

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

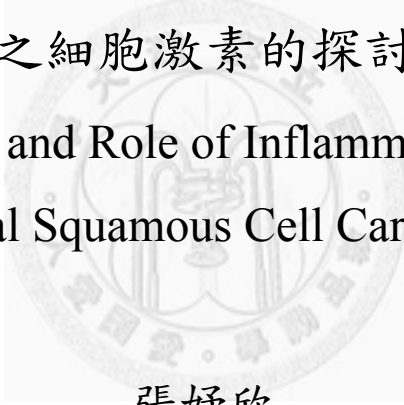
National Taiwan University

Master Thesis

在口腔鱗狀上皮細胞癌微環境中和發炎相關

之細胞激素的探討

The Expression and Role of Inflammatory Cytokines
in Oral Squamous Cell Carcinoma



張妤欣

Chang, Yu-Hsin

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

目錄.....	I
中文摘要.....	1
Abstract.....	2
第一章、緒論.....	3
第一節、相關研究背景.....	3
一、口腔鱗狀細胞癌的發生率.....	3
二、發炎與癌症之相關性.....	3
三、細菌促進癌症的發生.....	4
四、細菌、發炎及癌症之相關性.....	5
五、口腔內細菌的作用機轉.....	6
六、輔助型T細胞-17(Th17 cells)在發炎反應中的扮演的角色.....	9
七、調節型T細胞(regulatory T cells, Tregs)在發炎及癌症組織中的作用.....	12
八、腫瘤相關巨噬細胞(Tumor-associated macrophages)在癌症組織當中扮演的角色.....	14
第二節、實驗目的.....	17
第二章、實驗方法與材料.....	18
第一節、檢體的收集與來源.....	18
第二節、口腔鱗狀上皮細胞癌病患腫瘤組織及非腫瘤組織之DNA及RNA萃取.....	19
第三節、RNA之反轉錄.....	19
第四節、細菌DNA之聚合酶鏈鎖反應.....	20
第五節、同步定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR, RT-PCR).....	21
第六節、結果分析.....	21
第三章、結果.....	24
一、細菌DNA聚合酶連鎖反應之結果.....	24
二、口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	24
三、口腔癌腫瘤內各種激素表現量之間的相關性以及對應臨床病理分期結果.....	24
四、頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤之頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	26
五、牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	27
六、非腫瘤之頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	27
第四章 討論.....	28

一、口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	28
二、口腔癌腫瘤內各種激素表現量之間的相關性以及對應臨床病理分期結果.....	28
三、頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤之頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	30
四、牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	31
五、非腫瘤之頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	31
六、結論.....	31
第六章、參考文獻.....	33
圖表.....	52
表一：樣本臨床病理資料.....	52
表二：各種細胞激素及分子的引子(primer).....	53
表三：口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計.....	55
表四：口腔癌腫瘤組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計.....	56
各種激素表現量對照病理分期.....	56
各種激素表現量對照癌症部位.....	57
表五：.....	58
表六：頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤頰黏膜組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計.....	59
表七：牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦黏膜組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計.....	60
表八：非腫瘤頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計.....	61
圖一.....	62
圖二：口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	63
圖三：癌症組織中Treg相關激素間的相關性(具中度相關性以上).....	64
圖四：癌症組織中Th17相關激素間的相關性(具中度相關性以上).....	65
圖五：癌症組織中單核球及巨噬細胞相關激素間的相關性(具中度相關性以上).....	66
圖六：癌症組織中趨化激素間的相關性(具中度相關性以上).....	68
圖七：癌症組織中Foxp3及IL-17表現量的相關性.....	69
圖八：頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較.....	70
圖九：牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量	

比較..... 71
圖十：非腫瘤頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較..... 72



中文摘要

發炎反應是近期被發現的一個致癌重要因子，而發炎為什麼會促進癌症的形成目前還沒有定論，可能是由於發炎會產生趨化物、細胞激素，會刺激細胞增生和抑制凋亡，另外也會產生過氧化物損害DNA。一些發炎相關的細胞激素以及Th17 cell、Treg cell、巨噬細胞相關的細胞激素也和癌症有相關性。但這些細胞激素在口腔癌組織的表現量，以及對口腔癌的預後和臨床病理嚴重性的相關性仍不明確，是臨床研究值得探討的問題。

本研究收集手術切除之16個口腔癌腫瘤組織、4個非腫瘤組織，藉由抽取細菌16S rDNA，檢測是否有細菌的存在，以及萃取癌症組織RNA，觀察發炎相關之細胞激素的表現量，依照各激素的功能將其分為四組，分別是Treg、Th17、macrophage和chemokine四組。結果顯示*il-1 β* (p=0.018)、*tnf- α* (p=0.008)、*il-6* (p=0.018)、*tgf- β* (p=0.03)和*ccl-7* (p=0.012) 在腫瘤組織當中有顯著上升，而*ccl-21* (p=0.023)、*foxp3* (p=0.038)和*il-17* (p=0.028)在非腫瘤組織中的表現量高於腫瘤組織。因此我們推論發炎激素及CCL-7，一種單核球趨化激素，和腫瘤的發展有相關，他們可以吸引更多發炎相關細胞進入腫瘤微環境中；在非癌症組織中高度表現的IL-17可清除細胞外細菌，而調節型T細胞的轉錄因子Foxp3可藉由它們免疫抑制的功能來降低非腫瘤組織內的發炎反應。

關鍵字：口腔癌、發炎、細菌、調節型T細胞、Th17細胞、巨噬細胞

Abstract

Inflammation is an important risk factor of carcinogenesis. The mechanism of inflammation leading to carcinogenesis is still unclear, but inflammatory chemokines or cytokines may play some roles to stimulate cancer cell proliferation or inhibit apoptosis. Inflammatory reactions may also release different reactive oxygen species leading to DNA damage. Chemokines and cytokines, particularly those associated with Th17, regulatory T cells and macrophages were related to cancer initiation and progression. But the expression level of these chemokines or cytokines and their relationship to the prognosis and clinicopathological status of oral cancer is still unknown.

A total of 16 oral squamous cell carcinoma (OSCC) tissue and 4 non-cancer tissue were included in this study. The bacterial 16S ribosomal DNA was detected by PCR, and the expression level of cytokines and chemokines were quantitated by real-time PCR. The expression of *il-1 β* (p=0.018), *tnf- α* (p=0.008), *il-6* (p=0.018), *tgf- β* (p=0.03), and *ccl-7* (p=0.012) are higher in OSCC tissue whereas *ccl-21* (p=0.023), *foxp3* (p=0.038) and *il-17* (p=0.028) are higher in non-cancer tissue. Proinflammatory cytokines and CCL-7 may recruit more inflammatory cells into cancer microenvironment and contribute to tumor progression. IL-17, which was highly expressed in non-cancer tissue, could play important role in control extracellular bacterial infection, and Foxp3, a Treg transcription factor may diminish the inflammatory response by their immunosuppression function.

Keywords: oral cancer, inflammation, bacteria. Tregs, Th17, macrophage

第一章、緒論

第一節、相關研究背景

一、口腔鱗狀細胞癌的發生率

根據行政院衛生署之死因統計資料顯示，口腔癌在臺灣癌症死亡率排名從1981年的第十一位，到1996年上升至第七位，2007年則再上升至第六位(男性死亡率則從第八位上升至第四位)。自1992年以後口腔癌的發生率及死亡率節節上升，超過了鼻咽癌，已成為國人頭頸部癌症的第一位。不僅罹病平均年齡下降，而且每年發現的新病例及死亡人數都已超過二千人。最嚴重的現象是，在所有男女十大癌症中，口腔癌是最近五年來在台灣增加最快速的癌症。值得注意的是，其死亡成長率(16.91%)目前為惡性腫瘤之首，且為25-44歲中壯年男性癌症死亡率之第一位，可見口腔癌對台灣人民健康威脅之嚴重性。

二、發炎與癌症之相關性

許多研究已證實慢性發炎會造成癌症的發展，包括肺癌、大腸癌、肝癌、乳癌、子宮頸癌、前列腺癌、卵巢癌、食道癌、皮膚癌及淋巴瘤，其中慢性發炎疾病(chronic inflammatory disorder)、慢性感染(chronic infection)及長期的物理或化學刺激都會導致慢性發炎的產生，在這些病因中，慢性感染又佔了15% (Weitzman and Gordon 1990; Ness and Cottreau 1999; Shacter and Weitzman 2002; Pagano *et al.* 2004; Thun *et al.* 2004)。在一個免疫系統健全的個體中，病原體進入宿主體內若不能在第一時間被消滅就會導致慢性發炎的產生，而慢性發炎會產生過氧化物堆積，以及釋放發炎相關的細胞激素或趨化物。研究證實趨化物及其受器和癌症的形成及轉移有高度相關性(Lazennec and Richmond 2010);前列腺素能誘導癌症的發生及促進癌症的發展，並且能抑制體液免疫和細胞免疫的功能(Honn *et al.* 1981); IL-6能調節細胞生長、分化和存活(Grossman *et al.* 1989; Oyama *et al.* 1999; Hirano *et al.* 2000)。另外發炎能活化COX-2、VEGF表現，促進血管增生(Sappayatosok *et al.*

2009)；活化MAPK、VEGF、cyclin D1表現造成細胞增生；活化COX-2、NF- κ B、Bcl-2，抑制細胞凋亡的路徑而讓細胞存活(Lax and Thomas 2002)。細胞高度增生會增加細胞突變的發生，抑制細胞的凋亡則會使突變的細胞存活下來，日積月累就能提高癌症發生的可能性。

以B型肝炎演變為肝癌為例，病原體在進入一個免疫功能完全的宿主體內後，宿主的免疫系統活化巨噬細胞進行吞噬作用，或活化Th2細胞，輔助殺手型T細胞進行細胞毒殺作用，消滅病毒。但由於病毒變異性高，生長快速，以及宿主在受到病毒感染後免疫力可能會下降，使得病毒得以存活下來，這時就會走慢性發炎的路徑。慢性發炎主要以Th2 cell及B細胞的體液免疫反應為主，約有15~25%機率能成功消滅病原體，但長期的病毒感染可能造成病毒基因嵌入宿主基因中，改變宿主免疫細胞原本的特性和表現，或是改變宿主細胞表面的MHC class I受器，使受感染的細胞逃離被免疫系統破壞的結果。慢性發炎造成的過氧化物的堆積、DNA受損及細胞突變；另外長期發炎會促進TGF- β 及IL-10的分泌，刺激具有免疫抑制功能的調節型T細胞分化，最後造成免疫抑制、突變細胞躲避免疫系統的監測並存活下來；這些變異的細胞內的細胞增生路徑被活化，細胞凋亡的路徑被抑制，所以生長不受控制，能不斷增生造成肝癌的產生(Castello *et al.* 2010)。

除了細菌以外，腫瘤周圍的細胞也會分泌一些細胞激素，這些細胞包含了纖維母細胞(cancer-associated fibroblasts)、未分化的間葉幹細胞(mesenchymal stem cells)、內皮細胞(endothelial cells)、巨噬細胞(tumor-associated macrophages)以及嗜中性球(tumor-associated neutrophils)。這些細胞共同組成了腫瘤周圍的環境(tumor microenvironment)，其分泌的細胞激素決定了腫瘤的生長或抑制(Tlsty 2001; Coussens and Werb 2002; Kiaris *et al.* 2004; Mueller and Fusenig 2004)。

三、細菌促進癌症的發生

目前已有許多癌症證實和微生物有相關性，包含胃癌(Parsonnet *et al.* 1991)、

鼻咽癌(Young and Rickinson 2004)、子宮頸癌、大腸癌(Eaden *et al.* 2001; Newman *et al.* 2001; Shacter and Weitzman 2002)、肝癌(Nakamoto *et al.* 1998)和膽囊癌(Welton *et al.* 1979)。這些微生物造成癌症的機轉目前可分為四類，一是微生物本身便會產生一些致癌物質；二是代謝致癌前驅物產生致癌物；三是微生物會直接改變宿主細胞的生長周期或訊息傳導，刺激細胞的增生或抑制細胞凋亡；四是刺激宿主的免疫反應，使周圍形成一個容易致癌的環境(Hooper *et al.* 2009)。其中，發炎反應是近期被發現的一個致癌重要因子，在癌症的發生和進行佔有重要的地位，已有研究證實肺癌、大腸癌、肝癌、乳癌、子宮頸癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、食道癌、皮膚癌和淋巴癌的產生和發炎反應有相關性。這些發炎反應為什麼會促進癌症的形成目前還沒有定論，可能是由於發炎會產生趨化物、細胞激素，會刺激細胞增生和抑制凋亡，另外也會產生過氧化物，會損害DNA (Coussens and Werb 2002; Macarthur *et al.* 2004; Karin *et al.* 2006; Lin and Karin 2007)。

