瘤細胞之標記分數(CLS)則與 TGF- β 於腫瘤細胞以及基質與浸潤之免疫細胞中的表現呈正相關。TGF- β 於腫瘤細胞中的表現則與 Foxp3 的表現呈顯著相關。(表 3)

3.3 第三節 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Transforming Growth Factor- β

以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與各項臨床變數間及組織病理學參數的關係

(1) 患者年齡

本研究共有 71 位口腔鱗狀上皮細胞癌患者樣本，年齡介於 36 至 81 歲之間，平均年齡為 53 歲，主要年齡層為 40 至 60 歲之間，佔整體 70%。患者年齡小於 50 歲者有 30 人，大於等於 50 歲者有 41 人。利用 Student's t test 檢測，兩組於各項免疫組織染色結果皆無統計上的顯著相關性。(表 4)

(2) 患者性別

本研究 71 位患者中，男性 65 位，女性 6 位。男女比為 10.8:1。使用 Mann-Whitney U test 檢測，男性於 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 的各項表現上較女性為高，而女性患者的 Foxp3 表現量較男性患者為高，然而皆無統計上的顯著相關性。(表 5)

(3) 腫瘤位置

本研究 71 位患者中，頰黏膜癌 34 例(48%)，舌癌 28 例(39%)，齒齦與腭部癌症共 9 例(13%)。使用 Kruskal-Wallis H test 檢測，發現各部位於各項免疫組織染色結果上皆無統計上的顯著相關性。(表 6)

(4) 腫瘤大小

依據 AJCC TNM 分期系統，T1 有 20 例(28%)，T2 有 20 例，T3 有 11 例(16%)，T4 有 20 例。將腫瘤大小分組為 T1 與 T2 以及 T3 與 T4 兩組，使用 Student's t test 檢測，發現 Foxp3 的表現在兩組之間有統計上的顯著差異，且 T1 與 T2 組較高。IL-1 β 於腫瘤細胞之標記指數(CLI)以及強度(IS)於兩組間也存在統計上的顯著差異，且 T3 與 T4 組較高。(表 7)

(5) 淋巴結轉移

依據 AJCC TNM 分期系統，N0 有 46 例(65%)，N1 有 8 例(11%)，N2 有 17 例(24%)。使用 Kruskal-Wallis H test 檢測，發現各組間於各項免疫組織染色結果上皆無統計上的顯著相關性。此外，若將淋巴結轉移分為無轉移(N0)以及有轉移之組別(N1+N2)，經 Mann-Whitney U test 檢測，兩組間於各項免疫組織染色結果上亦皆無統計上的顯著相關性。(表 8)

(6) 分期期數

依據 AJCC TNM 分期系統，本研究 S1 有 15 例(21%)，S2 有 12 例(17%)，S3 有 13 例(18%)，S4 有 31 例(44%)。將所有病人分組為早期(S1 與 S2)以及晚期(S3 與 S4)兩組，使用 Mann-Whitney U test 檢測，發現 Foxp3 於兩組間存在統計上的顯著差異，且早期 Foxp3 的表現量較高。IL-1 β 的腫瘤細胞標記分數(CLS)於兩組間也存在統計上的顯著差異，且於晚期時 IL-1 β 的表現量較高。(表 9)

(7) 腫瘤細胞分化程度

本研究腫瘤分化良好者佔 57 例(80%)，分化中等者佔 14 例(20%)。使用 Mann-Whitney U test 檢測，發現 TGF- β 腫瘤細胞之標記指數於腫瘤分化良好組的表現量較高，並存在統計上的顯著差異。(表 10)

(8) 淋巴管或血管侵犯(Lymphovascular permeation, LVP)

術後病理檢查，有淋巴管或血管侵犯者有 18 例(25%)，沒有淋巴管或血管侵犯者有 53 例(75%)。經 Mann-Whitney U test 檢測，發現是否有淋巴管或血管侵犯，於各項免疫組織化學染色結果皆無統計上的顯著差異。(表 11)

(9) 轉移之淋巴結有膜外擴散(Extracapsular spreading, ECS)

術後病理檢查顯示轉移之淋巴結有膜外擴散者有 12 例(17%)，無膜外擴散者有 59 例(83%)，經 Mann-Whitney U test 檢測，發現是否有膜外擴散，於各項免疫組織化學染色結果皆無統計上的顯著差異。(表 12)

(10) 腫瘤復發

在原發腫瘤部位經由手術切除後，若於頭頸部還有腫瘤的生成則視為有復發的情況。在 71 位病患手術後，有 19 位(27%)有復發的情況。使用 Mann-Whitney U test 檢測，發現腫瘤復發與否，於各項免疫組織化學染色結果皆無統計上的顯著差異。(表 13)

3.4 第四節 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Transforming Growth Factor- β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與各項風險因子的關係

(1) 酒精攝取

本研究 71 位患者中，沒有喝酒習慣的有 10 位(14%)，有喝酒習慣的有 61 位。經

Mann-Whitney U test 檢測，發現 IL-6 於基質以及免疫細胞之標記指數(SILI)於有喝酒習慣的患者所表現的量較高，且有統計上的顯著差異。(表 14)

(2) 嚼食檳榔

71 位患者中，沒有嚼食檳榔習慣的患者有 7 位(10%)，有嚼食檳榔習慣的有 64 位。經 Mann-Whitney U test 檢測，發現 Foxp3 於無嚼食檳榔習慣的患者表現量較高，且有統計上的差異。(表 15)

(3) 抽菸

71 位患者中，沒有抽菸習慣者有 8 位(11%)，有抽菸習慣者有 63 位。經 Mann-Whitney U test 檢測，發現有抽菸者的 IL-1 β 的於腫瘤細胞中之表現(CLI, CLS)較未抽菸者高，且有統計上的顯著差異。(表 16)

3.5 第五節 Interleukin-1 β 、Interleukin-6、Transforming Growth Factor- β 以及 Foxp3 免疫組織化學染色結果與存活時間的關係

追蹤本研究期間，於術後因腫瘤死亡的患者共有 24 例(34%)，47 例則維持存活。追蹤的期間以患者接受治療開始至患者死亡或是最後一次追蹤時間為準。使用 Kaplan-Meier survival analysis 來分析 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 以及 Foxp3 於腫瘤細胞以及基質中表現量與存活率的關係。結果發現當 TGF- β 於腫瘤細胞之表現比例高於 50% 時，其累積存活率較高，且有統計上的顯著差異(Log-Rank test, $p=0.024$)(圖 9)。IL-1 β 於腫瘤細胞之表現高於 50% 時，其累積存活率有較低的趨勢，然而並未達到統計上的顯著差異。(圖 5、圖 6、圖 7、圖 8、圖 10、圖 11)

第四章 討論

OSCC 的患者已經被證實對抗腫瘤的免疫能力是被抑制的，而且腫瘤的生長以及復發與嚴重的免疫功能失調有關 (Whiteside 2004)。這其中可能有許多機制牽涉其中，包括許多腫瘤製造的抑制因子，如 prostaglandin E2(PGE2)；或是免疫抑制的細胞激素，如 interleukin-10(IL-10)；或是過多的免疫抑制巨噬細胞；以及腫瘤中出現的 Treg 細胞 (Reichert et al. 2002)。在 HNSCC 腫瘤中 CD4⁺ T 細胞以及 CD8⁺ 的細胞是比正常人來的少的。而 Foxp3⁺ Treg 細胞則比正常的組織多很多 (Bose et al. 2008)。而 Treg 對於其他免疫細胞的抑制是已經被證實的 (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009)。因此 HNSCC 中免疫細胞的減少，或許是 Treg 細胞的調控所造成的結果。

已經有研究證實，Foxp3⁺ Treg 細胞以及 TGF-β 在 OSCC 組織中的表現會比正常組織來的高 (Schwarz et al. 2008)。而 Foxp3⁺ Treg 細胞能夠製造 TGF-β，而 TGF-β 也能抑制 CD4⁺ 細胞分化成 Th1 以及 Th2 細胞，並藉由誘導 Foxp3 的表現使其能夠分化為 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T 細胞 (Chen et al. 2007)。此外在周邊血液的 Foxp3⁺ 細胞越多，則 TGF-β 的表現也會增加 (Gasparoto et al. 2010)。Gasparoto 等人的研究也指出，OSCC 組織中的 Treg 細胞能夠誘導 TGF-β 的產生。本研究中 Foxp3 的表現約佔淋巴球的 2-15%，且與 TGF-β 的表現成正相關，這表示在 OSCC 中 Foxp3 及 TGF-β 有互相刺激及誘導彼此製造的能力。

IL-1β 在腫瘤的微環境中能夠誘導巨噬細胞的堆積以及向上調控巨噬細胞分泌 IL-6 (Apte et al. 2006a; Gallo et al. 1993)。此外 IL-1β 也能誘導 Th17 細胞的產生，Th17 細胞會進一步分泌 IL-6 及 IL17 (Sutton et al. 2006)。In vitro 研究中，IL-1β 在 AML 以及 OSCC 中也會刺激腫瘤以及基質細胞產生 IL-6 (Beauchemin et al. 1991; Woods et al. 1998a)。我們的結果發現 IL-1β 於腫瘤細胞以及基質中的表現，與 IL-6 於腫瘤細胞以及基質中的表現是呈正相關的，這顯示了 IL-1β 表現量多的腫瘤，IL-6 的表現量也會較高，因此在活體 OSCC 組織中，IL-1β 可能也能向上調控 IL-6 的表現。

IL-1β 在大腸腫瘤中，會向上調控 MMP、VEGF 以及 TGF-β 的表現 (Lewis et al. 2006)。IL-6 會與 TGF-β 共同調控及誘導 Th17 細胞的分化，然而 TGF-β 在大腸癌中會調控 Stat3 的訊號使 IL-6 的表現下降 (Chen et al. 2007)，但是在神經膠質母細胞瘤

(glioblastoma)中，TGF- β 能夠誘導 IL-6 的產生，使其刺激癌細胞的生長及分化(Seoane 2009)。然而在本研究的結果當中，IL-1 β 及 IL-6 於癌細胞中的表現量皆與 TGF- β 癌細胞及基質中的表現量呈正相關。這顯示了 IL-1 β 在 OSCC 中，可能會與大腸腫瘤一樣的向上調控 TGF- β 。而 TGF- β 也可能會誘導 IL-6 的產生。

在腫瘤的微環境中，IL-1 β 可能藉由自泌(autocrine)或旁泌(paracrine)的方式來刺激周圍腫瘤或基質及免疫細胞的增生或堆積 (Apte and Voronov 2008)，而產生的腫瘤細胞或是基質中的纖維母細胞、巨噬細胞等等，又會進一步產生 IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 在腫瘤的微環境中也觀察到類似的現象 (Jakowlew 2006; Jego et al. 2006)。本研究中，IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 在腫瘤細胞中的表現，分別與其表現強度、以及基質中細胞與浸潤免疫細胞的表現成正比。這個結果指出，當腫瘤細胞中的 IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 表現量越多，則在基質以及浸潤免疫細胞中的表現也會越多。顯示了 IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 在 OSCC 中，可能也會藉由自泌或旁泌的方式來刺激細胞的增生或堆積，進而分泌出更多的細胞激素。

在我們的結果中，將腫瘤的大小以及期別分為兩組，發現 Foxp3⁺在腫瘤較小以及較早期的時候表現量較高，而 IL-1 β 則在晚期以及較大的腫瘤表現量較高。IL-1 β 能夠向上調控許多促發炎反應細胞激素(proinflammatory cytokine)，並且與腫瘤的生長以及侵入性有相關 (Cheng and Tsai 1999; St John et al. 2009)。因此在較晚期且體積較大的腫瘤中，IL-1 β 之高度表現是可以預期的。然而在 Distell 等人的研究當中，在期數較高的腫瘤中表現的 Treg 細胞較早期的腫瘤為多 (Distel et al. 2009)。Distell 等人的研究，呈現與我們相反的結果，這樣的差異可能是計算上的誤差所造成。我們計算 Treg 細胞的數量是以 Foxp3⁺細胞在高倍視野下佔總淋巴球的數量，而 Distell 則是在 100 個癌細胞的視野下 Foxp3⁺細胞的數量作為依據。

尼古丁以及檳榔鹼(arecoline)能夠誘導口腔腫瘤以及巨噬細胞表現 IL-1 β 以及 IL-6 (Cheng and Tsai 1999; Seyedroudbari and Khan 1998)。我們的結果顯示在抽菸的患者 IL-1 β 在腫瘤細胞以及基質中的表現高出不抽菸的患者許多，且具有統計上的顯著差異，這顯示抽菸的確會提高 IL-1 β 在 OSCC 中表現的量。IL-6 在抽菸的患者組織表現量是較不抽菸的患者高，然而並未達到統計上的顯著意義。

許多研究顯示酒精性肝炎以及肝硬化等情況，會造成血清中 IL-6 的表現增加

(Achur et al. 2010; Laso et al. 2007)。我們的研究結果顯示有喝酒習慣的患者，OSCC 組織中 IL-6 在基質以及浸潤之免疫細胞的表現較沒有喝酒習慣的患者來的高，且具有統計上的顯著差異。這個結果顯示喝酒不僅僅會提高血清中的 IL-6 的量，在腫瘤附近的 IL-6 也會增加，進一步增加了發炎反應的強度。

檳榔對於 OSCC 是一個強效的危險因子，且口腔白斑與黏膜下纖維化也與嚼食檳榔有很大的關係。有研究指出，檳榔會促進口腔黏膜內 IL-1 β 以及 IL-6 的分泌 (Chang et al. 2005; Cheng and Tsai 1999)。我們的結果中，雖然 IL-1 β 以及 IL-6 在嚼食檳榔的患者組織中有表現較高的趨勢，卻沒有達到顯著差異。然而，Foxp3 的表現卻具有統計上的顯著差異，且不嚼食檳榔的患者，Foxp3 的表現卻較嚼食檳榔的患者來的高，這顯示 Treg 細胞在不嚼食檳榔的患者中表現較多。這或許代表嚼食檳榔的患者其對於免疫的調控功能是不健全的，或是在不嚼食檳榔的患者中，Treg 細胞對於致癌的過程扮演著重要的角色。

對於 Foxp3⁺細胞的分化以及 Foxp3 的表現，TGF- β 是非常重要的調控者。並且藉由 TGF- β 的活化，Treg 細胞會直接接觸並抑制作用性 T 細胞的活化或是誘導 T 細胞的凋亡 (Houot et al. 2006)。然而 TGF- β 本身卻具有抑制腫瘤的能力，TGF- β 在許多上皮細胞株都顯示了抑制細胞生長的能力 (Zhou et al. 2003)。TGF- β 在許多腫瘤中扮演著矛盾的角色，在早期的時候 TGF- β 對於很多腫瘤有抑制的作用，然而到了腫瘤晚期的時候卻有促進腫瘤生長的作用 (Tang et al. 2003)。TGF- β 接受器基因的變異，也在某些腫瘤中被發現 (Chung et al. 1996; Izumoto et al. 1997; Markowitz et al. 1995)。而在 OSCC 的 *in vivo* 研究中顯示抑制 TGF- β 第一型接受器 (Type I transforming growth factor- β receptor, TGFBR1)，會使 TGF- β 的正常信息傳遞受到抑制，轉而啟動抑制細胞凋亡以及促進細胞生長的 PI3K/Akt 路徑，進而促進細胞的癌化 (Bian et al. 2009)。雖然 TGF- β 同時具有抑制以及促進腫瘤生長的能力，但是在 HNSCC 中似乎是偏向抑制腫瘤生長的功用 (Xie et al. 2003)。在我們的研究結果當中發現，TGF- β 在分化較良好的腫瘤細胞中表現高出分化不良的腫瘤細胞許多，從免疫化學組織染色上的觀察也可發現 TGF- β 的表現主要出現在基底上層分化較完整的腫瘤細胞上。此外，我們發現 TGF- β 表現較高的患者，其生存率較 TGF- β 表現較低的患者為高，且具有統計上的顯著差異。這個結果證實了 TGF- β 在 OSCC 中偏向於抑制腫瘤的角色，且表現 TGF- β

的表現較高，患者的存活率較高。

在 *in vivo* 研究中，受到 LPS 刺激而導致 Toll-like receptor 活化的 DC，會分泌 IL-1 以及 IL-6，而這些 IL-1 以及 IL-6 會拮抗 Treg 的免疫抑制能力 (Kubo et al. 2004)。也有 *in vivo* 研究指出在皮膚發炎的小鼠上，tumor necrosis factor- α (TNF- α)的表現能夠增加發炎前驅細胞激素(pro-inflammatory cytokine)如 IL-1 β 以及 IL-6 的分泌，以及抑制 Foxp3 的表現 (Ma et al. 2010)。這顯示了 Treg 的免疫抑制反應與 IL-1 β 以及 IL-6 的促發炎反應是互相抵觸的，在我們的結果中雖然 IL-1 β 以及 IL-6 於腫瘤細胞中的表現與 Foxp3 的表現沒有達到負相關，然而卻有這樣的趨勢。

而我們研究中，TGF- β 與 Foxp3 的表現是呈正相關的，且 TGF- β 是調控 Treg 細胞功能的重要細胞激素，Treg 細胞主要的功能是抑制免疫反應。Treg 抑制免疫反應的能力似乎有利於腫瘤逃離免疫系統的監測，這似乎與 TGF- β 抗腫瘤的功能互相抵觸，而且 Treg 細胞並不只抑制適應性免疫反應，也同樣會抑制先天性免疫反應。Treg 細胞在 HNSCC 中已被證實會對抑制各種作用性免疫細胞 (Bose et al. 2008; Chikamatsu et al. 2007)。在非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)以及肝癌(hepatocellular carcinoma)中 Treg 的表現越高，則患者的預後會越差 (Shimizu et al. 2010; Zhou et al. 2009)。然而在結腸癌(colon cancer)以及鼻咽癌(nasopharyngeal cancer)中，Treg 的表現越高患者的預後越好 (Correale et al. 2010; Zhang et al. 2010)。在 HNSCC 的研究中，Badoual 等人提出腫瘤中浸潤的 Treg 細胞越多，則腫瘤的局部區域控制越好，這似乎有益於癌症的預後 (Badoual et al. 2006)。然而 Distel 等人的研究，卻沒有發現腫瘤中浸潤的 Treg 對於腫瘤的生長以及存活率有任何影響 (Distel et al. 2009)。

此外，OSCC 的腫瘤 TNM 期別越高預後越差，而我們的研究中顯示 Foxp3 於早期表現較高。且 Foxp3 於嚼食檳榔的患者中表現較低，表示腫瘤的微環境是偏向於發炎反應的。Treg 的重要調控者 TGF- β 越高，患者的存活率越高。雖然在此篇研究中 Treg 對於存活率沒有顯著的影響，但是 Treg 或許在 OSCC 中能夠藉由調控其他細胞或分泌抗發炎的細胞激素，如 TGF- β 、IL-10 來控制腫瘤的生長及侵犯性，而 OSCC 逃離免疫監測的機制可能並不是由 Treg 細胞主導。

第五章 結論

由我們的結果發現 IL-1 β 、IL-6 以及 TGF- β 於腫瘤細胞的表現分別與其在基質及浸潤之免疫細胞表現呈正相關。這顯示腫瘤細胞中這些細胞激素的表現越高，也能增加基質以及浸潤之免疫細胞的表現，兩者之間是呈正向的回饋。此外，IL-1 β 與 IL-6 的表現呈現正相關，且其於組織切片上的表現型態相同，顯示 OSCC 中 IL-1 β 應該有向上調控 IL-6 的能力。IL-6 以及 IL-1 β 的表現與 TGF- β 也呈現正相關，或許是為了拮抗 IL-1 β 以及 IL-6 啟動的免疫反應而產生。IL-1 β 在 T3 及 T4 的腫瘤以及第三期與第四期的腫瘤中表現量較高，顯示較具侵犯性的 OSCC 中 IL-1 β 的表現是比較高的。Foxp3 的表現則與 IL-1 β 相反，於 T1 以及 T2 與第一期以及第二期的腫瘤中表現較高，顯示在較早期、較不具侵犯性的 OSCC 中 Treg 的表現會較高。有喝酒習慣的患者，腫瘤基質中 IL-6 的表現會比較高。有抽菸習慣的患者，IL-1 β 於腫瘤細胞中的表現會比較高。而 Foxp3 的表現則是在不嚼食檳榔的患者表現較高。三者的結果都顯示了會促進組織的發炎反應，顯示 OSCC 與發炎之間有很密切的關係。TGF- β 於腫瘤細胞表現較高的患者累積存活率較高，顯示 TGF- β 的表現有助於 OSCC 的預後。TGF- β 在分化較好的腫瘤組織中的表現會較分化較差的腫瘤組織來的高，而從染色切片的觀察，TGF- β 主要也表現於分化較好的腫瘤細胞中。但在本研究中，Treg、IL-1 β 以及 IL-6 對於患者之累積存活率並沒有影響。其他如患者年紀、性別，腫瘤的位置、淋巴結的轉移、淋巴或血管的侵犯、轉移淋巴結之膜外擴散以及腫瘤復發，皆與 Foxp3、IL-1 β 、IL-6 以及 Foxp3 於 OSCC 中的表現無關。

附表與附圖

表 1

IL-1 β 、IL-6 及 TGF- β 於 OSCC 腫瘤細胞上之陽性染色之標記指數(Labeling Index)、強度(Intensity)及平均標記分數(Labeling score)

Cell type	Labeling Index for Positive Cells					Intensity Scores				Mean Labeling Score
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	
IL-1β	1	16	17	16	21	1	23	24	23	5.6 \pm 3.9
IL-6	0	15	13	8	35	0	25	29	17	5.9 \pm 3.9
TGF-β	1	4	7	29	30	1	20	27	23	6.8 \pm 3.7

Labeling index: 0(no staining), 1(0-10% positive cells), 2(10-50% positive cells), 3(50-80% positive cells), 4(80-100% positive cells);

Intensity score: 0(no staining), 1(mild), 2(moderate), 3(Strong)

所有病例皆表現 IL-6 及 Foxp3 陽性染色，而 IL- β 及 TGF- β 各有一病例未呈現陽性染色。

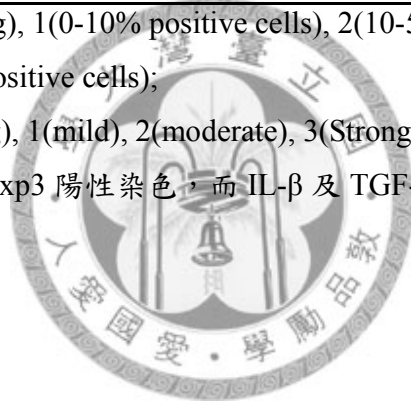


表 2

IL-1 β 、IL-6 及 TGF- β 於 OSCC 基質細胞及浸潤之免疫細胞上陽性染色之標記指數 (Labeling Index)

Cell type	Labeling Index for Positive Cells				
	0	1	2	3	4
IL-1β	5	8	14	15	29
IL-6	0	13	19	20	19
TGF-β	1	3	21	25	21

所有病例之基質細胞及浸潤之免疫細胞皆表現IL-6陽性染色，IL-1 β 有5例未表現，TGF- β 則有1例未表現。Foxp3於腫瘤浸潤的免疫細胞中表現的平均標記指數為6.3 \pm 4.0(%)，範圍為2-15%之間。



表 3

IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp3 於 OSCC 中各項標記指數、強度、標記分數之相關性

		IL-1 β CLI	IL-6 CLI	TGF- β CLI	Foxp3 LI
IL-1β CLI	R=		0.537	0.246	- 0.062
	P=		0.000*	0.039*	0.607
IL-1β IS	R=	0.575	0.229	0.175	- 0.087
	P=	0.000*	0.054	0.144	0.473
IL-1β CLS	R=	0.874	0.460	0.280	- 0.113
	P=	0.000*	0.000*	0.018*	0.349
IL-1β SILI	R=	0.357	- 0.025	0.106	- 0.003
	P=	0.002*	0.835	0.380	0.981
IL-6 CLI	R=	0.573		0.184	- 0.036
	P=	0.000*		0.124	0.764
IL-6 IS	R=	0.482	0.559	0.198	- 0.007
	P=	0.000*	0.000*	0.098	0.953
IL-6 CLS	R=	0.594	0.833	0.254	- 0.030
	P=	0.000*	0.000*	0.033*	0.801
IL-6 SILI	R=	0.425	0.561	0.109	- 0.187
	P=	0.000*	0.000*	0.365	0.118
TGF-β CLI	R=	0.134	0.129	0.271	0.238
	P=	0.265	0.283	0.022*	0.046*
TGF-β IS	R=	0.258	0.185	0.318	0.060
	P=	0.030*	0.123	0.007*	0.619
TGF-β CLS	R=	0.250	0.196	0.277	0.104
	P=	0.035*	0.102	0.019*	0.388
TGF-β SILI	R=	0.246	0.184		- 0.146
	P=	0.039*	0.124		0.225
Foxp3 LI	R=	- 0.062	- 0.036	0.238	
	P=	0.607	0.764	0.046*	

LI= labeling index; CLI= cancer cell labeling index; IS= intensity score; CLS= cancer labeling score; SILI= stromal and infiltrating immune cell labeling index.

表 4

年齡與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Age < 50 (n= 30) (Mean \pm SD)	Age \geq 50 (n= 41)	p-Value
IL-1 β CLI	2.5 \pm 1.1	2.6 \pm 1.2	0.856
IL-1 β IS	2.0 \pm 0.9	1.9 \pm 0.8	0.422
IL-1 β CLS	5.8 \pm 3.9	5.5 \pm 4.0	0.744
IL-1 β SILI	2.5 \pm 1.4	3.0 \pm 1.2	0.126
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.3	3.0 \pm 1.2	0.614
IL-6 IS	2.0 \pm 0.8	1.8 \pm 0.7	0.292
IL-6 CLS	6.1 \pm 4.1	5.9 \pm 3.9	0.770
IL-6 SILI	2.5 \pm 1.1	2.7 \pm 1.1	0.503
TGF- β CLI	3.0 \pm 1.1	3.3 \pm 0.8	0.190
TGF- β IS	1.9 \pm 0.9	2.1 \pm 0.7	0.319
TGF- β CLS	6.4 \pm 4.1	7.1 \pm 3.4	0.419
TGF- β SILI	2.9 \pm 1.1	2.9 \pm 0.8	0.960
Foxp3 LI	5.3 \pm 3.8	7.0 \pm 4.0	0.067

表 5

性別與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Female (n= 6) (Mean \pm SD)	Male (n= 65)	p-Value
IL-1 β CLI	2.0 \pm 1.3	2.6 \pm 1.2	0.216
IL-1 β IS	1.6 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.336
IL-1 β CLS	3.3 \pm 2.6	5.8 \pm 4.0	0.144
IL-1 β SILI	2.3 \pm 1.4	2.8 \pm 1.3	0.330
IL-6 CLI	2.7 \pm 1.2	2.9 \pm 1.2	0.601
IL-6 IS	1.5 \pm 0.5	1.9 \pm 0.7	0.208
IL-6 CLS	4.2 \pm 2.6	6.1 \pm 4.0	0.303
IL-6 SILI	1.8 \pm 0.8	2.7 \pm 1.1	0.053
TGF- β CLI	3.0 \pm 1.1	3.2 \pm 0.9	0.679
TGF- β IS	2.0 \pm 0.9	2.0 \pm 0.8	0.948
TGF- β CLS	6.5 \pm 4.0	6.9 \pm 3.7	0.851
TGF- β SILI	2.5 \pm 1.2	2.9 \pm 0.9	0.317
Foxp3 LI	8.5 \pm 4.3	6.1 \pm 4.0	0.123