四、細菌、發炎及癌症之相關性

第一個被世界衛生組織(Keshava *et al.*)認可，和癌症的發生有關的細菌是幽門螺旋桿菌。它可以刺激宿主體內的CagE高度表現，造成COX2和MAPK的活化，促進細胞增生和血管形成(Blaser *et al.* 1995; Watanabe *et al.* 1998; Hirata *et al.* 2001)。細胞不斷增生增加了細胞突變的機會，同時血管的生成使血液養份和激素供應能進入腫瘤內部，更加促進了腫瘤的生長。幽門螺旋桿菌有多種變異型，並非每一種都會刺激胃癌的發生，例如*Helicobacter mustelae*、*Helicobacter felis*因不帶有cagA基因，不會讓實驗動物產生胃腺癌，反而形成胃部黏膜相關淋巴組織淋巴瘤(mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma, MALT lymphoma)(Erdman *et al.* 1997; Montalban *et al.* 2001)。除了幽門桿菌和癌症有關以外，*Chlamydia spp.*能刺激轉錄因子NF- κ B，促進細胞增生，提高癌症的發生率(Lax and Thomas 2002; Kim *et al.* 2005)；*Escherichia coli*能刺激CNF (cytotoxic necrotizing factor)，活化RhoA，刺激

細胞分裂，造成大腸癌肉增生及Crohn's disease，其和大腸癌之發生息息相關(Barnich *et al.* 2010)；*Citrobacter spp*能刺激cyclin D1的表現，造成細胞增生，和腸胃道的腫瘤有關(Barthold and Jonas 1977; Luperchio and Schauer 2001; Newman *et al.* 2001)；*Bartonella spp*能促進VEGF的產生，造成血管內皮增生，形成疣狀物(Maeno *et al.* 1999; Kempf *et al.* 2001)。除此之外，也有一些論文研究發表*Streptococcus bovis*和大腸癌有關(Ellmerich *et al.* 2000; Waisberg *et al.* 2002)；傷寒桿菌和膽囊癌有關(Welton *et al.* 1979; Nath *et al.* 1997; Shukla *et al.* 2000)。

在口腔癌組織中，目前已發現TNF- α 、IL-6、IL-8和IL-10的基因有高度表現之現象(Vairaktaris *et al.* 2008)。IL-6屬於發炎前細胞激素，高度表現在發炎環境中；TNF- α 能刺激細胞壞死，壞死細胞會進一步刺激IL-6和IL-8的產生；IL-10、TGF- β 則是和調節性T細胞有關，其具有免疫抑制的功能。細菌可能藉由刺激這些細胞激素的分泌，產生一個致癌的環境，最後演變成口腔癌；或是口腔癌凹凸不平的表面容易造成細菌的藏匿(Nagy *et al.* 1998)，細菌再刺激宿主細胞的發炎反應，促進腫瘤的生長。細菌和腫瘤的關係，其先後順序目前仍沒有一個定論。

五、口腔內細菌的作用機轉

口腔是一個很特別的環境，平時就暴露在眾多細菌當中，許多口腔疾病也和細菌的感染有相關性，給予一個適當的環境讓特殊的細菌生長，就可以引起口腔發炎反應(Delima *et al.* 2002; Tlaskalova-Hogenova *et al.* 2004)。在先前的研究發現口腔癌的組織當中有細菌DNA的存在(Morita *et al.* 2003)。研究指出，細菌的一些結構蛋白例如*Pasteurella multocida toxin* (PMT)，會刺激細胞的增生，其效果甚至是人體自行產生的PDGF的300倍(Henderson *et al.* 1998; Lax and Grigoriadis 2001; Pullinger *et al.* 2001)；*Porphyromonas gingivalis*表面的脂多糖及蛋白質會刺激纖維母細胞的增生(Mihara *et al.* 1993; Takemura *et al.* 1998; Putnins *et al.* 2002)。有些細

菌則藉由刺激Bcl-2基因的表現而抑制細胞凋亡，例如大腸桿菌的細胞毒性壞死因子(cytotoxic necrotizing factor type 1, CNF1) (Fiorentini *et al.* 1998; Rippere-Lampe *et al.* 2001)。若細胞不受控制一直分裂增生時就容易產生突變。再者細菌會促使宿主產生發炎反應，在發炎的環境中常會有自由基的沉積，自由基則會造成DNA損壞。

口腔內有些菌種是能代謝乙醇產生致癌物acetaldehyde，例如*Neisseria* (Muto *et al.* 2000)；另外有一株能抵抗菸中焦油的金黃色葡萄球菌會促進宿主產生較高量的TNF- α (Fujiki *et al.* 2004)；*Treponema denticola*則是能抵抗黏膜分泌的 β -Defensins而進入上皮當中(Narikiyo *et al.* 2004)。除此之外，*P. gingivalis* 能刺激COX-2的表現，使TNF- α 、IL-6、IL-8及IL-1 β 上升；*Eikenella corrodens* 能刺激人類口腔上皮細胞分泌IL-6、IL-8和PGE₂(Lax and Thomas 2002)。*Streptococcus anginosus*和*Streptococcus Mitis*能刺激人類食道上皮cell-line產生發炎激素，此外將*S. anginosus*上清液和老鼠腹膜滲出液細胞共同培養時，會促進一氧化氮和發炎激素之合成(Narikiyo *et al.* 2004)。牙周病病人唾液中若檢測出有*S. anginosus*的存在，8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)的濃度也會較高(Sugano *et al.* 2003)，而8-OHdG可用來評估發炎細胞的浸潤以及DNA氧化破壞的程度(Romano *et al.* 2000)。

文獻指出，存在於腫瘤表面的微生物和非腫瘤組織表面的微生物菌叢是不同的，從口腔鱗狀上皮癌患者口中取得腫瘤表面的細菌生物膜(biofilm)，以及從鄰近非腫瘤組織表面取得的細菌生物膜，經過培養後發現，鱗狀上皮細胞癌表面的細菌生物膜有較高的總菌落形成單位(CFU)，同時某些菌種的菌落單位也較高，包括厭氧菌*Veillonella spp*、*Fusobacterium spp*、*Prevotella spp*、*Porphyromonas spp*、*Actinomyces spp*及嗜氧菌*Haemophilus spp*、*Enterobacteriaceae spp*和*Streptococcus spp*等，而白色念珠球菌(*Candida albicans*)則是只出現在口腔癌組織表面的細菌生物膜中，顯示出腫瘤表面的菌叢和非腫瘤組織表面的菌叢是不同的(Nagy *et al.* 1998)。

在眾多的口腔細菌當中，咽峽炎鏈球菌(*Streptococcus anginosus*)目前在上消化道的惡性腫瘤被廣泛研究。*S. anginosus*是口腔內常在菌株，1980年由學者Hamada和Slade發現廣泛存在於牙菌斑中(Hamada and Slade 1980)。1995年，Sasaki等人無意間在手術切除的胃癌組織內發現含有*S. anginosus*的DNA (Sasaki *et al.* 1995)；同一組學者在1998年發現除了胃癌組織以外，在大部分的食道鱗狀上皮細胞癌組織中都可以檢測到它的DNA (Sasaki *et al.* 1998)。Tateda等人在2000年也發現在頭頸部鱗狀上皮細胞癌的組織當中，利用聚合酶鏈鎖反應都可檢測到*S. anginosus*的DNA，推論出若個體擁有易於被*S. anginosus*感染的上消化道環境，會增加得到頭頸部鱗狀上皮細胞癌的風險(Tateda *et al.* 2000)。2003年Morita等人利用同步定量聚合酶鏈鎖反應(real-time PCR)，觀察食道鱗狀上皮細胞癌、口腔鱗狀上皮細胞癌以及正常食道和口腔黏膜組織，是否有*S. anginosus*的DNA表現，結果發現食道癌組織有較高的比例表現*S. anginosus*的DNA，顯示出*S. anginosus*和食道癌的相關性高於口腔癌(Morita *et al.* 2003)。

2005年，Sasaki等人，檢測同一位口腔癌患者，其口腔癌組織、唾液及牙菌斑當中是否含有*S. anginosus*的DNA，結果發現，若在口腔癌組織當中檢測出*S. anginosus*的基因，從同一位患者的牙菌斑中也可檢測到同一基因型的*S. anginosus*之DNA，而在唾液中則探測不出同一種基因型的細菌，推測存在於口腔癌組織當中的*S. anginosus*可能來自牙菌斑(Sasaki *et al.* 2005)。2006年5月，Hooper等學者藉由細菌培養方式，培養出位於口腔鱗狀上皮細胞癌表面、內部、以及距離腫瘤邊緣至少5公分以上的非腫瘤口腔黏膜表面的細菌，發現腫瘤內部培養出的菌種也都會在腫瘤表面組織培養出來，而且表面的菌種會比內部的多，而非腫瘤口腔黏膜組織表面培養出來的菌種則和腫瘤培養出來的菌種不同，這可能由於腫瘤的內部處於一個缺氧的酸性環境，所以培養出來的細菌以糖解作用的耐酸菌種為主，包括*Micrococcus luteus*、*Prevotella melaninogenica*、*Exiguobacterium oxidotolerans*、*Fusobacterium naviforme*、*Staphylococcus aureus*和*Veillonella parvula* (Hooper *et al.*

2006)。

本實驗室陳玟秀醫師，在2007年發表的論文中，利用DNA-DNA雜交的方法，發現*Streptococcus oralis*及*Streptococcus mitis*兩株細菌在同一位患者的口腔鱗狀上皮細胞癌組織和鄰近的非腫瘤組織表現的比例和數目差異最大；比較所有的口腔鱗狀上皮細胞癌組織、鄰近非腫瘤組織、非口腔癌患者的正常牙齦組織和其他癌組織當中，不同細菌密度的平均值，發現*S. anginosus*、*S. oralis*、*S. mitis*、*M. luteus*、*V. parvula*和 *F. naviforme*在口腔鱗狀上皮細胞癌的細菌密度高於其他組織。

六、輔助型T細胞-17(Th17 cells)在發炎反應中的扮演的角色

Th17細胞屬於CD4⁺輔助型T細胞當中的一個亞型，是近期被發現和過度發炎及自體免疫相關的細胞群。這類細胞特色在於分泌IL-17A、IL-17F及IL-22，由於它會產生大量IL-17A，因此Wynn等學者便把它命名為Th17細胞。IL-6和TGF-β能誘導CD4⁺ T細胞發育為Th17細胞(Veldhoen *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2007)，IL-21以自我分泌調節的作用(autocrine)來促進Th17的增生(Korn *et al.* 2007; Nurieva *et al.* 2007)。這些細胞激素刺激後造成STAT3的磷酸化，以及細胞內ROR γ t這個轉錄因子的表現量上升，促使IL-17的表現。這些Th17細胞的維持、增生和晚期分化必須依賴IL-1β和IL-23 (Sutton *et al.* 2006; Veldhoen *et al.* 2006; Acosta-Rodriguez *et al.* 2007; Wilson *et al.* 2007)。IL-23是近期被發現，屬於IL-12家族當中異質二構體(heterodimer)的細胞激素，包含了p40及p19兩個次單元，能誘導Th17進一步的發育及增生(Stockinger and Veldhoen 2007)，刺激其分泌IL-17 (Aggarwal *et al.* 2003; Harrington *et al.* 2005; Veldhoen *et al.* 2006)。

許多細胞表面能表現IL-17的特定受器IL-17R，包括淋巴球、上皮細胞、血管內皮細胞、纖維母細胞和間皮細胞(Moseley *et al.* 2003)，當連接上IL-17R後，細胞內的訊息傳導啟動，促使各種細胞分泌發炎前激素(proinflammatory cytokine)，包括IL-6、IL-8、IL-1β和TNF-α，以及刺激聚集因子(colony-stimulating factor, CSF)、