表 6

腫瘤位置與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Cheek (n= 34) (Mean \pm SD)	Tongue (n= 28)	Gingiva and palate (n= 9)	p-Value
IL-1 β CLI	2.4 \pm 1.2	2.6 \pm 1.2	2.8 \pm 1.2	0.736
IL-1 β IS	2.0 \pm 0.8	1.9 \pm 0.9	2.0 \pm 0.9	0.965
IL-1 β CLS	5.6 \pm 4.0	5.5 \pm 3.9	6.1 \pm 4.2	0.919
IL-1 β SILI	2.9 \pm 1.3	2.6 \pm 1.3	3.0 \pm 1.3	0.546
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.3	2.9 \pm 1.2	3.2 \pm 1.3	0.580
IL-6 IS	2.0 \pm 0.8	1.9 \pm 0.7	1.8 \pm 0.8	0.833
IL-6 CLS	6.0 \pm 4.1	5.9 \pm 3.7	6.3 \pm 4.3	0.966
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.5 \pm 1.1	3.0 \pm 1.1	0.511
TGF- β CLI	3.3 \pm 0.9	3.0 \pm 0.9	3.2 \pm 0.8	0.335
TGF- β IS	2.0 \pm 0.9	2.0 \pm 0.7	2.3 \pm 0.7	0.461
TGF- β CLS	7.0 \pm 4.0	6.2 \pm 3.5	7.8 \pm 3.3	0.467
TGF- β SILI	2.7 \pm 1.0	2.9 \pm 0.9	3.3 \pm 0.7	0.211
Foxp3 LI	6.6 \pm 4.2	6.1 \pm 4.0	5.6 \pm 3.2	0.861

表 7

腫瘤大小(T)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	T1 + T2 (n= 40) (Mean \pm SD)	T3 + T4 (n= 31)	p-Value
IL-1β CLI	2.3 \pm 1.1	3.0 \pm 1.1	0.010*
IL-1β IS	1.8 \pm 0.8	2.3 \pm 0.8	0.011*
IL-1β CLS	4.4 \pm 3.4	7.2 \pm 4.0	0.002*
IL-1β SILI	2.6 \pm 1.4	3.0 \pm 1.1	0.197
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.2	3.0 \pm 1.3	0.633
IL-6 IS	1.9 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8	0.879
IL-6 CLS	5.7 \pm 3.8	6.3 \pm 4.2	0.552
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.7 \pm 1.1	0.765
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.8	3.0 \pm 1.1	0.276
TGF-β IS	2.1 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8	0.197
TGF-β CLS	7.3 \pm 3.7	6.2 \pm 3.7	0.212
TGF-β SILI	2.7 \pm 0.9	3.0 \pm 0.9	0.132
Foxp3 LI	7.4 \pm 4.0	4.9 \pm 3.5	0.006*

表 8-1

淋巴結轉移(N)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	N0 (n= 46) (Mean \pm SD)	N1 (n= 8)	N2 (n= 17)	p-Value
IL-1β CLI	2.4 \pm 1.1	2.1 \pm 1.6	3.1 \pm 1.1	0.069
IL-1β IS	1.9 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8	2.1 \pm 0.8	0.524
IL-1β CLS	5.2 \pm 3.8	4.5 \pm 4.2	7.2 \pm 3.9	0.130
IL-1β SILI	2.8 \pm 1.3	2.3 \pm 1.5	3.0 \pm 1.0	0.387
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.3	2.6 \pm 1.2	3.3 \pm 1.1	0.255
IL-6 IS	1.8 \pm 0.8	2.0 \pm 0.5	2.1 \pm 0.7	0.413
IL-6 CLS	5.7 \pm 4.1	5.3 \pm 2.4	7.1 \pm 3.9	0.334
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.1 \pm 1.1	2.9 \pm 1.1	0.268
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.9	3.1 \pm 1.0	2.9 \pm 1.0	0.426
TGF-β IS	2.0 \pm 0.8	2.5 \pm 0.5	1.7 \pm 0.9	0.086
TGF-β CLS	7.0 \pm 3.6	8.0 \pm 3.3	5.7 \pm 3.9	0.264
TGF-β SILI	3.0 \pm 0.8	2.6 \pm 1.3	2.8 \pm 1.0	0.742
Foxp3 LI	6.2 \pm 4.1	7.8 \pm 3.7	5.8 \pm 3.9	0.355

表 8-2

淋巴結轉移(N)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	N0 (n= 46) (Mean \pm SD)	N1 + N2 (n= 25)	p-Value
IL-1 β CLI	2.4 \pm 1.1	2.8 \pm 1.3	0.205
IL-1 β IS	1.9 \pm 0.8	2.1 \pm 0.9	0.449
IL-1 β CLS	5.2 \pm 3.8	6.4 \pm 4.1	0.328
IL-1 β SILI	2.8 \pm 1.3	2.8 \pm 1.2	0.965
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.3	3.1 \pm 1.2	0.418
IL-6 IS	1.8 \pm 0.8	2.0 \pm 0.7	0.185
IL-6 CLS	5.7 \pm 4.1	6.6 \pm 3.5	0.276
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.6 \pm 1.1	0.955
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.9	3.0 \pm 1.0	0.229
TGF-β IS	2.0 \pm 0.8	2.0 \pm 0.9	0.764
TGF-β CLS	7.0 \pm 3.6	6.4 \pm 3.8	0.514
TGF-β SILI	3.0 \pm 0.8	3.0 \pm 0.9	0.471
Foxp3 LI	6.2 \pm 4.1	6.8 \pm 3.9	0.716

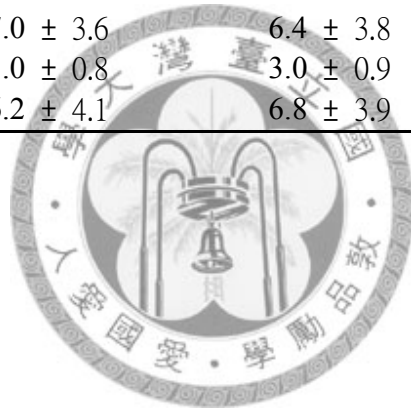


表 9

腫瘤分期期數(Stage)與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	S1 + S2 (n= 27) (Mean \pm SD)	S3 + S4 (n= 44)	p-Value
IL-1β CLI	2.2 \pm 1.1	2.8 \pm 1.2	0.056
IL-1β IS	1.8 \pm 0.8	2.1 \pm 0.9	0.130
IL-1β CLS	4.3 \pm 3.2	6.4 \pm 4.1	0.030*
IL-1β SILI	2.8 \pm 1.4	2.8 \pm 1.2	0.987
IL-6 CLI	2.7 \pm 1.2	3.0 \pm 1.2	0.331
IL-6 IS	1.8 \pm 0.8	1.9 \pm 0.7	0.349
IL-6 CLS	5.4 \pm 4.0	6.3 \pm 3.9	0.316
IL-6 SILI	2.7 \pm 1.0	2.6 \pm 1.1	0.514
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.8	3.1 \pm 1.0	0.368
TGF-β IS	2.0 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.855
TGF-β CLS	7.1 \pm 3.7	6.7 \pm 3.7	0.649
TGF-β SILI	2.8 \pm 0.9	3.0 \pm 1.0	0.507
Foxp3 LI	7.6 \pm 4.2	5.5 \pm 3.7	0.028*

表 10

腫瘤細胞分化程度與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Well differentiation (n= 57) (Mean \pm SD)	Moderate differentiation (n= 14)	p-Value
IL-1β CLI	2.6 \pm 1.2	2.4 \pm 1.2	0.622
IL-1β IS	1.9 \pm 0.8	2.2 \pm 0.9	0.236
IL-1β CLS	5.6 \pm 4.0	5.9 \pm 3.9	0.798
IL-1β SILI	2.8 \pm 1.3	2.6 \pm 1.3	0.496
IL-6 CLI	3.0 \pm 1.2	2.6 \pm 1.3	0.269
IL-6 IS	1.9 \pm 0.8	1.8 \pm 0.7	0.610
IL-6 CLS	6.2 \pm 4.0	4.9 \pm 3.4	0.300
IL-6 SILI	2.7 \pm 1.1	2.6 \pm 0.9	0.776
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.9	2.5 \pm 0.9	0.001*
TGF-β IS	2.0 \pm 0.8	1.9 \pm 0.9	0.399
TGF-β CLS	7.3 \pm 3.7	5.0 \pm 3.2	0.065
TGF-β SILI	2.9 \pm 0.9	2.7 \pm 0.8	0.421
Foxp3 LI	6.4 \pm 4.0	6.1 \pm 4.1	0.928

表 11

淋巴管或血管侵犯與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without LVP (n= 53) (Mean \pm SD)	With LVP (n= 18)	p-Value
IL-1 β CLI	2.5 \pm 1.2	2.9 \pm 1.0	0.190
IL-1 β IS	2.0 \pm 0.8	1.8 \pm 0.9	0.390
IL-1 β CLS	5.6 \pm 4.1	5.7 \pm 3.7	0.810
IL-1 β SILI	2.7 \pm 1.4	3.0 \pm 0.9	0.498
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.2	3.1 \pm 1.3	0.536
IL-6 IS	1.9 \pm 0.8	1.9 \pm 0.8	0.977
IL-6 CLS	5.8 \pm 3.8	6.4 \pm 4.3	0.692
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.7 \pm 1.0	0.924
TGF- β CLI	3.2 \pm 0.9	3.0 \pm 1.0	0.353
TGF- β IS	2.0 \pm 0.8	1.9 \pm 0.9	0.785
TGF- β CLS	6.9 \pm 3.6	6.5 \pm 3.9	0.703
TGF- β SILI	3.0 \pm 0.9	2.6 \pm 1.0	0.196
Foxp3 LI	6.0 \pm 3.9	7.3 \pm 4.1	0.153

LVP= lymphovascular permeation

表 12

轉移淋巴結之膜外擴散與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without ECS (n= 59) (Mean \pm SD)	With ECS (n= 12)	p-Value
IL-1 β CLI	2.5 \pm 1.2	2.8 \pm 1.1	0.563
IL-1 β IS	1.9 \pm 0.8	2.3 \pm 0.9	0.214
IL-1 β CLS	5.4 \pm 3.9	6.8 \pm 4.2	0.261
IL-1 β SILI	2.8 \pm 1.3	2.8 \pm 1.1	0.766
IL-6 CLI	2.8 \pm 1.2	3.3 \pm 1.2	0.129
IL-6 IS	1.8 \pm 0.7	2.2 \pm 0.8	0.179
IL-6 CLS	5.6 \pm 3.8	7.8 \pm 4.4	0.096
IL-6 SILI	2.6 \pm 1.1	2.9 \pm 1.1	0.325
TGF- β CLI	3.2 \pm 0.9	3.0 \pm 1.2	0.709
TGF- β IS	2.1 \pm 0.8	1.8 \pm 1.0	0.290
TGF- β CLS	7.0 \pm 3.6	6.2 \pm 4.3	0.451
TGF- β SILI	3.0 \pm 0.9	2.7 \pm 1.1	0.561
Foxp3 LI	6.2 \pm 3.9	6.8 \pm 4.5	0.695

ECS= extracapsular spreading

表 13

腫瘤復發與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without recurrence (n= 52) (Mean \pm SD)	With recurrence (n= 19)	p-Value
IL-1β CLI	2.6 \pm 1.2	2.5 \pm 1.2	0.841
IL-1β IS	1.9 \pm 0.9	2.1 \pm 0.7	0.438
IL-1β CLS	5.6 \pm 4.1	5.6 \pm 3.6	0.870
IL-1β SILI	2.8 \pm 1.3	2.6 \pm 1.2	0.381
IL-6 CLI	2.9 \pm 1.2	2.7 \pm 1.3	0.498
IL-6 IS	1.9 \pm 0.8	1.9 \pm 0.7	0.934
IL-6 CLS	6.1 \pm 4.0	5.6 \pm 3.8	0.692
IL-6 SILI	2.7 \pm 1.0	2.4 \pm 1.2	0.347
TGF-β CLI	3.3 \pm 0.9	3.0 \pm 1.1	0.319
TGF-β IS	2.0 \pm 0.8	2.1 \pm 0.8	0.836
TGF-β CLS	7.0 \pm 3.6	6.5 \pm 4.0	0.732
TGF-β SILI	2.9 \pm 1.0	3.0 \pm 0.9	0.723
Foxp3 LI	6.5 \pm 4.1	5.9 \pm 3.6	0.709

表 14

酒精攝取與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without alcohol consumption (n=10) (Mean \pm SD)	With alcohol consumption (n=61)	p-Value
IL-1 β CLI	2.8 \pm 1.0	2.5 \pm 1.2	0.517
IL-1 β IS	2.0 \pm 0.7	2.0 \pm 0.9	0.930
IL-1 β CLS	5.6 \pm 2.7	5.6 \pm 4.1	0.732
IL-1 β SILI	3.0 \pm 0.9	2.7 \pm 1.3	0.729
IL-6 CLI	2.5 \pm 1.2	3.0 \pm 1.2	0.274
IL-6 IS	1.7 \pm 0.7	1.9 \pm 0.8	0.426
IL-6 CLS	4.7 \pm 3.6	6.2 \pm 4.0	0.286
IL-6 SILI	2.0 \pm 1.1	2.7 \pm 1.0	0.047*
TGF- β CLI	3.1 \pm 0.7	3.2 \pm 1.0	0.503
TGF- β IS	2.3 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.233
TGF- β CLS	7.3 \pm 3.2	6.7 \pm 3.8	0.482
TGF- β SILI	3.0 \pm 0.9	2.9 \pm 0.9	0.728
Foxp3 LI	7.1 \pm 2.6	6.2 \pm 4.2	0.176

表 15

嚼食檳榔與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without betel quid	With betel quid	p-Value
	chewing (n=7) (Mean \pm SD)	chewing (n=64)	
IL-1β CLI	2.1 \pm 1.1	2.6 \pm 1.2	0.302
IL-1β IS	1.6 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.172
IL-1β CLS	3.3 \pm 2.3	5.9 \pm 4.0	0.126
IL-1β SILI	2.6 \pm 1.4	2.8 \pm 1.3	0.628
IL-6 CLI	2.7 \pm 1.1	2.9 \pm 1.3	0.575
IL-6 IS	1.4 \pm 0.5	1.9 \pm 0.8	0.099
IL-6 CLS	4.0 \pm 2.4	6.2 \pm 4.0	0.199
IL-6 SILI	2.3 \pm 1.0	2.7 \pm 1.1	0.333
TGF-β CLI	3.1 \pm 0.7	3.2 \pm 1.0	0.646
TGF-β IS	2.3 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.363
TGF-β CLS	7.3 \pm 3.1	6.8 \pm 3.8	0.605
TGF-β SILI	2.6 \pm 1.1	2.9 \pm 0.9	0.372
Foxp3 LI	9.1 \pm 3.2	6.0 \pm 4.0	0.021*

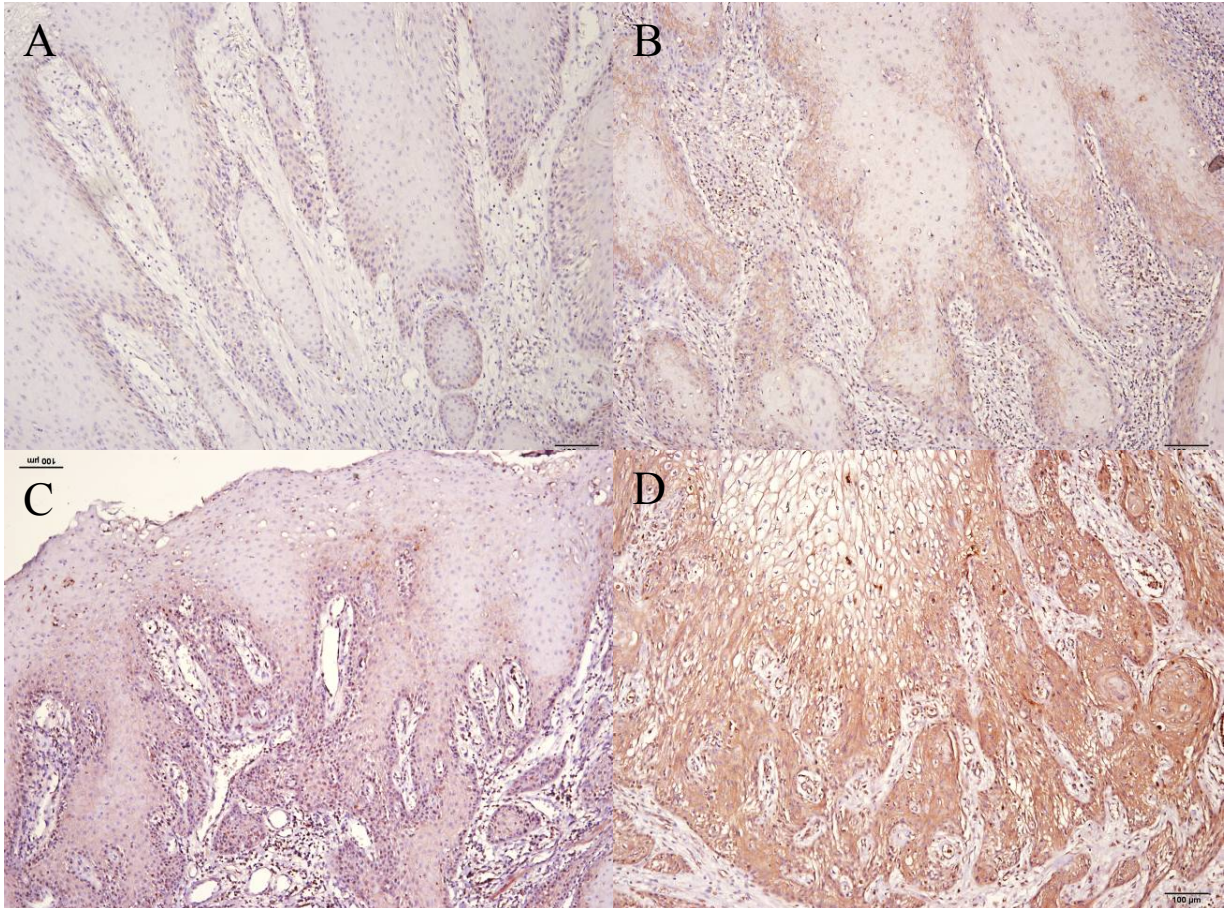
表 16

抽菸與 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 與 Foxp 各項陽性染色標記指數、強度、標記分數之相關性

	Without smoking (n=8) (Mean \pm SD)	With smoke (n=63)	p-Value
IL-1 β CLI	1.8 \pm 1.0	2.7 \pm 1.2	0.037*
IL-1 β IS	1.5 \pm 0.8	2.0 \pm 0.8	0.083
IL-1 β CLS	2.8 \pm 2.4	6.0 \pm 4.0	0.023*
IL-1 β SILI	2.5 \pm 1.5	2.8 \pm 1.3	0.588
IL-6 CLI	2.6 \pm 1.1	2.9 \pm 1.3	0.422
IL-6 IS	1.5 \pm 0.5	1.9 \pm 0.8	0.139
IL-6 CLS	4.3 \pm 2.8	6.2 \pm 4.0	0.244
IL-6 SILI	2.4 \pm 0.9	2.7 \pm 1.1	0.429
TGF- β CLI	2.9 \pm 0.6	3.2 \pm 1.0	0.123
TGF- β IS	2.1 \pm 0.6	2.0 \pm 0.8	0.721
TGF- β CLS	6.1 \pm 2.4	6.9 \pm 3.8	0.713
TGF- β SILI	2.8 \pm 1.0	2.9 \pm 0.9	0.716
Foxp3 LI	8.3 \pm 3.9	6.1 \pm 4.0	0.091

圖 1

IL-1 β 於 OSCC 組織切片中的表現



(A) IL-1 β 表現少於 10% 的腫瘤細胞，且呈現輕度染色，主要表現於腫瘤巢之基底細胞

(B) IL-1 β 表現於 10%-50% 之腫瘤細胞，且呈現中度染色

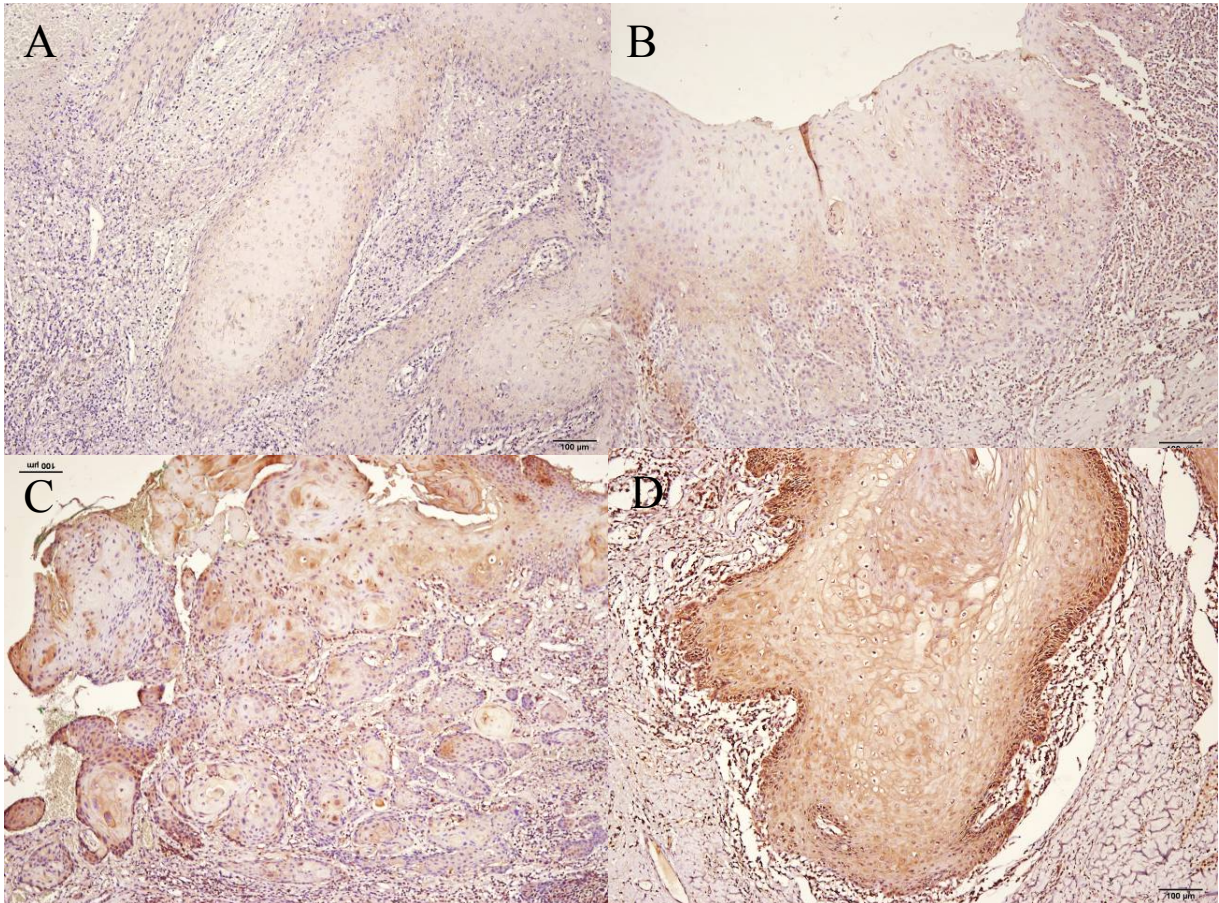
(C) IL-1 β 表現於 50%-80% 之腫瘤細胞，且呈現中度染色

(D) IL-1 β 表現於 80%-100% 之腫瘤細胞，且呈現重度染色

(A、B、C、D original magnification $\times 100$)

圖 2

IL-6 於 OSCC 組織切片中的表現



(A) IL-6 表現少於 10% 的腫瘤細胞，且呈現輕度染色，主要表現於腫瘤巢之基底細胞

(B) IL-6 表現於 10%-50% 之腫瘤細胞，且呈現輕度至中度染色

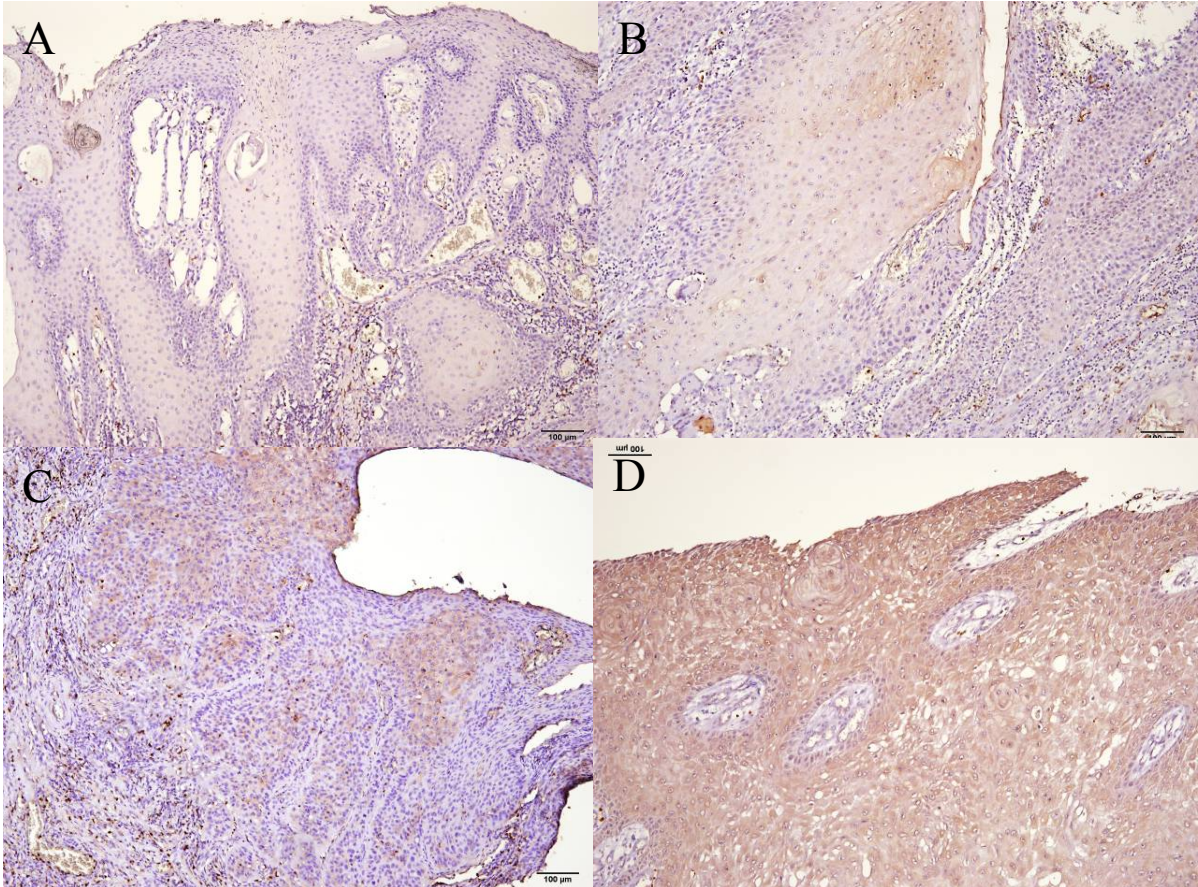
(C) IL-6 表現於 50%-80% 之腫瘤細胞，且呈現中度至重度染色

(D) IL-6 表現於 80%-100% 之腫瘤細胞，且呈現重度染色

(A、B、C、D original magnification $\times 100$)