化學趨化激素(CXC chemokine)，促進嗜中性球的生成、遷移和聚集(Fossiez *et al.* 1998; Jovanovic *et al.* 1998; Schwarzenberger *et al.* 2000)。Th17在免疫系統中主要是清除細胞外的感染細菌，例如克雷白氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)(Ye *et al.* 2001)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)(Dubin and Kolls 2007)、易脆桿菌(*Bacteroides fragilis*)(Chung *et al.* 2003)以及大腸桿菌(Shibata *et al.* 2007)；但Th17對於細胞內細菌的清除效果有限，因為嗜中性球殺死細胞內細菌的能力不足。

除此之外，IL-17還有許多功能，包括作為T細胞的共同刺激分子(Yao *et al.* 1995)、藉由促進樹突細胞成熟來對抗外來物、吸引並將巨噬細胞局限在發炎處、活化自然殺手細胞來增強抗腫瘤的能力、以及誘導抗微生物肽的產生，如防禦素(defensin)、S-100蛋白和金屬蛋白酶(metalloproteinase, MMP)，幫助宿主對抗感染(Antonysamy *et al.* 1999)。在動物實驗當中，在IL-17基因缺陷的老鼠身上發現接觸過敏、延遲過敏、呼吸道過敏反應，以及T細胞相關的抗體產量有明顯的下降，這些IL-17缺乏的老鼠捐獻出的T細胞也不會在其他的老鼠身上引起急性移植物對抗宿主的反應，顯示出IL-17對於過敏原專一性T細胞免疫反應(allergen-specific T cell-mediated immune response)當中具有活化T細胞的重要功能(Nakae *et al.* 2002)。此外，在p19基因缺陷的老鼠中，過敏性腦膜炎及膠原蛋白誘發的關節炎均顯著降低(Murphy *et al.* 2003; Langrish *et al.* 2005)，TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表現量也降低，顯示出IL-17能促進發炎前激素的分泌以及誘導發炎反應。在許多發炎性疾病病人血漿、器官以及組織當中都能偵測到IL-17，包括類風濕性關節炎、骨關節炎(Attur *et al.* 1997; Aarvak *et al.* 1999; Infante-Duarte *et al.* 2000)、多重性硬化症(Matusevicius *et al.* 1999)、紅斑性狼瘡(Wong *et al.* 2000)、移植排斥(Antonysamy *et al.* 1999)和氣喘(Wong *et al.* 2001)，顯示IL-17能影響一些疾病的發展。Th17也會產生IL-22，研究顯示它能誘導上皮的棘皮層增厚，以及牛皮癬的發生(Zheng *et al.* 2007; Ma *et al.* 2008)。

在臨床癌症研究發現，Th17的數量在人類卵巢癌、腎臟癌和胰臟癌的病人周

邊血液、腹水以及腫瘤組織當中都有顯著增加(Kryczek *et al.* 2007)。此外許多學者也發現在許多腫瘤當中Th17相關的細胞激素的表現量，例如IL-17及IL-23，都會上升，例如蕁狀黴菌病、Sezary症候群(Ciree *et al.* 2004)、卵巢癌(Kato *et al.* 2001)、前列腺癌(Steiner *et al.* 2003)、大腸癌(Le Gouvello *et al.* 2008)及其它惡性腫瘤(Langowski *et al.* 2006)；在胃癌的周邊血液以及腫瘤轉移淋巴結中也發現Th17數量顯著上升，血漿中的IL-17及IL-23濃度增加，腫瘤組織內的IL-17、IL-23、RORC的mRNA表現量也上升(Zhang *et al.* 2008)；但是在老鼠實驗卻顯示，腫瘤專一抗原刺激的Th17能縮小黑色素細胞瘤的體積(Muranski *et al.* 2008)。因此Th17的在腫瘤微環境中是否會促進腫瘤的生長以及是否影響腫瘤的預後目前尚未定論。

近期研究發現，人類Th17細胞屬於CD4⁺CD45RO⁺其中一群，能分泌高量的CCR6 (Acosta-Rodriguez *et al.* 2007)；另外，在人類周邊血液及類淋巴組織當中發現有一群CD4⁺Foxp3⁺調節型T細胞能表現CCR6，在活化後也能分泌IL-17。這些特殊的調節型T細胞中同時表現Foxp3及ROR γ t兩種轉錄因子，分別與調節型T細胞和Th17細胞發育及功能有關(Fontenot *et al.* 2003; Sakaguchi 2005; Ivanov *et al.* 2006)。研究指出，CD4⁺Foxp3⁺CCR6⁺IL-17分泌細胞和CD4⁺T細胞共同培養時能抑制CD4⁺T細胞的增生，顯示出衍生自CD4⁺CD25^{high}調節性T細胞的IL-17⁺Foxp3⁺T細胞保留了免疫抑制的功能；利用transwell實驗，發現IL-17⁺Foxp3⁺調節型T細胞抑制CD4⁺T細胞增生的功能消失，表示其抑制功能需要藉由細胞接觸才可發揮。分離胸腺及周邊血液中的調節型T細胞，並分為CCR6⁺及CCR6⁻兩組，發現分離自胸腺中的調節型T細胞經由PMA/ionomycin刺激24小時後，沒有產生IL-17；而分離自周邊血液的CCR6⁺CD4⁺CD25^{high}調節型T細胞經由IL-2刺激後便會增生，而CCR6⁻CD4⁺CD25^{high}調節型T細胞則需要額外的IL-1 β 、IL-6、IL-21、IL-23刺激後才可以增生，顯示出具有分泌IL-17功能的調節型T細胞可能來自周邊血液而非來自胸腺，而這些會同時表現Foxp3及ROR γ t兩種轉錄因子的T細胞在免疫系統扮演的功能目前尚未明確(Voo *et al.* 2009)。

七、調節型T細胞(regulatory T cells, Tregs)在發炎及癌症組織中的作用

調節型T細胞和一般的T細胞不同，體外培養實驗發現它受到抗原刺激後無法像一般T細胞一樣增生或是分泌細胞激素，而是抑制一般T細胞的活化(Takahashi *et al.* 1998; Thornton and Shevach 1998)。這些細胞能抑制免疫反應及維持T細胞群間的免疫平衡，包括避免自體免疫疾病、過度發炎及過敏反應，以及建立食物抗原耐受性。先前研究證實，某些腫瘤組織中的調節型T細胞會抑制免疫反應，使腫瘤生長不受限制，病人會有較差的預後及降低存活率。調節型T細胞的來源主要分為位於胸腺的天然調節型T細胞(natural Treg, nTreg)，調節自身耐受度；以及位於周邊組織，受到刺激誘導後才分化的誘導調節型T細胞(inducible Treg, iTreg)，抑制發炎反應。調節型T細胞的免疫抑制機轉至今仍不明確，有學者指出它可能藉由三種路徑來調控：一是和其他的T細胞競爭抗原呈現細胞的表面抗原，使得T細胞無法接收到抗原而活化；二是表現抑制性的訊號，使抗原呈現細胞無法將抗原訊息傳遞給T細胞，或是促進抗原呈現細胞釋放抑制性細胞激素，例如IL-10 (Asseman *et al.* 1999)及TGF- β (Powrie *et al.* 1996)，來抑制T細胞；三是當調節型T細胞和抗原呈現細胞結合後會釋出抑制性的訊息給其他的T細胞。Foxp3是調節型T細胞內的轉錄因子，可調控基因的表現以及蛋白質的量，影響調節型T細胞的發育及功能。

Sakaguchi等學者研究指出，CD4⁺CD25⁺ Tregs能分泌分子及細胞激素來抑制T細胞的活性、增生和存活，達到免疫抑制的結果，避免自體免疫疾病的發生以及調節自身的免疫耐受度，在老鼠實驗中發現，若移除老鼠的CD4⁺CD25⁺細胞，會造成自體免疫疾病(Sakaguchi *et al.* 1995)。目前已經有許多研究證實CD4⁺CD25⁺ Tregs能抑制T細胞偵測到腫瘤專一抗原(tumor specific antigen)後產生的免疫反應，降低患者抵抗腫瘤生長的免疫作用，同時也降低了存活率。Zhou及Levitsky發現腫瘤當中的nTregs會抑制腫瘤的免疫反應，iTregs會抑制發炎反應，兩者都會增加體內對腫瘤的耐受度(Zhou and Levitsky 2007)。腫瘤藉由分泌一些分子或是利用

表面接觸的方式來影響調節型T細胞，包括Cyclooxygenase-2 (COX-2)(Broere *et al.* 2009)、CD70 (Jacquot 2000)、Galectin-1 (Scott and Weinberg 2004)、TGF- β 、Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO)(Chen *et al.* 2008)等，它們可以促使調節型T細胞的增生及減少細胞凋亡。

人類的nTregs分為CD45RO⁺及CD45RO⁻，其中CD45RO⁺才具有抑制的功能，當CD4⁺T細胞受到抗原重覆刺激或是在TGF- β 的環境中會刺激其分化為CD45RARO⁺的記憶表現型，提高免疫抑制的作用。CD4⁺CD25⁺調節T細胞表面具有CD45RO、細胞毒性T淋巴細胞相關抗原-4 (CTLA-4)、糖皮質激素誘導腫瘤壞死因子受器(GITR)(Muriglian, Ramirez-Montagut *et al.* 2004)，細胞同時也會表現Foxp3轉錄因子。這些調節型T細胞藉由表面的共同刺激分子(costimulatory factor) CTLA-4和B7家族接觸後能發出抑制的訊息，CTLA-4只在T細胞被活化後才表現，當調節型T細胞表面的CD28和CTLA-4都受到訊息分子連結時，就能抑制IL-2的分泌以及細胞的增生(Krummel and Allison 1996; Walunas *et al.* 1996)。當投予抗CTLA-4抗體後，體內特定抗原耐受力降低(Perez *et al.* 1997)，同時也加強了抗腫瘤能力(Leach *et al.* 1996)和自體免疫反應(Karandikar *et al.* 1996; Perrin *et al.* 1996; Luhder *et al.* 1998)。

學者Albers指出，腫瘤周圍浸潤的淋巴球當中富含Foxp3⁺, GITR⁺, CTLA-4⁺調節型T細胞，而這些調節型T細胞可能會優先移動到腫瘤組織當中，並且聚集(Albers *et al.* 2005)，腫瘤當中的調節型T細胞可以透過分泌TGF- β 來抑制CD8⁺ T細胞的毒殺作用，降低抗腫瘤的反應(Zou 2005)。有許多研究證實在癌症病患的周邊血液、腫瘤環境，以及腫瘤轉移淋巴結當中發現CD4⁺CD25^{high}調節性T細胞數目上升，同時這些細胞也表現出免疫抑制的能力(Woo *et al.* 2001; Liyanage *et al.* 2002)。研究指出在乳癌、胰臟癌、肝癌、胃癌、食道癌、非小細胞肺癌、卵巢癌及頭頸癌患者的周邊血液當中，調節型T細胞的量比健康人的周邊血液高出許多(Strauss *et al.* 2007; Alhamarneh *et al.* 2008)；而在非小細胞肺癌、卵巢癌、肝癌、胃癌、食道癌、

乳癌及胰臟癌的腫瘤環境中發現有大量的調節型T細胞浸潤。動物實驗中，移除調節型T細胞後可以發現腫瘤免疫反應活化，包括CD8⁺ cytotoxic T細胞、CD4⁺ Th細胞及CD4⁻CD8⁻NK-like細胞(Sutmuller *et al.* 2001; Shimizu *et al.* 2002)，顯示出調節型T細胞可以降低腫瘤當中CD8⁺T細胞、自然殺手細胞及自然殺手T細胞的抗腫瘤免疫反應(Ho *et al.* 2002; Azuma *et al.* 2003; Albers *et al.* 2005; Nishikawa *et al.* 2005)。

這些調節型T細胞和癌症患者的預後及存活率也有相關性，Bate學者指出，Foxp3⁺調節型T細胞的數目增加，會提高乳癌晚期復發的風險性。腫瘤本身也可抑制免疫反應，其中，調節型T細胞分泌的TGF- β 被認為是腫瘤誘導免疫抑制作用中的重要角色，能刺激Foxp3的表現，促進調節型T細胞的分化(Bates, Fox *et al.* 2006)；分化的調節型T細胞會分泌大量的TGF- β ，抑制Th1細胞和Th2細胞的功能及抑制毒殺性T細胞的增生，使腫瘤逃離免疫監控(Somasundaram *et al.* 2002)。Curiel等學者在人類卵巢癌研究當中發現，腫瘤微環境當中的巨噬細胞能分泌CCL-22，這種趨化激素能使調節型T細胞聚集到腫瘤處，並且抑制腫瘤專一性T細胞免疫反應，降低癌症存活率(Curiel *et al.* 2004)。