圖 3

TGF- β 於 OSCC 組織切片中的表現



(A) TGF- β 表現少於 10% 的腫瘤細胞，且呈現輕度染色，主要表現於腫瘤巢之基底上
分化較完整之細胞

(B) TGF- β 表現於 10%-50% 之腫瘤細胞，且呈現輕度至中度染色

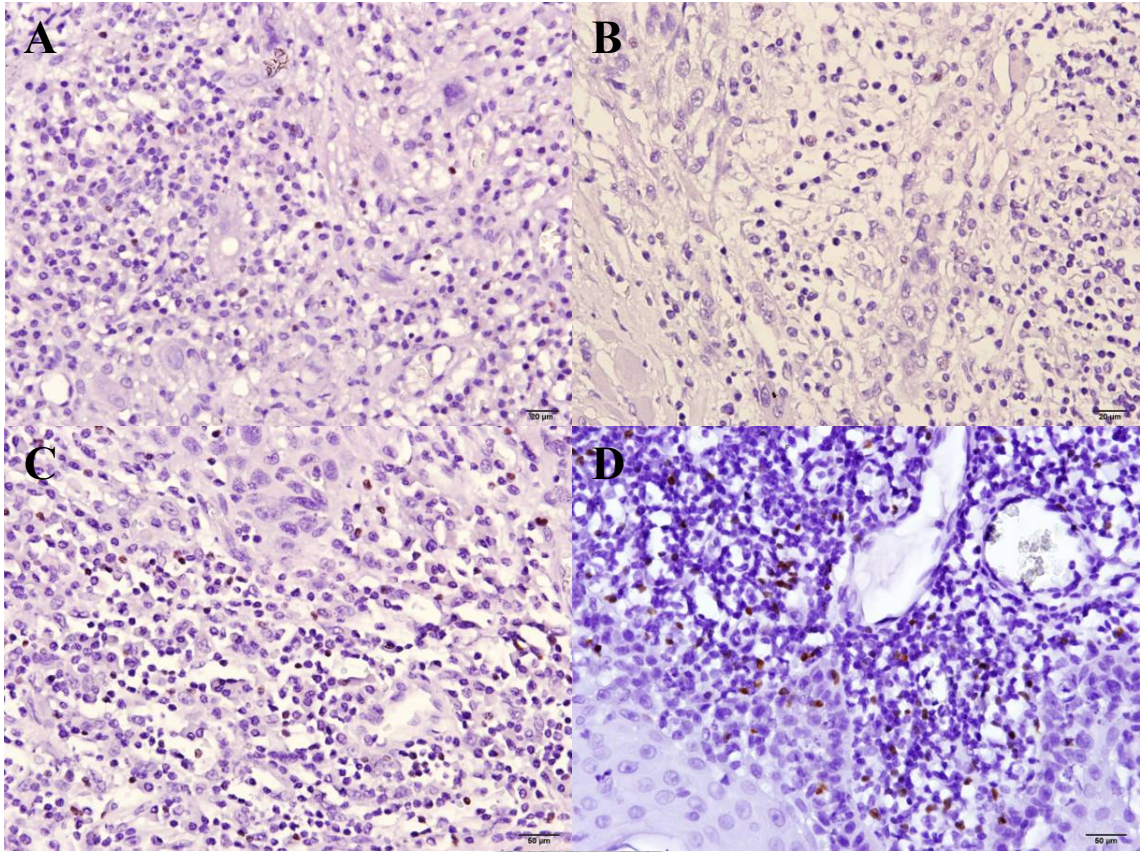
(C) TGF- β 表現於 50%-80% 之腫瘤細胞，且呈現中度至重度染色

(D) TGF- β 表現於 80%-100% 之腫瘤細胞，且呈現重度染色

(A、B、C、D original magnification $\times 100$)

圖 4

Foxp3 於 OSCC 組織切片中的表現



(A) Foxp3 表現於約 2%的腫瘤浸潤淋巴球，且皆分布在靠近腫瘤的部位

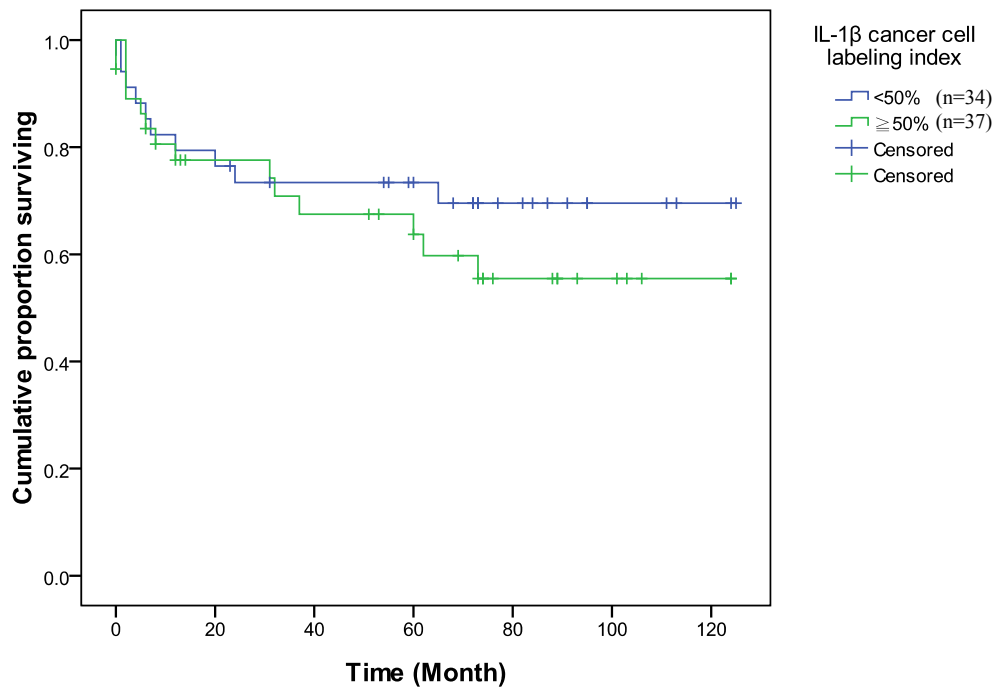
(B) Foxp3 表現於約 5%的腫瘤浸潤淋巴球

(C) Foxp3 表現於約 10%的腫瘤浸潤淋巴球

(D) Foxp3 表現於約 15%的腫瘤浸潤淋巴球

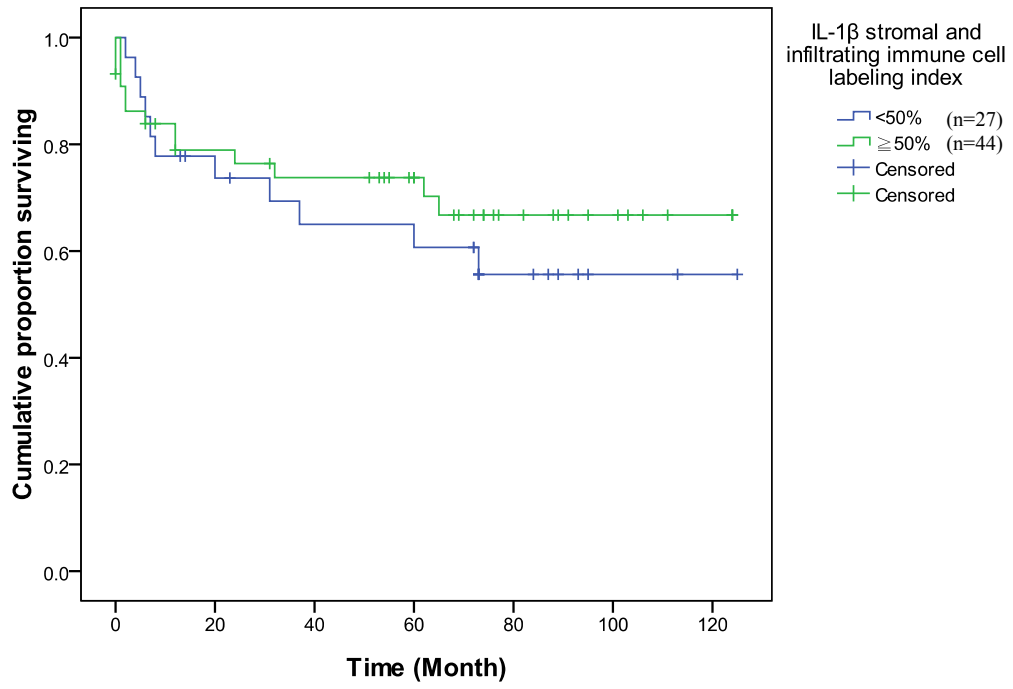
(A、B、C、D original magnification $\times 500$)

圖 5



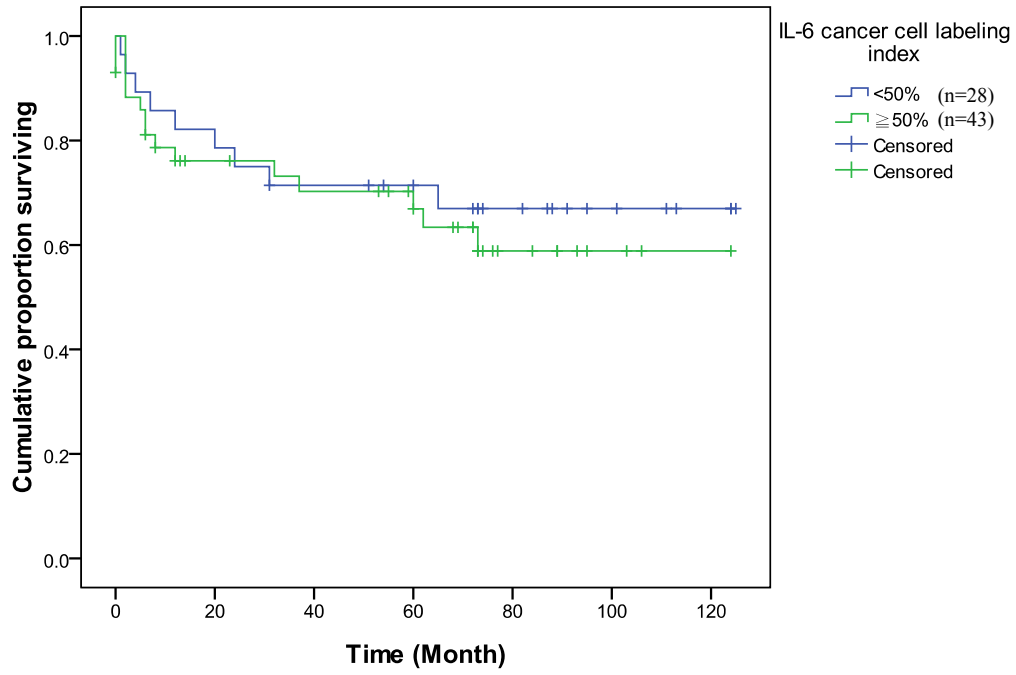
Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-1 β 癌細胞標記指數之關係 (Log-Rank $p=0.392$)。

圖 6



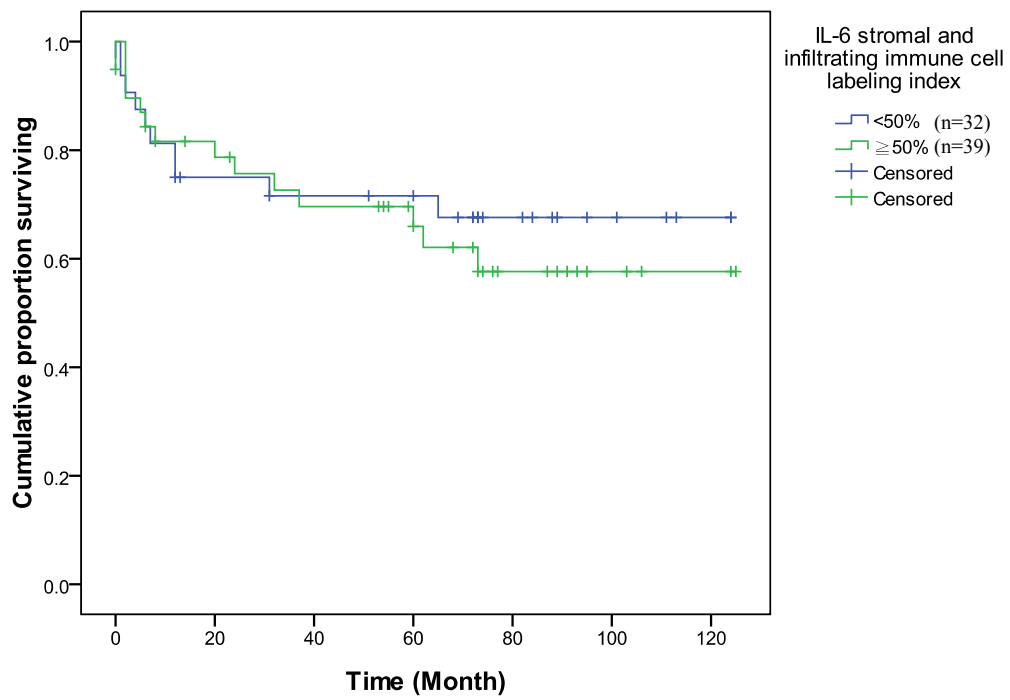
Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-1 β 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係(Log-Rank p=0.493)。

圖 7



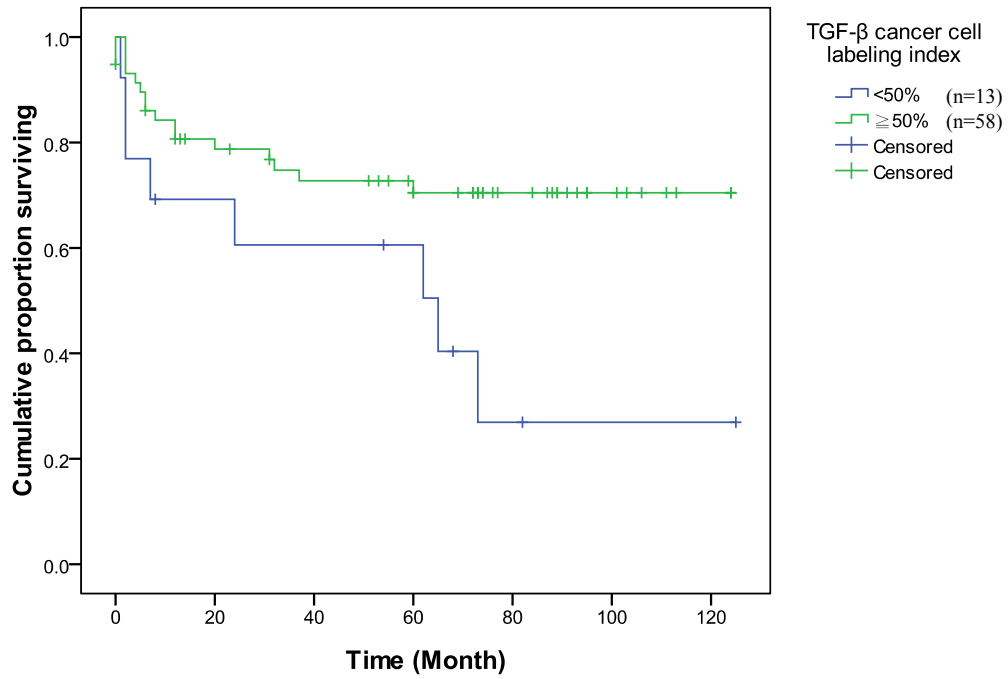
Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-6 癌細胞標記指數之關係 (Log-Rank $p=0.594$)。

圖 8



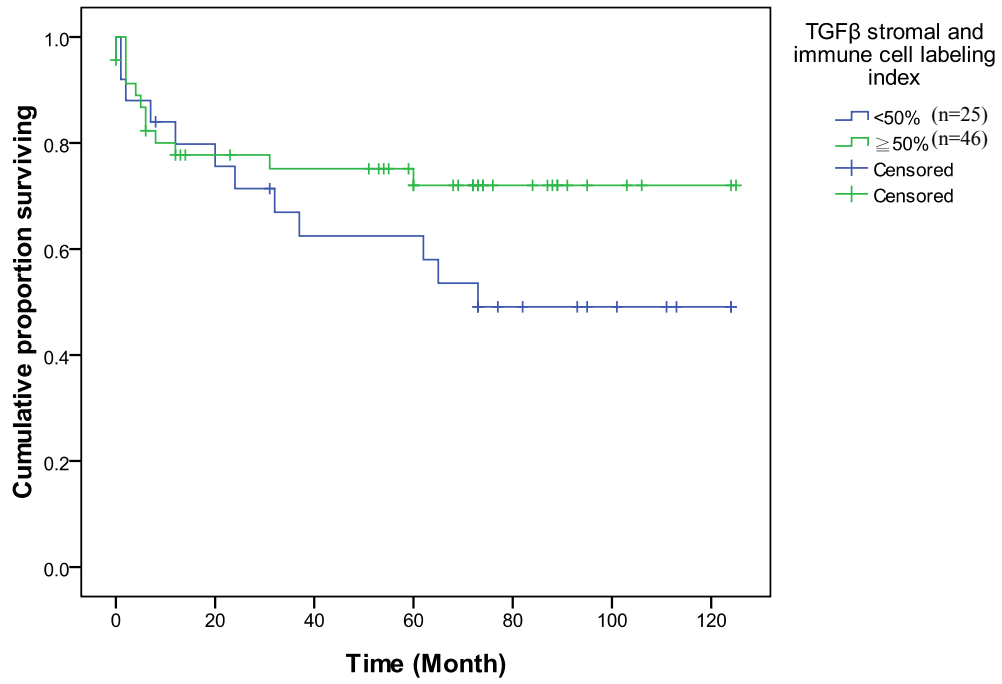
Kaplan-Meier 生存曲線與 IL-6 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係(Log-Rank $p=0.626$)。

圖 9



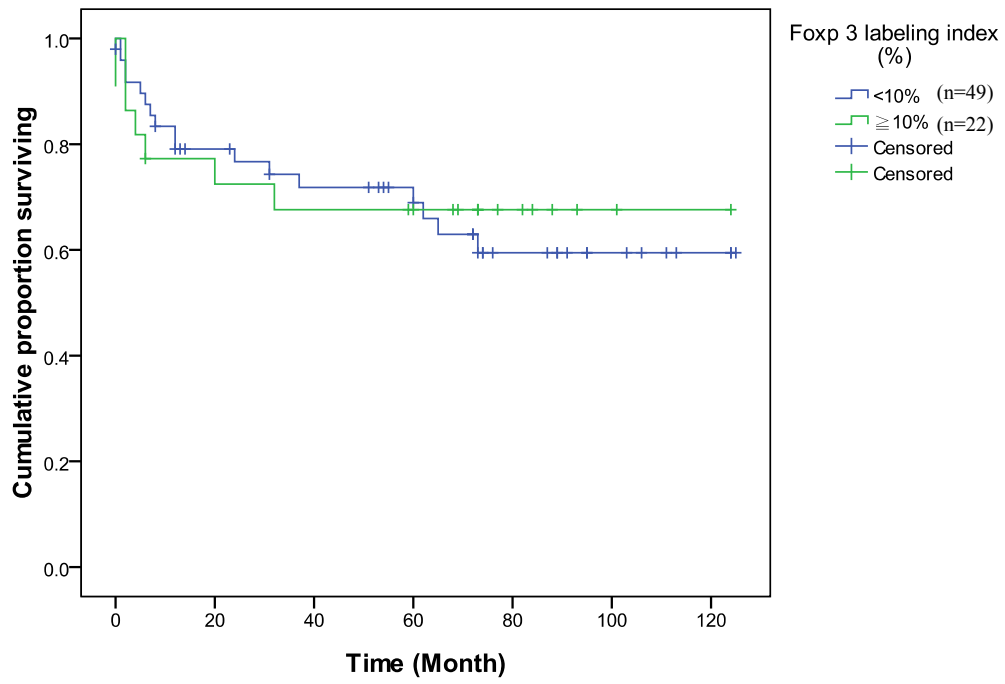
Kaplan-Meier 生存曲線與 TGF- β 癌細胞標記指數之關係，TGF- β 表現量大於 50% 的存活率較高，且有統計上的顯著差異(Log-Rank $p=0.024^*$)。

圖 10



Kaplan-Meier 生存曲線與 TGF- β 基質與浸潤之免疫細胞標記指數之關係(Log-Rank $p=0.166$)。

圖 11



Kaplan-Meier 生存曲線與 Foxp3 之標記指數之關係(Log-Rank $p=0.840$)。

參考文獻

- Abe M, Kondo S, Hirano S, Ambo Y, Tanaka E, Morikawa T, Okushiba S, and Katoh H. 2003. Long-term survival after radical resection of advanced pancreatic cancer: a case report with special reference to CD8+ T-cell infiltration. *Int J Gastrointest Cancer* 33(2-3):107-110.
- Achen MG, McColl BK, and Stacker SA. 2005. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell* 7(2):121-127.
- Achur RN, Freeman WM, and Vrana KE. 2010. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(1):83-91.
- Ahn JM, Huang CC, and Cho HT. 1993. Localization of interleukin-1 in human squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 103(5):529-532.
- Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J, Banham AH, Roncador G, Montalban C, and Piris MA. 2005. Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* 11(4):1467-1473.
- Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Lazzeri E, Manetti R, Vanini V, Romagnani P, Maggi E, and Romagnani S. 2002. Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp Med* 196(3):379-387.
- Apte RN, Dotan S, Elkabets M, White MR, Reich E, Carmi Y, Song X, Dvorkin T, Krelin Y, and Voronov E. 2006a. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev* 25(3):387-408.
- Apte RN, Krelin Y, Song X, Dotan S, Recih E, Elkabets M, Carmi Y, Dvorkin T, White RM, Gayvoronsky L et al. . 2006b. Effects of micro-environment- and malignant cell-derived interleukin-1 in carcinogenesis, tumour invasiveness and tumour-host interactions. *Eur J Cancer* 42(6):751-759.
- Apte RN, and Voronov E. 2002. Interleukin-1--a major pleiotropic cytokine in tumor-host interactions. *Semin Cancer Biol* 12(4):277-290.
- Apte RN, and Voronov E. 2008. Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? *Immunol Rev* 222:222-241.
- Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H, Mosseri V, Laccourreye O, Bruneval P, Fridman WH et al. . 2006. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* 12(2):465-472.
- Balkwill F, Charles KA, and Mantovani A. 2005. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7(3):211-217.
- Beauchemin V, Villeneuve L, Rodriguez-Cimadevilla JC, Rajotte D, Kenney JS, Clark SC, and Hoang T. 1991. Interleukin-6 production by the blast cells of acute myeloblastic leukemia: regulation by endogenous interleukin-1 and biological implications. *J Cell Physiol* 148(3):353-361.
- Becker C, Fantini MC, and Neurath MF. 2006. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(1-2):97-106.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S et al. . 2004. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21(4):491-501.

- Benitez-Bribiesca L, Wong A, Utrera D, and Castellanos E. 2001. The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *J Histochem Cytochem* 49(8):1061-1062.
- Berger FG. 2004. The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality. *Breast Cancer Res Treat* 88(3):281-285.
- Bergers G, and Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3(6):401-410.
- Bian Y, Terse A, Du J, Hall B, Molinolo A, Zhang P, Chen W, Flanders KC, Gutkind JS, Wakefield LM et al. . 2009. Progressive tumor formation in mice with conditional deletion of TGF-beta signaling in head and neck epithelia is associated with activation of the PI3K/Akt pathway. *Cancer Res* 69(14):5918-5926.
- Bissell MJ, and Radisky D. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 1(1):46-54.
- Boccia S, Hashibe M, Galli P, De Feo E, Asakage T, Hashimoto T, Hiraki A, Katoh T, Nomura T, Yokoyama A et al. . 2009. Aldehyde dehydrogenase 2 and head and neck cancer: a meta-analysis implementing a Mendelian randomization approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(1):248-254.
- Boffetta P. 2008. Tobacco smoking and risk of bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl*(218):45-54.
- Bommert K, Bargou RC, and Stuhmer T. 2006. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer* 42(11):1574-1580.
- Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, and Baral R. 2008. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun* 8:10.
- Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, Zamboni P, Restifo NP, and Zanovello P. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood* 96(12):3838-3846.
- Brunnemann KD, Prokopczyk B, Djordjevic MV, and Hoffmann D. 1996. Formation and analysis of tobacco-specific N-nitrosamines. *Crit Rev Toxicol* 26(2):121-137.
- Carpenter JM, Syms MJ, and Sniezek JC. 2005. Oral carcinoma associated with betel nut chewing in the Pacific: an impending crisis? *Pac Health Dialog* 12(1):158-162.
- Cesana GC, DeRaffele G, Cohen S, Moroziewicz D, Mitcham J, Stoutenburg J, Cheung K, Hesdorffer C, Kim-Schulze S, and Kaufman HL. 2006. Characterization of CD4+CD25+ regulatory T cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 24(7):1169-1177.
- Chang MC, Chiang CP, Lin CL, Lee JJ, Hahn LJ, and Jeng JH. 2005. Cell-mediated immunity and head and neck cancer: with special emphasis on betel quid chewing habit. *Oral Oncol* 41(8):757-775.
- Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, and Anderson KC. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87(3):1104-1112.
- Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, and Khazaie K. 2005a. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through

- TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(2):419-424.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, and Wahl SM. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198(12):1875-1886.
- Chen W, Perruche S, and Li J. 2007. CD4+CD25+ T regulatory cells and TGF-beta in mucosal immune system: the good and the bad. *Curr Med Chem* 14(21):2245-2249.
- Chen W, and Wahl SM. 2003. TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2):85-89.
- Chen YJ, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Yen TC, Chiu CC, Lu YC, Li HF, and Cheng AJ. 2008. Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis. *Cancer Sci* 99(8):1507-1514.
- Chen YK, Huang HC, Lin LM, and Lin CC. 1999. Primary oral squamous cell carcinoma: an analysis of 703 cases in southern Taiwan. *Oral Oncol* 35(2):173-179.
- Chen YQ, Shi HZ, Qin XJ, Mo WN, Liang XD, Huang ZX, Yang HB, and Wu C. 2005b. CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med* 172(11):1434-1439.
- Cheng YA, and Tsai CC. 1999. Nicotine- and arecoline-induced interleukin-1 secretion and intercellular adhesion molecular-1 expression in human oral epidermoid carcinoma cells in vitro. *Arch Oral Biol* 44(10):843-851.
- Cheong SC, Chandramouli GV, Saleh A, Zain RB, Lau SH, Sivakumaren S, Pathmanathan R, Prime SS, Teo SH, Patel V et al. . 2009. Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure. *Oral Oncol* 45(8):712-719.
- Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, Ohuchi A, Ohuchi K, Shiiba K, Kurokawa Y et al. . 2004. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer* 91(9):1711-1717.
- Chikamatsu K, Sakakura K, Whiteside TL, and Furuya N. 2007. Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 29(2):120-127.
- Chung YJ, Song JM, Lee JY, Jung YT, Seo EJ, Choi SW, and Rhyu MG. 1996. Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Res* 56(20):4662-4665.
- Correale P, Rotundo MS, Del Vecchio MT, Remondo C, Migali C, Ginanneschi C, Tsang KY, Licchetta A, Mannucci S, Loiacono L et al. . 2010. Regulatory (FoxP3+) T-cell tumor infiltration is a favorable prognostic factor in advanced colon cancer patients undergoing chemo or chemoimmunotherapy. *J Immunother* 33(4):435-441.
- Cotterchio M, Kreiger N, Sloan M, and Steingart A. 2001. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(11):1213-1217.
- Coussens LM, and Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420(6917):860-867.
- Cozen W, Gill PS, Ingles SA, Masood R, Martinez-Maza O, Cockburn MG, Gauderman WJ, Pike MC, Bernstein L, Nathwani BN et al. . 2004. IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood* 103(8):3216-3221.

- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M et al. . 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10(9):942-949.
- Curotto de Lafaille MA, and Lafaille JJ. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 30(5):626-635.
- Derynck R, Akhurst RJ, and Balmain A. 2001. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet* 29(2):117-129.
- Desai PB. 1983. Clinical cancer research in India--present status and future prospects. *Indian J Med Res* 78 Suppl:8-28.
- Diederichsen AC, Hjelmberg JB, Christensen PB, Zeuthen J, and Fenger C. 2003. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 52(7):423-428.
- Dikshit RP, Ramadas K, Hashibe M, Thomas G, Somanathan T, and Sankaranarayanan R. 2006. Association between diabetes mellitus and pre-malignant oral diseases: a cross sectional study in Kerala, India. *Int J Cancer* 118(2):453-457.
- Dinarello CA. 2002. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* 20(5 Suppl 27):S1-13.
- Distel LV, Fickenscher R, Dietel K, Hung A, Iro H, Zenk J, Nkenke E, Buttner M, Niedobitek G, and Grabenbauer GG. 2009. Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. *Oral Oncol* 45(10):e167-174.
- Duncan LM, Richards LA, and Mihm MC, Jr. 1998. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol* 25(1):11-15.
- Dunn E, Sims JE, Nicklin MJ, and O'Neill LA. 2001. Annotating genes with potential roles in the immune system: six new members of the IL-1 family. *Trends Immunol* 22(10):533-536.
- Egeblad M, and Werb Z. 2002. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2(3):161-174.
- Fattorossi A, Battaglia A, Ferrandina G, Buzzonetti A, Legge F, Salutari V, and Scambia G. 2004. Lymphocyte composition of tumor draining lymph nodes from cervical and endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 92(1):106-115.
- Ferlay J PP, Parkin DM. 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base (2002 estimates) Lyon: IARC Press; 2004.
- Funada Y, Noguchi T, Kikuchi R, Takeno S, Uchida Y, and Gabbert HE. 2003. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep* 10(2):309-313.
- Gallo O, Gori AM, Attanasio M, Martini F, Giusti B, Boddi M, Gallina E, Fini O, and Abbate R. 1993. Interleukin-1 beta and interleukin-6 release by peripheral blood monocytes in head and neck cancer. *Br J Cancer* 68(3):465-468.
- Garcia-Rodriguez LA, and Huerta-Alvarez C. 2001. Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Epidemiology* 12(1):88-93.
- Gasparoto TH, de Souza Malaspina TS, Benevides L, de Melo EJ, Jr., Costa MR, Damante JH, Ikoma MR, Garlet GP, Cavassani KA, da Silva JS et al. . 2010. Patients with

- oral squamous cell carcinoma are characterized by increased frequency of suppressive regulatory T cells in the blood and tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother* 59(6):819-828.
- Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E et al. . 2005a. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202(8):1075-1085.
- Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, and Zitvogel L. 2005b. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* 202(7):919-929.
- Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, and Karin M. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 118(3):285-296.
- Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, and Ley TJ. 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21(4):589-601.
- Guh JY, Chen HC, Tsai JF, and Chuang LY. 2007. Betel-quid use is associated with heart disease in women. *Am J Clin Nutr* 85(5):1229-1235.
- Hanahan D, and Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E et al. . 2009. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(2):541-550.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, and McDonald DM. 2000. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 156(4):1363-1380.
- Haura EB, Turkson J, and Jove R. 2005. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2(6):315-324.
- Heldin CH, Rubin K, Pietras K, and Ostman A. 2004. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4(10):806-813.
- Hirota SK, Braga FP, Penha SS, Sugaya NN, and Migliari DA. 2008. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 13(4):E227-231.
- Hoffmann D, and Hoffmann I. 1997. The changing cigarette, 1950-1995. *J Toxicol Environ Health* 50(4):307-364.
- Houot R, Perrot I, Garcia E, Durand I, and Lebecque S. 2006. Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J Immunol* 176(9):5293-5298.
- Ichimiya Y, Fuwa N, Kamata M, Kodaira T, Furutani K, Tachibana H, Tomita N, and Hidano S. 2005. Treatment results of stage I oral tongue cancer with definitive radiotherapy. *Oral Oncol* 41(5):520-525.
- Imada A, Shijubo N, Kojima H, and Abe S. 2000. Mast cells correlate with angiogenesis and poor outcome in stage I lung adenocarcinoma. *Eur Respir J* 15(6):1087-1093.

- Ishihara K, and Hirano T. 2002. IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(4-5):357-368.
- Ito M, Minamiya Y, Kawai H, Saito S, Saito H, Nakagawa T, Imai K, Hirokawa M, and Ogawa J. 2006. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 176(9):5637-5643.
- Ivanov, II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelley A, Lafaille JJ, Cua DJ, and Littman DR. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* 126(6):1121-1133.
- Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, Hiraga S, Taki T, Tomita N, Ohue M, and Hayakawa T. 1997. Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas. *Cancer Lett* 112(2):251-256.
- Jacob BJ, Straif K, Thomas G, Ramadas K, Mathew B, Zhang ZF, Sankaranarayanan R, and Hashibe M. 2004. Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. *Oral Oncol* 40(7):697-704.
- Jakowlew SB. 2006. Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25(3):435-457.
- Jego G, Bataille R, Geffroy-Luseau A, Descamps G, and Pellat-Deceunynck C. 2006. Pathogen-associated molecular patterns are growth and survival factors for human myeloma cells through Toll-like receptors. *Leukemia* 20(6):1130-1137.
- Jenkins BJ, Grail D, Nheu T, Najdovska M, Wang B, Waring P, Inglese M, McLoughlin RM, Jones SA, Topley N et al. . 2005. Hyperactivation of Stat3 in gp130 mutant mice promotes gastric hyperproliferation and desensitizes TGF-beta signaling. *Nat Med* 11(8):845-852.
- Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, and Neckers L. 2003. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J* 17(14):2115-2117.
- Kawaida H, Kono K, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, Omata H, Ooi A, and Fujii H. 2005. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. *J Surg Res* 124(1):151-157.
- Khazaie K, and von Boehmer H. 2006. The impact of CD4+CD25+ Treg on tumor specific CD8+ T cell cytotoxicity and cancer. *Semin Cancer Biol* 16(2):124-136.
- Kiaris H, Chatzistamou I, Kalofoutis C, Koutselini H, Piperi C, and Kalofoutis A. 2004. Tumour-stroma interactions in carcinogenesis: basic aspects and perspectives. *Mol Cell Biochem* 261(1-2):117-122.
- Kim SJ, Im YH, Markowitz SD, and Bang YJ. 2000. Molecular mechanisms of inactivation of TGF-beta receptors during carcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 11(1-2):159-168.
- Knutson KL, Disis ML, and Salazar LG. 2007. CD4 regulatory T cells in human cancer pathogenesis. *Cancer Immunol Immunother* 56(3):271-285.
- Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, and Tsai CC. 1995. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 24(10):450-453.
- Koenders MI, Lubberts E, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Helsen MM, Kolls JK, Joosten LA, and van den Berg WB. 2005. Induction of cartilage damage by

- overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1. *Arthritis Rheum* 52(3):975-983.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, and Kuchroo VK. 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152):484-487.
- Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH et al. . 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114(6):1141-1149.
- Kryczek I, Wei S, Zou L, Altuwajiri S, Szeliga W, Kolls J, Chang A, and Zou W. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J Immunol* 178(11):6730-6733.
- Kubo T, Hatton RD, Oliver J, Liu X, Elson CO, and Weaver CT. 2004. Regulatory T cell suppression and anergy are differentially regulated by proinflammatory cytokines produced by TLR-activated dendritic cells. *J Immunol* 173(12):7249-7258.
- Kusmartsev S, and Gibrilovich DI. 2002. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. *Cancer Immunol Immunother* 51(6):293-298.
- Laso FJ, Vaquero JM, Almeida J, Marcos M, and Orfao A. 2007. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytometry B Clin Cytom* 72(5):408-415.
- Lathers DM, Achille NJ, and Young MR. 2003. Incomplete Th2 skewing of cytokines in plasma of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Hum Immunol* 64(12):1160-1166.
- Lee KW, Kuo WR, Tsai SM, Wu DC, Wang WM, Fang FM, Chiang FY, Ho KY, Wang LF, Tai CF et al. . 2005. Different impact from betel quid, alcohol and cigarette: risk factors for pharyngeal and laryngeal cancer. *Int J Cancer* 117(5):831-836.
- Leong PP, Mohammad R, Ibrahim N, Ithnin H, Abdullah M, Davis WC, and Seow HF. 2006. Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Immunol Lett* 102(2):229-236.
- Lewis AM, Varghese S, Xu H, and Alexander HR. 2006. Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *J Transl Med* 4:48.
- Li H, Nookala S, and Re F. 2007. Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1beta and IL-18 release. *J Immunol* 178(8):5271-5276.
- Li X, Ye DF, Xie X, Chen HZ, and Lu WG. 2005. Proportion of CD4+CD25+ regulatory T cell is increased in the patients with ovarian carcinoma. *Cancer Invest* 23(5):399-403.
- Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Chen IH, Huang SF, Cheng AJ et al. . 2008. Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. *Ann Surg Oncol* 15(3):915-922.
- Liao CT, Kang CJ, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Cheng AJ, Chen IH et al. . 2007. Survival of second and multiple primary tumors in patients with oral cavity squamous cell carcinoma in the betel quid chewing area. *Oral Oncol* 43(8):811-819.
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA,

- Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS et al. . 2002. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169(5):2756-2761.
- Llewellyn CD, Johnson NW, and Warnakulasuriya KA. 2001. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 37(5):401-418.
- Lu CF, Huang CS, Tjiu JW, and Chiang CP. 2010. Infiltrating macrophage count: a significant predictor for the progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *Head Neck* 32(1):18-25.
- Lu SL, Reh D, Li AG, Woods J, Corless CL, Kulesz-Martin M, and Wang XJ. 2004. Overexpression of transforming growth factor beta1 in head and neck epithelia results in inflammation, angiogenesis, and epithelial hyperproliferation. *Cancer Res* 64(13):4405-4410.
- Ma HL, Napierata L, Stedman N, Benoit S, Collins M, Nickerson-Nutter C, and Young DA. 2010. Tumor necrosis factor alpha blockade exacerbates murine psoriasis-like disease by enhancing Th17 function and decreasing expansion of Treg cells. *Arthritis Rheum* 62(2):430-440.
- Maggi E, Cosmi L, Liotta F, Romagnani P, Romagnani S, and Annunziato F. 2005. Thymic regulatory T cells. *Autoimmun Rev* 4(8):579-586.
- Makitie AA, Koivunen P, Keski-Santti H, Tornwall J, Pukkila M, Laranne J, Luukka M, Vuola J, Joensuu T, Kajanti M et al. . 2007. Oral tongue carcinoma and its treatment in Finland. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264(3):263-267.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, and Sica A. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol* 23(11):549-555.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B et al. . 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268(5215):1336-1338.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, and Locati M. 2008. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 13:453-461.
- Matsuura K, Yamaguchi Y, Ueno H, Osaki A, Arihiro K, and Toge T. 2006. Maturation of dendritic cells and T-cell responses in sentinel lymph nodes from patients with breast carcinoma. *Cancer* 106(6):1227-1236.
- McArthur JG, and Raulet DH. 1993. CD28-induced costimulation of T helper type 2 cells mediated by induction of responsiveness to interleukin 4. *J Exp Med* 178(5):1645-1653.
- McDonald DM, and Baluk P. 2002. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res* 62(18):5381-5385.
- Merchant A, Husain SS, Hosain M, Fikree FF, Pitiphat W, Siddiqui AR, Hayder SJ, Haider SM, Ikram M, Chuang SK et al. . 2000. Paan without tobacco: an independent risk factor for oral cancer. *Int J Cancer* 86(1):128-131.
- Miescher S, Whiteside TL, Moretta L, and von Fliedner V. 1987. Clonal and frequency analyses of tumor-infiltrating T lymphocytes from human solid tumors. *J Immunol* 138(11):4004-4011.
- Miller LJ, Kurtzman SH, Anderson K, Wang Y, Stankus M, Renna M, Lindquist R,