八、腫瘤相關巨噬細胞(Tumor-associated macrophages)在癌症組織當中扮演的角色

巨噬細胞分化自單核球(Pollard 2009)，會表現特定的標定蛋白，在人類的巨噬細胞表面會表現CD68、CD163、CD16、CD312和CD115等特定蛋白，來和同樣緣自於骨髓的多核嗜中性球及嗜酸性球區隔開來(Joyce and Pollard 2009)。巨噬細胞依照其參與的免疫反應可分為以下幾類，一類是activated macrophages，當病原體誘導Th1細胞活化，分泌出IFN- γ ，接著 IFN- γ 會和巨噬細胞表面的Toll-like receptor (TLR)結合，刺激巨噬細胞MHC II表現量上升、分泌IL-12和TNF- α 、產生過氧化物和一氧化氮以及具有清除病原體和細胞的能力。另一種是alternatively activated macrophages，經由IL-4和IL-13刺激後分化，和Th2細胞的免疫反應比較有

相關性，包括體液免疫及傷口癒合(Gordon 2003)。呈現抗原的遷移樹突細胞也是單核吞噬細胞的分支之一。另外有一群受到CSF-1的調控，影響組織的發育及衡定，稱為trophic macrophages，例如幫助骨頭結構重建的osteoclast (Pollard 2009)。Mantovani學者等人認為，在腫瘤當中的巨噬細胞會比較傾向於alternatively activated macrophages，或稱做M2，而非activated macrophages (M1)(Mantovani and Sica 2010)。除了M1和M2兩種細胞外，有些腫瘤相關巨噬細胞會同時表現M1和M2的特性，以及促進腫瘤的發展(Ojalvo *et al.* 2009; Ojalvo *et al.* 2010)。

研究指出，巨噬細胞對於癌症的發展具有正向刺激的作用。慢性發炎組織中，巨噬細胞能產生許多過氧化物及一氧化氮，形成一個促進突變的環境，造成DNA的損害和細胞突變(Pang *et al.* 2007; Meira *et al.* 2008)。接著免疫細胞，包括巨噬細胞，可以分泌生長激素來刺激這些基因突變細胞的增生，包括IL-6 (Lin and Karin 2007; Naugler *et al.* 2007; Grivennikov *et al.* 2009)和TNF- α (Karin *et al.* 2006)。這些腫瘤發生前存在的巨噬細胞偏向屬於活化型(Gordon 2003)，也就是M1；一旦腫瘤開始發展，這些巨噬細胞會轉變為發炎型，具有M2及trophic表現型的特性，促進組織生成(Pollard 2004; Pollard 2009)。這些暫時具有M2及trophic表現型特性的巨噬細胞能減少iNOS及TNF- α 的表現量，抑制NF- κ B的訊息，但其存在的意義目前尚未明瞭。

生長中的腫瘤可以產生CSF-1及CCL-2來吸引血液中的單核球聚集到腫瘤部位。Lin等學者在2001年PyMT乳癌老鼠實驗中，發現在CSF-1基因缺陷的老鼠(PyMT/CSF-1^{op/op})，末期乳癌和肺部轉移的數量顯著降低，並且在腫瘤組織內無法聚集成熟的巨噬細胞；若利用基因轉殖回復CSF-1分泌的能力，發現巨噬細胞浸潤的情況恢復(Lin *et al.* 2001)。這些受到CSF-1吸引到腫瘤組織的單核球會分化為trophic表現型巨噬細胞，分泌IL-4及IL-10，具有免疫調節功能。在許多人類腫瘤中發現CSF-1的過度表現會造成較差的預後，包括乳癌、卵巢癌、前列腺癌、肝癌和大腸癌(Sapi and Kacinski 1999; Lin *et al.* 2002; Groblewska *et al.* 2007; Mroczko *et*

al. 2007; Zhu *et al.* 2008; Mantovani and Sica 2010); CCL-2在許多癌症組織中也會大量表現(Mantovani and Sica 2010)，在乳癌、大腸癌和甲狀腺癌中證實和較差的預後有相關性(Saji *et al.* 2001; Bailey *et al.* 2007; Tanaka *et al.* 2009; Yoshidome *et al.* 2009)。

巨噬細胞可以藉由分泌一些物質來促進腫瘤侵犯的能力，包括分泌VEGF及其他血管生成因子來幫助血管生成。腫瘤組織分泌CSF-1刺激單核球分化成trophic表現型，trophic macrophage分泌EGF，和腫瘤細胞形成EGF-CSF-1 paracrine交互作用(Condeelis and Pollard 2006)，而EGF能使腫瘤細胞具有遷移的能力(Wyckoff *et al.* 2004)。巨噬細胞可以分泌蛋白酶分解基底層細胞，使腫瘤向下侵犯，同時也能分泌IL-10，誘導單核球表現PD-L1來抑制細胞毒殺T細胞的作用(Kuang *et al.* 2009)。在人類卵巢癌當中發現，巨噬細胞能分泌CCL-22，吸引調節型T細胞過來，抑制細胞毒殺T細胞的作用，而這些調節型T細胞可能會導致較差的存活率(Curiel *et al.* 2004)。在口腔癌研究當中，利用免疫組織化學染色方法，發現腫瘤大小、淋巴轉移、臨床分期及癌症復發率和腫瘤組織內巨噬細胞密度呈現正向相關性；以顯微鏡觀察，若巨噬細胞 > 196顆/HPF，病人存活率下降(Lu *et al.* 2010)。簡而言之，巨噬細胞能藉由刺激腫瘤的發展、加強腫瘤向下侵犯的能力、抑制免疫反應以和促進腫瘤的遠端轉移來影響病人的預後及存活率。

第二節、實驗目的

本實驗主要在探測癌細胞組織中是否有細菌的16S rDNA，以及觀察發炎相關之細胞激素、趨化激素的表現。由於先前研究已證實在頭頸癌組織當中有大量Treg聚集，在口腔癌組織中也發現大量Th17細胞存在，但兩者和口腔癌之臨床病理嚴重性、預後及復發率的相關性尚未明確，因此本實驗將發炎相關之細胞激素略分為四組，包括：發炎細胞激素IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CXCL-9、IFN-r，Th17相關細胞激素IL-17、IL-21、IL-22、IL-23，Treg相關細胞激素Foxp3、IL-10、TGF- β 和趨化激素CCL-21、CCL-22，以及巨噬細胞相關激素IL-4、GM-CSF，和趨化激素CCL-2、CCL-7。計算出各個激素對應GAPDH的相對表現量後，將結果對照病人的臨床病理狀況，統計細胞激素、趨化激素和臨床病理表徵的相關性，觀察臨床病理嚴重性以及病灶部位是否和Treg、Th17、macrophage相關細胞激素的上升或下降有相關性，進而探討細菌引發口腔癌微環境發炎反應是否和口腔癌的進展及惡化有關。



第二章、實驗方法與材料

第一節、檢體的收集與來源

本實驗收集十六例口腔癌病人之腫瘤組織為實驗組，並蒐集兩例口腔癌患者對側非腫瘤頰黏膜組織、一例智齒遠心側牙齦組織及一例鱗狀上皮增生病患的頰黏膜為對照組。實驗組為口腔鱗狀上皮細胞癌的病患，經由手術切除之後，以無菌技術由腫瘤表面中央部份取0.5立方公分大小的癌症組織，並紀錄每個病例的癌症分期(clinical stage)、癌症病理分期(histological stage)、病理組織發現及預後等資料。口腔癌分期根據2002年美國癌症醫學會(AJCC)的定義，依照腫瘤大小、頸部淋巴轉移及遠端轉移的情形來分類：

一、腫瘤原發部位：

1. T0：原位癌，腫瘤局限在上皮組織內。
2. T1：腫瘤最大直徑小於等於2公分。
3. T2：腫瘤最大直徑大於2公分，小於等於4公分。
4. T3：腫瘤最大直徑大於4公分。
5. T4a：腫瘤侵犯周圍組織，例如穿透過皮質骨、侵犯舌頭深層肌肉、侵犯上顎竇或是侵犯到臉部皮膚。
6. T4b：腫瘤侵犯至咬肌間隙、翼顎板、顱底，或進入頸內動脈。

二、頸部淋巴轉移情形：

1. N0：沒有淋巴轉移
2. N1：單側單顆淋巴結轉移，最大直徑小於等於3公分。
3. N2a：單側單顆淋巴結轉移，最大直徑大於3公分，小於6公分。
4. N2b：單側多顆淋巴結轉移，最大直徑小於6公分。
5. N2c：雙側或對側淋巴結轉移，最大直徑小於6公分。
6. N3：淋巴結最大直徑大於6公分。

三、遠端轉移情形：

1. M0：沒有遠端轉移情形。
2. M1：遠端轉移。

依照上述分類再將腫瘤分期：

Stage I：T1，且沒有任何淋巴結或遠端轉移。

Stage II：T2，且沒有任何淋巴結或遠端轉移。

Stage III：T3或是T1N1、T2N1、T3N1，且沒有遠端轉移的情形。

Stage IVa：T4或是T1N2、T2N2、T3N2、T4N2，且沒有遠端轉移的情形。

Stage IVb：T1N3、T2N3、T3N3、T4N3，且沒有遠端轉移的情形。

Stage IVc：遠端轉移(M1)。

由於研究樣本數較少，因此又將Stage I及Stage II歸為early stage，Stage II及Stage IV歸為late stage。每個病人分別記錄口腔癌發生的部位、年齡、腫瘤分期以及是否有抽菸、喝酒、嚼食檳榔的習慣(表一)。

第二節、口腔鱗狀上皮細胞癌病患腫瘤組織及非腫瘤組織之DNA及RNA萃取

口腔鱗狀上皮細胞癌組織藉由無菌刀片自手術切下的腫瘤檢體中央表面部分，切下約0.5立方公分大小之腫瘤組織；同樣以無菌技術切下0.5立方公分大小的非腫瘤組織。一邊以液態氮保持低溫狀態一邊磨碎，之後用phenol-chloroform方法萃取出total RNA，利用電泳跑膠確定RNA的品質後再用光譜分析儀(Ultrospec 330 pro, Amersham Bioscience)定量。在萃取RNA的同時也會萃取出細菌DNA。

第三節、RNA之反轉錄

取2 µg RNA以RQ1 DNaseI (Promega) 在室溫下作用15分鐘，去除DNA污染，以oligo(dT)作為primer，於65°C下作用5分鐘，使primer附著在RNA上，再加入M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)於37°C下作用1小時進行反轉錄的工作，最後於95°C下作用5分鐘，讓酵素停止作用，反轉錄出來的cDNA儲存在-20°C的冰

箱中。

第四節、細菌DNA之聚合酶鏈鎖反應

利用聚合酶鏈鎖反應來放大細菌的DNA片段，反應試劑包括：

DNA template	2 μ l
10X PCR buffer	10 μ l
dNTPs	8 μ l
Forward digoxigeninlabeled primer (20 μ M) (Digoxigenin-AGAGTTTGATYMTGGC)	2 μ l
Reverse primer (20 μ M) (GYTACCTTGTTACGACTT)	2 μ l
Pro taq polymerase	0.5 μ l
ddH ₂ O	75.5 μ l

利用Mini CyclerTM(MJ Research)機器設定反應條件如下

1. 94°C 三分鐘
2. 94°C 一分鐘
3. 50°C 一分鐘
4. 72°C 一分鐘
5. 回到第二個步驟並重覆34個循環
6. 72°C 十分鐘
7. 4°C 保存

接著製備混合TBE的2% AGAROSE B Low EEO (Bio Basic Inc.)，利用電泳分析聚合酶鏈鎖反應產物，產物大小為1.5 kb。

預計將與日本研究室合作，利用同步定量聚合酶鏈鎖反應，進一步去區分出

各種菌種在口腔鱗狀上皮細胞癌的比例。

第五節、同步定量聚合酶連鎖反應(real-time PCR, RT-PCR)

利用Primer express v3.0設計實驗所需之引子(primer)，包含發炎前細胞激素及趨化激素(IL-1 β 、IL-6、CXCL-9、TNF- α)、調節型T細胞相關激素及趨化激素(IL-10、TGF- β 、Foxp3、B7-H1、CCL-21、CCL-22)、Th17相關激素(IL-17、IL-22、IL-23)、單核球及巨噬細胞相關激素及趨化激素(B7-DC、IL-4、GM-CSF、CCL-2、CCL-7)以及Th1相關細胞激素(IFN- γ)，各種細胞激素及分子的引子詳見表二。反應試劑包括：

cDNA template	2 μ l
Cytokine primer F (10 μ M)	1 μ l
Cytokine primer R (10 μ M)	1 μ l
POWER SYBER GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystem)	12.5 μ l
ddH2O	9.5 μ l

於Applied Biosystem 7500 system中進行同步定量聚合酶連鎖反應，SYBER GREEN試劑含有螢光，cDNA產物越多，其螢光表現量越強，當機器測得螢光表現的那一個循環以Ct值表示。

第六節、結果分析

以GAPDH的Ct值為基準，計算不同細胞激素和趨化激素的相對表現倍數(Relative expression = 2^{-dCt})，再依照我們想看的不同結果分為以下幾組來做比較。

- (一) 比較全部口腔癌腫瘤組織和全部非腫瘤組織內細胞激素表現量，以圖表顯示結果，並利用Mann-Whitney test統計各種激素的表現量在腫瘤及

非腫瘤組織間是否有統計上的差異。

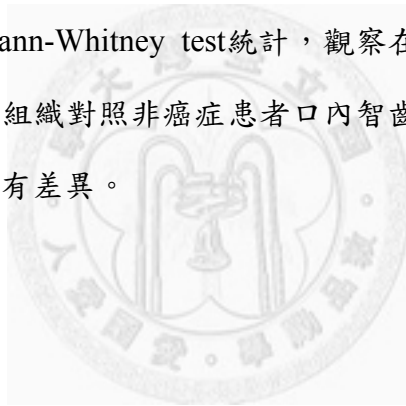
(二) 在腫瘤組織內細胞激素的表現量，以Mann-Whitney test來統計這些細胞激素的表現量在癌症早期及晚期是否有顯著差異；以Kruskal-Wallis test來統計在不同腫瘤部位，各種激素的表現量是否有顯著差異。接著依照各種激素的功能，分成Treg相關、Th17相關、單核球及巨噬細胞相關細胞激素以及趨化激素等四組。

1. Treg相關激素及分子：包括IL-10、TGF- β 、Foxp3、B7-H1、CCL-21、CCL-22，以Foxp3為主軸，計算Foxp3和其他激素的相關係數(Correlation coefficient)，探討Foxp3的表現量是否和趨化、刺激Treg的激素以及Treg分泌的激素有正相關性。
2. Th17相關激素：包括IL-17A、IL-22、IL-23、IL-1 β 、IL-6，計算IL-23和IL-17A，以及IL-23和IL-22的相關係數，觀察IL-23是否和Th17分泌的激素有正相關性；計算IL-17A和IL-1 β ，以及IL-17A和IL-6的相關係數，觀察Th17維持和增生相關的激素是否和IL-17A的分泌呈正相關。
3. 單核球及巨噬細胞相關激素及分子：包括B7-DC、IL-4、GM-CSF、CCL-2、CCL-7、IL-6及IFN- γ ，計算CCL-2和B7-DC、GM-CSF，以及CCL-7和B7-DC、GM-CSF，IL-6和B7-DC、IL-6和GM-CSF，IL-4和GM-CSF、IFN- γ 和GM-CSF的相關性，觀察吸引單核球的趨化激素是否和刺激巨噬細胞分化的激素呈現正相關，以及刺激巨噬細胞走向成M1或M2的相關激素和刺激巨噬細胞分化的激素是否有相關性。
4. 趨化激素：將前三組當中的趨化激素獨立出來，包括CXCL-9、CCL-21、CCL-22、CCL-2、CCL-7，計算彼此間的相關係數，觀察各種趨化激素的表現是否會相互影響。

5. 計算Foxp3和IL-17表現量的相關係數，兩者功能上呈現相反性質，觀察是否呈現負相關。

(三) 依照病灶的部位，以圖表顯示出各種激素的表現量，其中一組將來自牙齦癌腫瘤組織和智齒周圍牙齦組織的結果相互比較，另一組將來自頰黏膜癌組織和非腫瘤頰黏膜組織的結果相互比較，兩組再分別以Mann-Whitney test統計各種激素的表現量在腫瘤及非腫瘤組織間是否有統計上的顯著差異，以及在癌症早期和晚期的表現量是否有顯著差異。

(四) 比較來自非腫瘤頰黏膜組織及智齒周圍牙齦組織的激素表現量結果，利用圖形及Mann-Whitney test統計，觀察在口腔癌患者口中非腫瘤組織及癌和病變組織對照非癌症患者口內智齒周圍牙齦組織當中，激素的表現量是否有差異。



第三章、結果

一、細菌DNA聚合酶鏈鎖反應之結果

目前已收集9位口腔鱗狀上皮細胞癌患者的腫瘤組織(n=9)及鄰近非腫瘤黏膜組織(n=1)，發現無論是在腫瘤或是非腫瘤組織當中都有細菌16S rDNA的表現(圖一)，顯示出腫瘤及非腫瘤組織都有細菌的存在，而這些細菌可能就是造成發炎感染的來源。但由於尚未進一步分出不同的菌種，所以不能推論在腫瘤組織和非腫瘤中，菌種的分布是否不同，以及不同的細菌是否會影響腫瘤中各種細胞激素的表現量。

二、口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

本實驗中，口腔癌組織樣本有16例，非腫瘤組織樣本有4例，將RT-PCR結果平均後，以圖表顯示比較後結果(圖二)，並以Mann-Whitney test統計是否有差異(表三)。圖形及統計結果顯示，IL-1 β (p=0.018)、TNF- α (p=0.008)、IL-6 (p=0.018)、TGF- β (p=0.03)和CCL-7 (p=0.012)在腫瘤組織當中有顯著上升，而CXCL-9、CCL-22、IL-10、B7-H1、IL-23、B7-DC、CCL-2和IFN- γ 在腫瘤組織中表現量較非腫瘤組織高，但未達到統計意義；另外CCL-21 (p=0.023)、Foxp3 (p=0.038)和 IL-17 (p=0.028)在非腫瘤組織中的表現量高於腫瘤組織，且達到顯著差異，而IL-22、IL-4和GM-CSF也是在非腫瘤組織內表現較高，但未達到顯著差異。

三、口腔癌腫瘤內各種激素表現量之間的相關性以及對應臨床病理分期結果

本實驗中共有16例口腔癌腫瘤組織，以Mann-Whitney test統計在早期和晚期癌症組織中，各種激素的表現量是否有差異；以Kruskal-Wallis test來統計在不同腫瘤部位的表現量是否有顯著差異(表四)。結果顯示，無論在癌症早期、晚期或是腫瘤發生部位，各種激素的表現量都沒有達到統計上的顯著差異。

接著將細胞激素和趨化激素依其功能分成四個組別，再各自比較四組當中各

種激素表現量的相關性。

(一) Treg相關激素及分子(表五)：

以調控Treg發育及功能的轉錄因子Foxp3為主軸，分別與CCL-21、CCL-22、IL-10、TGF- β 和B7-H1計算彼此之間的相關係數(Correlation coefficient)。結果顯示Foxp3和IL-10之間有中度正相關性($r=0.637$)(圖三)；而Foxp3和CCL-21、CCL-22、TGF- β 、B7-H1之間的相關係數分別是0.103、0.023、0.017、-0.116，呈低度相關，且未達到統計上的顯著意義。

(二) Th17相關激素(表五)：

由於IL-23能誘導Th17進一步發育和增生，增加IL-17A和IL-22的表現量，因此計算IL-23和IL-17A以及IL-23和IL-22間的相關係數，觀察是否呈正相關，結果顯示，IL-23和IL-17A之間相關係數為0.302，呈中度相關(圖四)，而IL-23和IL-22之間相關係數為-0.026，相關性極低。另外，先前研究指出IL-6能誘導Th17的發育，IL-1 β 和Th17的維持、增生和晚期分化有關，而且當IL-17A和其受器IL-17R連接後常會促使許多發炎前激素的分泌，包括IL-6和IL-1 β ，因此計算IL-17A和IL-6、IL-1 β 間的相關係數，觀察三者表現量是否有呈現正相關性。結果顯示IL-17A和IL-6間相關係數為0.148，IL-17A和IL-1 β 間相關係數為0.239，皆呈低度相關。

(三) 單核球及巨噬細胞相關激素及分子(表五)：

將吸引單核球的趨化激素CCL-2及CCL-7及細胞激素IL-6，分別和刺激單核球分化為巨噬細胞的GM-CSF，以及和免疫抑制相關的共同抑制分子B7-DC的表現量做相關性比較。結果顯示CCL-2和B7-DC間的相關係數為0.758，呈高度相關，CCL-2和GM-CSF間則是0.356，呈中度相關(圖五)；CCL-7和B7-DC間相關係數為0.056，相關性極低，而CCL-7

和GM-CSF間相關係數為0.273，呈低度相關；IL-6和B7-DC間相關係數為0.284，呈低度相關，而IL-6和GM-CSF間相關係數為0.043，幾乎沒有相關性。另外IFN- γ 能刺激巨噬細胞走向M1抗腫瘤的免疫作用，IL-4能刺激巨噬細胞走向M2刺激腫瘤增生的作用，統計兩者和GM-CSF間的相關性，結果顯示IL-4和GM-CSF間相關係數為0.329，IFN- γ 和GM-CSF間相關係數為0.556，皆為中度相關(圖五)。

(四) 趨化激素(表五)：

將各組之中的趨化激素獨立出來，計算彼此之間的相關係數，觀察不同細胞的趨化激素之間是否有相關性。結果顯示CCL-22和CCL-7之間相關係數為0.508，CXCL-9和CCL-2之間相關係數為0.321，呈中度正相關(圖六)；CCL-2和CCL-7之間為0.214，CXCL-9和CCL-22間相關係數為0.179，呈低度正相關；CCL-21和CCL-22間相關係數為-0.245，呈低度負相關；CCL-2和CCL-21 ($r=0.076$)、CCL-7和CCL-21 ($r=-0.076$)、CXCL-9和CCL-7 ($r=0.059$)、CCL-22和CCL-2 ($r=0.008$)之間幾乎沒有相關性。

(五) 計算Foxp3和IL-17表現量的相關係數，結果顯示為-0.129，為低度負相關(圖七)。

四、頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤之頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

本實驗中，頰黏膜癌組織樣本3例，非腫瘤頰黏膜組織樣本3例，當中有兩位是口腔癌患者口內對側非腫瘤之頰黏膜組織，一位是鱗狀上皮增生。將RT-PCR結果平均後，以圖表顯示比較後結果(圖八)，並以Mann-Whitney test統計是否有差異(表六)。圖形及統計結果顯示，IL-10 ($p=0.05$)和TGF- β ($p=0.05$)在腫瘤內有的表現量上升，且達到顯著差異，而IL-1 β 、TNF- α 、CXCL-9、IL-6、CCL-22、B7-H1、IL-23、B7-DC、CCL-2、CCL-7和IFN- γ 在腫瘤當中表現量也較非腫瘤組織高，但

未達到顯著差異；另外CCL-21 ($p=0.05$)和Foxp3 ($p=0.05$)在非腫瘤組織內表現量有顯著上升，達到統計上意義，而IL-17A、IL-22、GM-CSF和IL-4也是在非腫瘤組織之中表現量較高，但未達到顯著差異。

五、牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

本實驗中，頰黏膜癌組織樣本7例，智齒周圍牙齦組織樣本1例，將RT-PCR結果平均後，以圖表顯示比較後結果(圖九)，並以Mann-Whitney test統計是否有差異(表七)。圖形及統計結果顯示，IL-1 β 、TNF- α 、CXCL-9、IL-6、CCL-22、IL-10、TGF- β 、B7-H1、IL-22、IL-23、B7-DC、GM-CSF、CCL-2、CCL-7和IFN- γ 在腫瘤當中表現量較非腫瘤組織高，但未達到顯著差異；CCL-21、IL-17A和IL-4在非腫瘤牙齦組織之中表現量較高，但未達到顯著差異。