- Barrows G, and Kreutzer DL. 2000. Interleukin-1 family expression in human breast cancer: interleukin-1 receptor antagonist. *Cancer Invest* 18(4):293-302.
- Moore S, Johnson N, Pierce A, and Wilson D. 1999. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis* 5(3):185-195.
- Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, and Wilson DF. 2000a. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 6(2):65-74.
- Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, and Wilson DF. 2000b. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis* 6(2):75-84.
- Moutsopoulos NM, Wen J, and Wahl SM. 2008. TGF-beta and tumors--an ill-fated alliance. *Curr Opin Immunol* 20(2):234-240.
- Mueller MM, and Fusenig NE. 2004. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 4(11):839-849.
- Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, and Sankaranarayanan R. 2008. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol* 44(5):446-454.
- Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y, Hida Y, Oshikiri T, Suzuoki M, Hiraoka K, Itoh T, Kondo S, and Katoh H. 2003. Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer* 89(9):1736-1742.
- Nakamura K, Kitani A, Fuss I, Pedersen A, Harada N, Nawata H, and Strober W. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol* 172(2):834-842.
- Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, Sonoda KH, Saijo Y, Nukiwa T, Strieter RM et al. . 2005. Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 115(11):2979-2991.
- Ness RB, and Cottreau C. 1999. Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* 91(17):1459-1467.
- Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK et al. . 2005. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 175(9):6177-6189.
- O'Shea JJ, Gadina M, and Schreiber RD. 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl:S121-131.
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, and Rodriguez PC. 2007. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13(2 Pt 2):721s-726s.
- Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, and Toge T. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 14(5):1269-1273.
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, and Korangy F. 2005. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 65(6):2457-2464.
- Osborne J, Moore PS, and Chang Y. 1999. KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Hum Immunol* 60(10):921-927.
- Oshikiri T, Miyamoto M, Shichinohe T, Suzuoki M, Hiraoka K, Nakakubo Y, Shinohara T,

- Itoh T, Kondo S, and Katoh H. 2003. Prognostic value of intratumoral CD8+ T lymphocyte in extrahepatic bile duct carcinoma as essential immune response. *J Surg Oncol* 84(4):224-228.
- Park S, Bae J, Nam BH, and Yoo KY. 2008. Aetiology of cancer in Asia. *Asian Pac J Cancer Prev* 9(3):371-380.
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, and Vogelstein B. 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res* 55(23):5548-5550.
- Pelucchi C, Gallus S, Garavello W, Bosetti C, and La Vecchia C. 2008. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev* 17(4):340-344.
- Petti S. 2009. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol* 45(4-5):340-350.
- Pizarro TT, and Cominelli F. 2007. Cloning IL-1 and the birth of a new era in cytokine biology. *J Immunol* 178(9):5411-5412.
- Reichart PA, and Nguyen XH. 2008. Betel quid chewing, oral cancer and other oral mucosal diseases in Vietnam: a review. *J Oral Pathol Med* 37(9):511-514.
- Reichert TE, Strauss L, Wagner EM, Gooding W, and Whiteside TL. 2002. Signaling abnormalities, apoptosis, and reduced proliferation of circulating and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with oral carcinoma. *Clin Cancer Res* 8(10):3137-3145.
- Rhodus NL, Ho V, Miller CS, Myers S, and Ondrey F. 2005. NF-kappaB dependent cytokine levels in saliva of patients with oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* 29(1):42-45.
- Rosenberg SA, Yang JC, and Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9):909-915.
- Sakaguchi S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6(4):345-352.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, and Toda M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3):1151-1164.
- Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, and Whiteside TL. 2005. Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 92(5):913-920.
- Schwarz S, Butz M, Morsczech C, Reichert TE, and Driemel O. 2008. Increased number of CD25 FoxP3 regulatory T cells in oral squamous cell carcinomas detected by chromogenic immunohistochemical double staining. *J Oral Pathol Med* 37(8):485-489.
- Scully C. 2002. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncol* 38(3):227-234.
- Scully C. 2005. Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J* 199(4):203-207.
- Scully C, Field JK, and Tanzawa H. 2000a. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 36(4):311-327.
- Scully C, Field JK, and Tanzawa H. 2000b. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. *Oral Oncol*

- 36(5):404-413.
- Scully C, Field JK, and Tanzawa H. 2000c. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 36(3):256-263.
- Seitz HK, and Cho CH. 2009. Contribution of alcohol and tobacco use in gastrointestinal cancer development. *Methods Mol Biol* 472:217-241.
- Seoane J. 2009. TGFbeta and cancer initiating cells. *Cell Cycle* 8(23):3787-3788.
- Serafini P, Borrello I, and Bronte V. 2006. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol* 16(1):53-65.
- Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, and Bronte V. 2004. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 53(2):64-72.
- Seyedroudbari SA, and Khan MM. 1998. In vitro effects of smokeless tobacco extract on tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-1beta (IL-1beta) production, and on lymphocyte proliferation. *Toxicol* 36(4):631-637.
- Shacter E, and Weitzman SA. 2002. Chronic inflammation and cancer. *Oncology (Williston Park)* 16(2):217-226, 229; discussion 230-212.
- Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, and Hanley JA. 2000. Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on breast cancer risk and stage. *Br J Cancer* 83(1):112-120.
- Shimizu K, Nakata M, Hiram Y, Yukawa T, Maeda A, and Tanemoto K. 2010. Tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells are correlated with cyclooxygenase-2 expression and are associated with recurrence in resected non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 5(5):585-590.
- Silver A, Boulwood J, Breckon G, Masson W, Adam J, Shaw AR, and Cox R. 1989. Interleukin-1 beta gene deregulation associated with chromosomal rearrangement: a candidate initiating event for murine radiation-myeloid leukemogenesis? *Mol Carcinog* 2(4):226-232.
- Sims JE, Nicklin MJ, Bazan JF, Barton JL, Busfield SJ, Ford JE, Kastelein RA, Kumar S, Lin H, Mulero JJ et al. . 2001. A new nomenclature for IL-1-family genes. *Trends Immunol* 22(10):536-537.
- Song X, Krelm Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, Voronov E, and Apte RN. 2005. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol* 175(12):8200-8208.
- Song X, Voronov E, Dvorkin T, Fima E, Cagnano E, Benharroch D, Shendler Y, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA et al. . 2003. Differential effects of IL-1 alpha and IL-1 beta on tumorigenicity patterns and invasiveness. *J Immunol* 171(12):6448-6456.
- St John MA, Dohadwala M, Luo J, Wang G, Lee G, Shih H, Heinrich E, Krysan K, Walser T, Hazra S et al. . 2009. Proinflammatory mediators upregulate snail in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15(19):6018-6027.
- Stockinger B, Veldhoen M, and Martin B. 2007. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 19(6):353-361.
- Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, and Whiteside TL. 2007. A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor

- microenvironment. *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1):4345-4354.
- Strauss L, Volland D, Kunkel M, and Reichert TE. 2005. Dual role of VEGF family members in the pathogenesis of head and neck cancer (HNSCC): possible link between angiogenesis and immune tolerance. *Med Sci Monit* 11(8):BR280-292.
- Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, and Lavelle EC. 2006. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203(7):1685-1691.
- Takanami I, Takeuchi K, and Naruke M. 2000. Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma. *Cancer* 88(12):2686-2692.
- Takayama S, Hatori M, Kurihara Y, Kinugasa Y, Shiota T, and Shintani S. 2009. Inhibition of TGF-beta1 suppresses motility and invasiveness of oral squamous cell carcinoma cell lines via modulation of integrins and down-regulation of matrix-metalloproteinases. *Oncol Rep* 21(1):205-210.
- Takeshima M, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, Arakawa T, Takuma T, Chiba I, Kaku T et al. . 2008. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med* 37(8):475-479.
- Tang B, Vu M, Booker T, Santner SJ, Miller FR, Anver MR, and Wakefield LM. 2003. TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 112(7):1116-1124.
- Thomas SJ, Bain CJ, Battistutta D, Ness AR, Paissat D, and MacLennan R. 2007. Betel quid not containing tobacco and oral cancer: a report on a case-control study in Papua New Guinea and a meta-analysis of current evidence. *Int J Cancer* 120(6):1318-1323.
- Thomas SJ, Harris R, Ness AR, Tauro J, MacLennan R, Howes N, and Bain CJ. 2008. Betel quid not containing tobacco and oral leukoplakia: a report on a cross-sectional study in Papua New Guinea and a meta-analysis of current evidence. *Int J Cancer* 123(8):1871-1876.
- Thun MJ, Henley SJ, and Gansler T. 2004. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found Symp* 256:6-21; discussion 22-28, 49-52, 266-269.
- Tlsty TD. 2001. Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 11(2):97-104.
- Tomita M, Matsuzaki Y, and Onitsuka T. 2000. Effect of mast cells on tumor angiogenesis in lung cancer. *Ann Thorac Surg* 69(6):1686-1690.
- Toth-Jakatics R, Jimi S, Takebayashi S, and Kawamoto N. 2000. Cutaneous malignant melanoma: correlation between neovascularization and peritumor accumulation of mast cells overexpressing vascular endothelial growth factor. *Hum Pathol* 31(8):955-960.
- Tsai YS, Lee KW, Huang JL, Liu YS, Juo SH, Kuo WR, Chang JG, Lin CS, and Jong YJ. 2008. Arecoline, a major alkaloid of areca nut, inhibits p53, represses DNA repair, and triggers DNA damage response in human epithelial cells. *Toxicology* 249(2-3):230-237.
- Unitt E, Marshall A, Gelson W, Rushbrook SM, Davies S, Vowler SL, Morris LS, Coleman N, and Alexander GJ. 2006. Tumour lymphocytic infiltrate and recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *J Hepatol* 45(2):246-253.

- Unitt E, Rushbrook SM, Marshall A, Davies S, Gibbs P, Morris LS, Coleman N, and Alexander GJ. 2005. Compromised lymphocytes infiltrate hepatocellular carcinoma: the role of T-regulatory cells. *Hepatology* 41(4):722-730.
- Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Avgoustidis D, Critselis E, Spyridonidou S, Vylliotis A, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E et al. . 2008. Gene expression polymorphisms of interleukins-1 beta, -4, -6, -8, -10, and tumor necrosis factors-alpha, -beta: regression analysis of their effect upon oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(8):821-832.
- Vallecillo Capilla M, Romero Olid MN, Olmedo Gaya MV, Reyes Botella C, and Bustos Ruiz V. 2007. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12(7):E518-523.
- Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A, Urcelay B, Tonino P, and Dinarello CA. 1996. Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro. *J Natl Cancer Inst* 88(3-4):198-205.
- Vidal-Vanaclocha F, Amezaga C, Asumendi A, Kaplanski G, and Dinarello CA. 1994. Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases. *Cancer Res* 54(10):2667-2672.
- Vidal-Vanaclocha F, Fantuzzi G, Mendoza L, Fuentes AM, Anasagasti MJ, Martin J, Carrascal T, Walsh P, Reznikov LL, Kim SH et al. . 2000. IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(2):734-739.
- Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, and Ferradimi L. 2004. Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173(2):1444-1453.
- Voronov E, Dayan M, Zinger H, Gayvoronsky L, Lin JP, Iwakura Y, Apte RN, and Mozes E. 2006. IL-1 beta-deficient mice are resistant to induction of experimental SLE. *Eur Cytokine Netw* 17(2):109-116.
- Wahl SM, Wen J, and Moutsopoulos N. 2006. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev* 213:213-227.
- Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, Hommura F, Kinoshita I, Ogura S, Dosaka-Akita H, and Nishimura M. 2003. CD4+ T cells in cancer stroma, not CD8+ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci* 94(11):1003-1009.
- Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ, Jr., Ord RA, and Wahl SM. 2007. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 65(3):475-484.
- Warnakulasuriya KA, and Ralhan R. 2007. Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco--a review. *J Oral Pathol Med* 36(2):63-77.
- Weaver CT, Hawrylowicz CM, and Unanue ER. 1988. T helper cell subsets require the expression of distinct costimulatory signals by antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(21):8181-8185.
- Weitzman SA, and Gordon LI. 1990. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76(4):655-663.

- Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee JK, Werman B, Krelin Y, Voronov E, Dinarello CA, and Apte RN. 2004. The precursor form of IL-1alpha is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2434-2439.
- Whiteside TL. 2004. Down-regulation of zeta-chain expression in T cells: a biomarker of prognosis in cancer? *Cancer Immunol Immunother* 53(10):865-878.
- Whiteside TL. 2006a. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16(1):3-15.
- Whiteside TL. 2006b. The role of immune cells in the tumor microenvironment. *Cancer Treat Res* 130:103-124.
- Whiteside TL. 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27(45):5904-5912.
- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, and Grubeck-Loebenstien B. 2003. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res* 9(2):606-612.
- Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Gastl G, Gunsilius E, and Marth C. 2005. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 11(23):8326-8331.
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, and June CH. 2001. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61(12):4766-4772.
- Woods KV, Adler-Storthz K, Clayman GL, Francis GM, and Grimm EA. 1998a. Interleukin-1 regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma in vitro: possible influence of p53 but not human papillomavirus E6/E7. *Cancer Res* 58(14):3142-3149.
- Woods KV, El-Naggar A, Clayman GL, and Grimm EA. 1998b. Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res* 58(14):3132-3141.
- Xie W, Bharathy S, Kim D, Haffty BG, Rimm DL, and Reiss M. 2003. Frequent alterations of Smad signaling in human head and neck squamous cell carcinomas: a tissue microarray analysis. *Oncol Res* 14(2):61-73.
- Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN et al. . 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 348(3):203-213.
- Zhang YL, Li J, Mo HY, Qiu F, Zheng LM, Qian CN, and Zeng YX. 2010. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* 9:4.
- Zhou J, Ding T, Pan W, Zhu LY, Li L, and Zheng L. 2009. Increased intratumoral regulatory T cells are related to intratumoral macrophages and poor prognosis in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer* 125(7):1640-1648.
- Zhou W, Park I, Pins M, Kozlowski JM, Jovanovic B, Zhang J, Lee C, and Ilio K. 2003. Dual regulation of proliferation and growth arrest in prostatic stromal cells by transforming growth factor-beta1. *Endocrinology* 144(10):4280-4284.

Zou W, and Restifo NP. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 10(4):248-256.