六、非腫瘤之頰黏膜組織 及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

比較來自非腫瘤頰黏膜組織($n=3$)及智齒周圍牙齦組織($n=1$)的激素表現量，將RT-PCR結果平均後，利用圖形顯示比較後結果(圖十)，及以Mann-Whitney test統計激素的表現量是否有差異(表八)。結果顯示在非腫瘤頰黏膜組織當中，CXCL-9、CCL-21、CCL-22、IL-10、Foxp3、B7-H1、IL-17A、IL-22、IL-23、B7-DC、IL-4、GM-CSF、CCL-2、CCL-7和IFN- γ 的表現量高於智齒周圍牙齦組織；而IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 則是在智齒周圍牙齦組織表現量較非腫瘤頰黏膜組織高，以上的結果都沒有達到統計上顯著差異。

第四章 討論

一、口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

在先前的口腔癌研究當中指出，TNF- α 、IL-6、IL-8和IL-10的基因有高度表現之現象(Vairaktaris et al. 2008)，而本實驗結果顯示IL-1 β (p=0.018)、TNF- α (p=0.008)、IL-6 (p=0.018)、TGF- β (p=0.03)和CCL-7 (p=0.012)在腫瘤組織當中有顯著上升，其中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6三者急性發炎時常會同時升高，刺激骨髓釋放更多嗜中性球，吸引更多發炎相關細胞來到發炎部位並誘導其成熟，啟動接下來的後天免疫系統。TGF- β 則是和調節性T細胞有關，其具有免疫抑制的功能；CCL-7則是一種單核球趨化激素，可以吸引更多單核球至腫瘤部位，進一步分化為巨噬細胞。這些發炎前激素及趨化激素能吸引更多發炎相關細胞進入腫瘤微環境中，使腫瘤微環境中的發炎反應更加嚴重，釋放出更多激素來刺激腫瘤的生長。

CCL-21 (p=0.023)、Foxp3 (p=0.038)和IL-17A (p=0.028)在非腫瘤組織中的表現量高於腫瘤組織。CCL-21能使樹突細胞及淋巴球包圍在腫瘤周圍，有些學者提出這樣可以提高對腫瘤專一抗原的反應，增強抗腫瘤免疫反應(Willimann et al. 1998; Sharma et al. 2000)；另一派學者發現環繞在腫瘤周圍的樹突細胞並不會增加腫瘤專一性抗原的表現來刺激T細胞活化(Riedl et al. 2003)，甚至吸引過來的樹突細胞表現出免疫耐受性，降低抗腫瘤反應(Shields et al. 2010)，因此本實驗中CCL-21在非腫瘤組織中高度表現所代表的意義尚未明確。在非癌症組織中高度表現的IL-17A可促進嗜中性球的生成、遷移和聚集，加速清除細胞外細菌(Fossiez et al. 1998; Jovanovic et al. 1998; Schwarzenberger et al. 2000)；而轉錄因子Foxp3和Treg的發育及功能相當重要，可藉由Treg免疫抑制的功能來降低非腫瘤組織內的發炎反應(Takahashi et al. 1998; Thornton and Shevach 1998)。

二、口腔癌腫瘤內各種激素表現量之間的相關性以及對應臨床病理分期結果

本實驗結果顯示，無論在癌症早期、晚期或是腫瘤發生部位，各種激素的表

現量都沒有達到統計上的顯著差異，可能是由於實驗樣本數過少，所以無法達到統計意義。

依照功能分成的四組激素之間表現量的相關性顯示，在Treg相關激素當中，Foxp3和IL-10的相關係數達到0.637，為中度正相關。研究指出在許多癌症，包括頭頸部癌症患者的周邊血液當中，Treg的量比健康人的周邊血液高出許多，在許多癌症的腫瘤環境中發現有大量的Treg浸潤。在正常發炎環境下，Treg可以分泌IL-10來抑制T細胞(Asseman *et al.* 1999)，避免過度發炎或是自體免疫情況發生；在腫瘤微環境中，Treg可以抑制毒殺性T細胞及NK細胞的抗腫瘤免疫作用(Ho *et al.* 2002; Azuma *et al.* 2003; Albers *et al.* 2005; Nishikawa *et al.* 2005)，因此被認為和癌症的發展及較差的預後有關。

在Th17相關激素當中，IL-23和IL-17A相關係數為0.302，為中度正相關。IL23能刺激Th17的成熟，增加IL-17A的表現，在許多腫瘤當中Th17相關的細胞激素的表現量都會上升，雖然IL-17可以刺激嗜中性球、消滅細胞外的細菌，以及誘導樹突細胞成熟、吸引巨噬細胞及活化NK細胞來增加抗腫瘤的能力(Antonysamy *et al.* 1999)，但同時IL-17也會促使各種細胞激素的分泌，使發炎情況更加嚴重。

在巨噬細胞相關激素當中，CCL-2和B7-DC間相關係數高達0.758，為高度正相關，CCL-2和GM-CSF間相關係數為0.356，達到中度正相關。CCL-2是單核球的趨化激素，能吸引單核球至腫瘤區域；而GM-CSF能誘導單核球轉變為巨噬細胞，B7-DC則是表現於樹突細胞的表面蛋白，會活化免疫抑制的myeloid-derived suppressor cell。巨噬細胞分為M1和M2兩種型態，IFN- γ 會使巨噬細胞趨向M1型態，具有抗腫瘤的能力；IL-4和IL-13會使巨噬細胞趨向M2型態，促進腫瘤的生長(Gordon 2003)。在許多腫瘤的生成過程中發現，腫瘤發生前存在的巨噬細胞偏向屬於活化型(Gordon 2003)，也就是M1；一旦腫瘤開始發展，這些巨噬細胞會轉變為發炎型，具有M2及trophic表現型的特性，促進組織生成(Pollard 2004; Pollard 2009)。本實驗結果顯示，IL-4和GM-CSF的相關係數為0.329，而IFN- γ 和GM-CSF

的相關係數為0.556，顯示在口腔癌環境中，巨噬細胞似乎是偏向M1表現型。但是在研究中發現，IL-4的表現量極低，幾乎是偵測不到，因此可能在組織當中，IL-4的表現量就很低，也許稍微提升表現量就可以促使巨噬細胞走向M2表現型，因此不能排除這個可能性。

在各種趨化激素中，CXCL-9和CCL-2的相關係數為0.321，達到中度正相關。CXCL-9屬於發炎前趨化激素，能吸引表現CXCR3的淋巴球，幫助後天免疫反應的產生；而生長中的腫瘤可以產生CCL-2來吸引血液中的單核球聚集。腫瘤微環境中淋巴球的聚集可能會促進發炎反應，使腫瘤釋放更多的CCL-2。另外CCL-22和CCL-7的相關性達到0.508，在人類卵巢癌當中發現，巨噬細胞能分泌CCL-22，吸引調節型T細胞過來，抑制細胞毒殺T細胞的作用(Curiel *et al.* 2004)。

Foxp3和IL-17表現量的相關係數為-0.129，呈低度負相關，和先前學長姊做的實驗結果相同，這是由於Treg和Th17兩者功能上呈現相反性質。Treg主要功能為抑制T細胞的功能，降低免疫反應；Th17能刺激許多細胞分泌發炎前激素，促進發炎反應，和過度發炎及自體免疫有關。

三、頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤之頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

本實驗結果顯示，IL-10 ($p=0.05$)和TGF- β ($p=0.05$)在腫瘤內有的表現量上升，且達到顯著差異，而CCL-21 ($p=0.05$)和Foxp3 ($p=0.05$)則是在非腫瘤組織內表現量有顯著上升。Treg能分泌或是刺激抗原呈現細胞分泌IL-10和TGF- β ，兩者皆為抑制性細胞激素，有學者指出，Treg可能會優先移動到腫瘤組織當中，並且聚集(Albers *et al.* 2005)，腫瘤當中的調節型T細胞可以透過分泌TGF- β 來抑制CD8⁺ T細胞的毒殺作用，降低抗腫瘤的反應(Zou 2005)。Foxp3在非腫瘤之頰黏膜組織表現量較高，可能是藉由Treg免疫抑制的功能來降低非腫瘤組織內的發炎反應(Takahashi *et al.* 1998; Thornton and Shevach 1998)；而CCL-21在這裡所代表的意義尚未明確。

四、牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

本實驗結果顯示IL-1 β 、TNF- α 、CXCL-9、IL-6、CCL-22、IL-10、TGF- β 、B7-H1、IL-22、IL-23、B7-DC、GM-CSF、CCL-2、CCL-7和IFN- γ 在腫瘤當中表現量較非腫瘤組織高，但未達到顯著差異，顯示出發炎前激素和巨噬細胞相關激素在腫瘤組織當中表現量較高，可能是藉由吸引各種發炎相關細胞以及巨噬細胞來促進發炎反應及腫瘤的生長。

五、非腫瘤之頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

由於頰黏膜組織的來源並非來自於正常患者，其中兩位是口腔癌患者的對側非腫瘤頰黏膜組織，依照field cancerization理論，這些部位也許都有變異；另一位患者是鱗狀上皮增生，屬於癌前變化之一。因此本實驗將非腫瘤頰黏膜組織歸為癌前病變組織，智齒周圍牙齦組織為正常發炎組織。結果顯示在非腫瘤頰黏膜組織當中，CXCL-9、CCL-21、CCL-22、IL-10、Foxp3、B7-H1、IL-17A、IL-22、IL-23、B7-DC、IL-4、GM-CSF、CCL-2、CCL-7和IFN- γ 的表現量高於智齒周圍牙齦組織；而IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、TGF- β 則是在智齒周圍牙齦組織表現量較非腫瘤頰黏膜組織高，以上的結果都沒有達到統計上顯著差異。正常發炎組織當中，IL-1 β 、TNF- α 和IL-6提高，顯示處於急性發炎期，能刺激骨髓釋放更多嗜中性球，吸引更多發炎相關細胞來到發炎部位並誘導其成熟，啟動接下來的後天免疫系統。可能在正常發炎組織中，急性發炎反應佔優勢，以吞噬作用及細胞毒殺作用為主，而在癌前病變組織中以慢性發炎反應為主，長期的慢性發炎誘使腫瘤的發生及促進腫瘤的生長。

六、結論

口腔癌組織當中發炎前激素、免疫抑制激素、巨噬細胞相關激素，以及B7家

族分子的表現量都高於非癌症組織，顯示出發炎的嚴重性、T細胞的活化受到抑制以及巨噬細胞的存在會促進腫瘤的生長。在正常發炎組織中，急性發炎反應佔優勢，以吞噬作用及細胞毒殺作用為主，而在癌前病變組織中，可能以慢性發炎反應為主，長期的慢性發炎誘使腫瘤的發生及促進腫瘤的生長。



第六章、参考文献

- Aarvak, T., M. Chabaud, et al. (1999). "Change in the Th1/Th2 phenotype of memory T-cell clones from rheumatoid arthritis synovium." *Scand J Immunol* 50(1): 1-9.
- Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, et al. (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." *Nat Immunol* 8(9): 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat Immunol* 8(6): 639-646.
- Aggarwal, S., N. Ghilardi, et al. (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." *J Biol Chem* 278(3): 1910-1914.
- Albers, A. E., R. L. Ferris, et al. (2005). "Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites." *Cancer Immunol Immunother* 54(11): 1072-1081.
- Alhamarneh, O., S. M. Amarnath, et al. (2008). "Regulatory T cells: what role do they play in antitumor immunity in patients with head and neck cancer?" *Head Neck* 30(2): 251-261.
- Antonysamy, M. A., W. C. Fanslow, et al. (1999). "Evidence for a role of IL-17 in alloimmunity: a novel IL-17 antagonist promotes heart graft survival." *Transplant Proc* 31(1-2): 93.
- Antonysamy, M. A., W. C. Fanslow, et al. (1999). "Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors." *J Immunol* 162(1): 577-584.
- Asseman, C., S. Mauze, et al. (1999). "An essential role for interleukin 10 in the

- function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation." *J Exp Med* 190(7): 995-1004.
- Attur, M. G., R. N. Patel, et al. (1997). "Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage." *Arthritis Rheum* 40(6): 1050-1053.
- Azuma, T., T. Takahashi, et al. (2003). "Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions." *Cancer Res* 63(15): 4516-4520.
- Bailey, C., R. Negus, et al. (2007). "Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer." *Clin Exp Metastasis* 24(2): 121-130.
- Barnich, N., J. Denizot, et al. (2010). "E. coli-mediated gut inflammation in genetically predisposed Crohn's disease patients." *Pathol Biol (Paris)*.
- Barthold, S. W. and A. M. Jonas (1977). "Morphogenesis of early 1, 2-dimethylhydrazine-induced lesions and latent period reduction of colon carcinogenesis in mice by a variant of *Citrobacter freundii*." *Cancer Res* 37(12): 4352-4360.
- Bates, G. J., S. B. Fox, et al. (2006). "Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse." *J Clin Oncol* 24(34): 5373-5380.
- Blaser, M. J., G. I. Perez-Perez, et al. (1995). "Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach." *Cancer Res* 55(10): 2111-2115.
- Broere, F., M. F. du Pre, et al. (2009). "Cyclooxygenase-2 in mucosal DC mediates induction of regulatory T cells in the intestine through suppression of IL-4." *Mucosal Immunol* 2(3): 254-264.

- Castello, G., S. Scala, et al. (2010). "HCV-related hepatocellular carcinoma: From chronic inflammation to cancer." *Clinical Immunology* 134(3): 237-250.
- Chen, W., X. Liang, et al. (2008). "The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation." *J Immunol* 181(8): 5396-5404.
- Chung, D. R., D. L. Kasper, et al. (2003). "CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism." *J Immunol* 170(4): 1958-1963.
- Condeelis, J. and J. W. Pollard (2006). "Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis." *Cell* 124(2): 263-266.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." *Nature* 420(6917): 860-867.
- Ciree, A., L. Michel, et al. (2004). "Expression and activity of IL-17 in cutaneous T-cell lymphomas (mycosis fungoides and Sezary syndrome)." *Int J Cancer* 112(1): 113-120.
- Curiel, T. J., G. Coukos, 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.
- Delima, A. J., S. Karatzas, et al. (2002). "Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists." *J Infect Dis* 186(4): 511-516.
- Dubin, P. J. and J. K. Kolls (2007). "IL-23 mediates inflammatory responses to mucoid *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in mice." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(2): L519-528.
- Eaden, J. A., K. R. Abrams, et al. (2001). "The risk of colorectal cancer in ulcerative

- colitis: a meta-analysis." *Gut* 48(4): 526-535.
- Ellmerich, S., M. Scholler, et al. (2000). "Promotion of intestinal carcinogenesis by *Streptococcus bovis*." *Carcinogenesis* 21(4): 753-756.
- Erdman, S. E., P. Correa, et al. (1997). "Helicobacter mustelae-associated gastric MALT lymphoma in ferrets." *Am J Pathol* 151(1): 273-280.
- Fiorentini, C., P. Matarrese, et al. (1998). "Toxin-induced activation of Rho GTP-binding protein increases Bcl-2 expression and influences mitochondrial homeostasis." *Exp Cell Res* 242(1): 341-350.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* 4(4): 330-336.
- Fossiez, F., J. Banchereau, et al. (1998). "Interleukin-17." *Int Rev Immunol* 16(5-6): 541-551.
- Fujiki, H., H. Takeuchi, et al. (2004). "Carcinogenic potential of tobacco tar-resistant *Staphylococcus aureus* in buccal cavity." *J Cancer Res Clin Oncol* 130(5): 301-305.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." *Nat Rev Immunol* 3(1): 23-35.
- Grivennikov, S., E. Karin, et al. (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." *Cancer Cell* 15(2): 103-113.
- Groblewska, M., B. Mroczko, et al. (2007). "Serum levels of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in pancreatic cancer patients." *Clin Chem Lab Med* 45(1): 30-34.
- Grossman, R. M., J. Krueger, et al. (1989). "Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes."

- Proc Natl Acad Sci U S A 86(16): 6367-6371.
- Hamada, S. and H. D. Slade (1980). "Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*." *Microbiol Rev* 44(2): 331-384.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* 6(11): 1123-1132.
- Henderson, B., M. Wilson, et al. (1998). "Cellular microbiology: cycling into the millennium." *Trends Cell Biol* 8(10): 384-387.
- Hirano, T., K. Ishihara, et al. (2000). "Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors." *Oncogene* 19(21): 2548-2556.
- Hirata, Y., S. Maeda, et al. (2001). "Helicobacter pylori activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells." *Infect Immun* 69(6): 3965-3971.
- Ho, E. L., L. N. Carayannopoulos, et al. (2002). "Costimulation of multiple NK cell activation receptors by NKG2D." *J Immunol* 169(7): 3667-3675.
- Honn, K. V., R. S. Bockman, et al. (1981). "Prostaglandins and cancer: a review of tumor initiation through tumor metastasis." *Prostaglandins* 21(5): 833-864.
- Hooper, S. J., S. J. Crean, et al. (2006). "Viable bacteria present within oral squamous cell carcinoma tissue." *J Clin Microbiol* 44(5): 1719-1725.
- Hooper, S. J., M. J. Wilson, et al. (2009). "Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature." *Head Neck* 31(9): 1228-1239.
- Infante-Duarte, C., H. F. Horton, et al. (2000). "Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells." *J Immunol* 165(11): 6107-6115.

- Ivanov, II, B. S. McKenzie, et al. (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells." *Cell* 126(6): 1121-1133.
- Jacquot, S. (2000). "CD27/CD70 interactions regulate T dependent B cell differentiation." *Immunol Res* 21(1): 23-30.
- Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, et al. (1998). "IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages." *J Immunol* 160(7): 3513-3521.
- Joyce, J. A. and J. W. Pollard (2009). "Microenvironmental regulation of metastasis." *Nat Rev Cancer* 9(4): 239-252.
- Karandikar, N. J., C. L. Vanderlugt, et al. (1996). "CTLA-4: a negative regulator of autoimmune disease." *J Exp Med* 184(2): 783-788.
- Karin, M., T. Lawrence, et al. (2006). "Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer." *Cell* 124(4): 823-835.
- Kempf, V. A., B. Volkmann, et al. (2001). "Evidence of a leading role for VEGF in Bartonella henselae-induced endothelial cell proliferations." *Cell Microbiol* 3(9): 623-632.
- Keshava, C., N. Keshava, et al. (1997). "Inhibition of methotrexate-induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells." *Teratog Carcinog Mutagen* 17(6): 313-326.
- Kiaris, H., I. Chatzistamou, et al. (2004). "Tumour-stroma interactions in carcinogenesis: basic aspects and perspectives." *Mol Cell Biochem* 261(1-2): 117-122.
- Kim, R., M. Emi, et al. (2005). "Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses." *Cancer Biol Ther* 4(9): 924-933.

- Korn, T., E. Bettelli, et al. (2007). "IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells." *Nature* 448(7152): 484-487.
- Krummel, M. F. and J. P. Allison (1996). "CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells." *J Exp Med* 183(6): 2533-2540.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (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.
- Kuang, D. M., Q. Zhao, et al. (2009). "Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1." *J Exp Med* 206(6): 1327-1337.
- Langowski, J. L., X. Zhang, et al. (2006). "IL-23 promotes tumour incidence and growth." *Nature* 442(7101): 461-465.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* 201(2): 233-240.
- Lax, A. J. and A. E. Grigoriadis (2001). "Pasteurella multocida toxin: the mitogenic toxin that stimulates signalling cascades to regulate growth and differentiation." *Int J Med Microbiol* 291(4): 261-268.
- Lax, A. J. and W. Thomas (2002). "How bacteria could cause cancer: one step at a time." *Trends in Microbiology* 10(6): 293-299.
- Lazennec, G. and A. Richmond (2010). "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." *Trends Mol Med* 16(3): 133-144.
- Le Gouvello, S., S. Bastuji-Garin, et al. (2008). "High prevalence of Foxp3 and IL17 in MMR-proficient colorectal carcinomas." *Gut* 57(6): 772-779.
- Leach, D. R., M. F. Krummel, et al. (1996). "Enhancement of antitumor immunity by

- CTLA-4 blockade." *Science* 271(5256): 1734-1736.
- Lin, E. Y., V. Gouon-Evans, et al. (2002). "The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(2): 147-162.
- Lin, E. Y., A. V. Nguyen, et al. (2001). "Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy." *J Exp Med* 193(6): 727-740.
- Lin, W. W. and M. Karin (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." *J Clin Invest* 117(5): 1175-1183.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, 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.
- Lu, C. F., C. S. Huang, et al. (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.
- Luhder, F., P. Hoglund, et al. (1998). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes." *J Exp Med* 187(3): 427-432.
- Luperchio, S. A. and D. B. Schauer (2001). "Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia." *Microbes Infect* 3(4): 333-340.
- Ma, H. L., S. Liang, et al. (2008). "IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation." *J Clin Invest* 118(2): 597-607.
- Macarthur, M., G. L. Hold, et al. (2004). "Inflammation and Cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of

- gastrointestinal malignancy." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286(4): G515-520.
- Maeno, N., H. Oda, et al. (1999). "Live *Bartonella henselae* enhances endothelial cell proliferation without direct contact." *Microb Pathog* 27(6): 419-427.
- Mantovani, A. and A. Sica (2010). "Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity." *Curr Opin Immunol* 22(2): 231-237.
- Matusevicius, D., P. Kivisakk, et al. (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." *Mult Scler* 5(2): 101-104.
- Meira, L. B., J. M. Bugni, et al. (2008). "DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice." *J Clin Invest* 118(7): 2516-2525.
- Mihara, J., Y. Miyazawa, et al. (1993). "Modulation of growth and function of human gingival fibroblasts by fibroblast-activating factor derived from *Porphyromonas gingivalis* W50." *Infect Immun* 61(2): 596-601.
- Montalban, C., A. Santon, et al. (2001). "Regression of gastric high grade mucosa associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication." *Gut* 49(4): 584-587.
- Morita, E., M. Narikiyo, et al. (2003). "Different frequencies of *Streptococcus anginosus* infection in oral cancer and esophageal cancer." *Cancer Sci* 94(6): 492-496.
- Moseley, T. A., D. R. Haudenschild, et al. (2003). "Interleukin-17 family and IL-17 receptors." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(2): 155-174.
- Mroczko, B., M. Groblewska, et al. (2007). "Serum macrophage-colony stimulating factor levels in colorectal cancer patients correlate with lymph node metastasis

- and poor prognosis." *Clin Chim Acta* 380(1-2): 208-212.
- Mueller, M. M. and N. E. Fusenig (2004). "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer* 4(11): 839-849.
- Muranski, P., A. Boni, et al. (2008). "Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma." *Blood* 112(2): 362-373.
- Muriglian, S. J., T. Ramirez-Montagut, et al. (2004). "GITR activation induces an opposite effect on alloreactive CD4(+) and CD8(+) T cells in graft-versus-host disease." *J Exp Med* 200(2): 149-157.
- Murphy, C. A., C. L. Langrish, et al. (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* 198(12): 1951-1957.
- Muto, M., Y. Hitomi, et al. (2000). "Acetaldehyde production by non-pathogenic *Neisseria* in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract." *Int J Cancer* 88(3): 342-350.
- Nagy, K. N., I. Sonkodi, et al. (1998). "The microflora associated with human oral carcinomas." *Oral Oncol* 34(4): 304-308.
- Nakae, S., Y. Komiyama, et al. (2002). "Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses." *Immunity* 17(3): 375-387.
- Nakamoto, Y., L. G. Guidotti, et al. (1998). "Immune pathogenesis of hepatocellular carcinoma." *J Exp Med* 188(2): 341-350.
- Narikiyo, M., C. Tanabe, et al. (2004). "Frequent and preferential infection of *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus anginosus* in esophageal cancers." *Cancer Sci* 95(7): 569-574.
- Nath, G., H. Singh, et al. (1997). "Chronic typhoid carriage and carcinoma of the

- gallbladder." *Eur J Cancer Prev* 6(6): 557-559.
- Naugler, W. E., T. Sakurai, et al. (2007). "Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production." *Science* 317(5834): 121-124.
- Ness, R. B. and C. Cottreau (1999). "Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer." *J Natl Cancer Inst* 91(17): 1459-1467.
- Newman, J. V., T. Kosaka, et al. (2001). "Bacterial infection promotes colon tumorigenesis in *Apc(Min/+)* mice." *J Infect Dis* 184(2): 227-230.
- Nishikawa, H., T. Kato, et al. (2005). "Definition of target antigens for naturally occurring CD4(+) CD25(+) regulatory T cells." *J Exp Med* 201(5): 681-686.
- Nurieva, R., X. O. Yang, et al. (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." *Nature* 448(7152): 480-483.
- Ojalvo, L. S., W. King, et al. (2009). "High-density gene expression analysis of tumor-associated macrophages from mouse mammary tumors." *Am J Pathol* 174(3): 1048-1064.
- Ojalvo, L. S., C. A. Whittaker, et al. (2010). "Gene expression analysis of macrophages that facilitate tumor invasion supports a role for Wnt-signaling in mediating their activity in primary mammary tumors." *J Immunol* 184(2): 702-712.
- Oyama, N., K. Iwatsuki, et al. (1999). "Induction of transcription factor AP-2 by inflammatory cytokines in human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 113(4): 600-606.
- Pagano, J. S., M. Blaser, et al. (2004). "Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation." *Semin Cancer Biol* 14(6): 453-471.
- Pang, B., X. Zhou, et al. (2007). "Lipid peroxidation dominates the chemistry of DNA adduct formation in a mouse model of inflammation." *Carcinogenesis* 28(8): 1807-1813.

- Parsonnet, J., G. D. Friedman, et al. (1991). "Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma." *N Engl J Med* 325(16): 1127-1131.
- Perez, V. L., L. Van Parijs, et al. (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." *Immunity* 6(4): 411-417.
- Perrin, P. J., J. H. Maldonado, et al. (1996). "CTLA-4 blockade enhances clinical disease and cytokine production during experimental allergic encephalomyelitis." *J Immunol* 157(4): 1333-1336.
- Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." *Nat Rev Cancer* 4(1): 71-78.
- Pollard, J. W. (2009). "Trophic macrophages in development and disease." *Nat Rev Immunol* 9(4): 259-270.
- Powrie, F., J. Carlino, et al. (1996). "A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells." *J Exp Med* 183(6): 2669-2674.
- Pullinger, G. D., R. Sowdhamini, et al. (2001). "Localization of functional domains of the mitogenic toxin of *Pasteurella multocida*." *Infect Immun* 69(12): 7839-7850.
- Putnins, E. E., A. R. Sanaie, et al. (2002). "Induction of keratinocyte growth factor 1 Expression by lipopolysaccharide is regulated by CD-14 and toll-like receptors 2 and 4." *Infect Immun* 70(12): 6541-6548.
- Riedl, K., F. Baratelli, et al. (2003). "Overexpression of CCL-21/secondary lymphoid tissue chemokine in human dendritic cells augments chemotactic activities for lymphocytes and antigen presenting cells." *Mol Cancer* 2: 35.
- Rippere-Lampe, K. E., M. Lang, et al. (2001). "Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model." *Infect Immun* 69(10): 6515-6519.

- Romano, G., A. Sgambato, et al. (2000). "8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in cervical cells: correlation with grade of dysplasia and human papillomavirus infection." *Carcinogenesis* 21(6): 1143-1147.
- Saji, H., M. Koike, et al. (2001). "Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma." *Cancer* 92(5): 1085-1091.
- 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., N. Sakaguchi, et al. (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.
- Sapi, E. and B. M. Kacinski (1999). "The role of CSF-1 in normal and neoplastic breast physiology." *Proc Soc Exp Biol Med* 220(1): 1-8.
- Sappayatosok, K., Y. Maneerat, et al. (2009). "Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation." *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 14(7): E319-324.
- Sasaki, H., H. Igaki, et al. (1995). "Presence of Streptococcus DNA sequence in surgical specimens of gastric cancer." *Jpn J Cancer Res* 86(9): 791-794.
- Sasaki, H., T. Ishizuka, et al. (1998). "Presence of Streptococcus anginosus DNA in esophageal cancer, dysplasia of esophagus, and gastric cancer." *Cancer Res* 58(14): 2991-2995.
- Sasaki, M., C. Yamaura, et al. (2005). "Streptococcus anginosus infection in oral cancer

- and its infection route." *Oral Dis* 11(3): 151-156.
- Schwarzenberger, P., W. Huang, et al. (2000). "Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis." *J Immunol* 164(9): 4783-4789.
- Scott, K. and C. Weinberg (2004). "Galectin-1: a bifunctional regulator of cellular proliferation." *Glycoconj J* 19(7-9): 467-477.
- Shacter, E. and S. A. Weitzman (2002). "Chronic inflammation and cancer." *Oncology (Williston Park)* 16(2): 217-226, 229; discussion 230-212.
- Sharma, S., M. Stolina, et al. (2000). "Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo." *J Immunol* 164(9): 4558-4563.
- Shields, J. D., I. C. Kourtis, et al. (2010). "Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21." *Science* 328(5979): 749-752.
- Shibata, K., H. Yamada, et al. (2007). "Resident Vdelta1+ gammadelta T cells control early infiltration of neutrophils after Escherichia coli infection via IL-17 production." *J Immunol* 178(7): 4466-4472.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, et al. (2002). "Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance." *Nat Immunol* 3(2): 135-142.
- Shukla, V. K., H. Singh, et al. (2000). "Carcinoma of the gallbladder--is it a sequel of typhoid?" *Dig Dis Sci* 45(5): 900-903.
- Somasundaram, R., L. Jacob, et al. (2002). "Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta." *Cancer Res* 62(18): 5267-5272.

- Steiner, G. E., M. E. Newman, et al. (2003). "Expression and function of pro-inflammatory interleukin IL-17 and IL-17 receptor in normal, benign hyperplastic, and malignant prostate." *Prostate* 56(3): 171-182.
- Stockinger, B. and M. Veldhoen (2007). "Differentiation and function of Th17 T cells." *Curr Opin Immunol* 19(3): 281-286.
- Strauss, L., C. Bergmann, et al. (2007). "The frequency and suppressor function of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in the circulation of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck." *Clin Cancer Res* 13(21): 6301-6311
- Sugano, N., K. Yokoyama, et al. (2003). "Detection of *Streptococcus anginosus* and 8-hydroxydeoxyguanosine in saliva." *J Oral Sci* 45(4): 181-184.
- Sutmuller, R. P., L. M. van Duivenvoorde, et al. (2001). "Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses." *J Exp Med* 194(6): 823-832.
- Sutton, C., C. Brereton, et al. (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.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, et al. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." *Int Immunol* 10(12): 1969-1980.
- Takemura, A., N. Matsuda, et al. (1998). "Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide modulates the responsiveness of human periodontal ligament fibroblasts to platelet-derived growth factor." *J Periodontal Res* 33(7): 400-407.
- Tanaka, K., J. Kurebayashi, et al. (2009). "The expression of monocyte chemotactic

- protein-1 in papillary thyroid carcinoma is correlated with lymph node metastasis and tumor recurrence." *Thyroid* 19(1): 21-25.
- Tateda, M., K. Shiga, et al. (2000). "Streptococcus anginosus in head and neck squamous cell carcinoma: implication in carcinogenesis." *Int J Mol Med* 6(6): 699-703.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." *J Exp Med* 188(2): 287-296.
- Thun, M. J., S. J. Henley, et al. (2004). "Inflammation and cancer: an epidemiological perspective." *Novartis Found Symp* 256: 6-21; discussion 22-28, 49-52, 266-269.
- Tlaskalova-Hogenova, H., R. Stepankova, et al. (2004). "Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases." *Immunol Lett* 93(2-3): 97-108.
- Tlsty, T. D. (2001). "Stromal cells can contribute oncogenic signals." *Semin Cancer Biol* 11(2): 97-104.
- Vairaktaris, E., C. Yapijakis, 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.
- Veldhoen, M., R. J. Hocking, et al. (2006). "Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease." *Nat Immunol* 7(11): 1151-1156.
- Voo, K. S., Y. H. Wang, et al. (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(12): 4793-4798.

- Waisberg, J., O. Matheus Cde, et al. (2002). "Infectious endocarditis from *Streptococcus bovis* associated with colonic carcinoma: case report and literature review." *Arq Gastroenterol* 39(3): 177-180.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, et al. (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* 183(6): 2541-2550.
- Watanabe, T., M. Tada, et al. (1998). "Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils." *Gastroenterology* 115(3): 642-648.
- Weitzman, S. A. and L. I. Gordon (1990). "Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis." *Blood* 76(4): 655-663.
- Welton, J. C., J. S. Marr, et al. (1979). "Association between hepatobiliary cancer and typhoid carrier state." *Lancet* 1(8120): 791-794.
- Willmann, K., D. F. Legler, et al. (1998). "The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7." *Eur J Immunol* 28(6): 2025-2034.
- Wilson, N. J., K. Boniface, et al. (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." *Nat Immunol* 8(9): 950-957.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, et al. (2001). "Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN-gamma, IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma." *Clin Exp Immunol* 125(2): 177-183.
- Wong, C. K., C. Y. Ho, et al. (2000). "Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus." *Lupus* 9(8): 589-593.
- Woo, E. Y., C. S. Chu, et al. (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.

- Wyckoff, J., W. Wang, et al. (2004). "A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors." *Cancer Res* 64(19): 7022-7029.
- Yao, Z., S. L. Painter, et al. (1995). "Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells." *J Immunol* 155(12): 5483-5486.
- Ye, P., P. B. Garvey, et al. (2001). "Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection." *Am J Respir Cell Mol Biol* 25(3): 335-340.
- Yoshidome, H., H. Kohno, et al. (2009). "Significance of monocyte chemoattractant protein-1 in angiogenesis and survival in colorectal liver metastases." *Int J Oncol* 34(4): 923-930.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." *Nat Rev Cancer* 4(10): 757-768.
- Zhang, B., G. Rong, et al. (2008). "The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer." *Biochem Biophys Res Commun* 374(3): 533-537.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, et al. (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." *Nature* 445(7128): 648-651.
- Zhou, G. and H. I. Levitsky (2007). "Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance." *J Immunol* 178(4): 2155-2162.
- Zhou, L., Ivanov, II, et al. (2007). "IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways." *Nat Immunol* 8(9): 967-974.
- Zhu, X. D., J. B. Zhang, et al. (2008). "High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor

survival after curative resection of hepatocellular carcinoma." J Clin Oncol 26(16): 2707-2716.

Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer 5(4): 263-274.

陳玟秀. (2007.) "口腔鏈球菌與口腔鱗狀細胞癌的關係與交互作用" 國立台灣大學醫學院臨床牙醫學研究所 碩士論文.



圖表

表一：樣本臨床病理資料

組之來源	分類			樣本數
癌症	Stage	早期	I	3
			II	5
		晚期	III	0
			IV	8
	T	1		3
		2		5
		3		0
		4		8
	N	0		15
		1		1
	M	0		16
	部位	頰側		3
牙齦		7		
舌		4		
上顎		2		
非癌症	部位	頰側	3	
		牙齦	1	
	酒	是	13	
		否	7	
	檳榔	是	11	
		否	9	
	菸	是	13	
		否	7	
	年齡	21-30		1
		31-40		0
		41-50		7
		51-60		8
		61-70		1
		71-80		3

表二：各種細胞激素及分子的引子(primer)

Name	Sequence	Product size
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	236
	GAAGATGGTGATGGGATTTC	
IL-1 β	TCAGCCAATCTTCATTGCTCAA	61
	TGGCGAGCTCAGGTAATTCTG	
IL-4	ACTTTGAACAGCCTCACAGAG	74
	TTGGAGGCAGCAAAGATGTC	
IL-6	AGGGCTCTTCGGCAAATGTA	61
	GAAGGAATGCCATTAACAACAA	
IL-10	TGAGAACAGCTGCACCCACTT	57
	TCGGAGATCTCGAAGCATGTTA	
IL-17A	GGAACGTGGACTACCACATGAA	58
	GCGCAGGACCAGGATCTCT	
IL-22	TGATGGGTGGATTCCAAATGA	60
	CAAAAGTGGCATTGGTTTCCTT	
IL-23A	TTCTGCTTGCAAAGGATCCA	58
	TCCGATCCTAGCAGCTTCTCA	
IFN- γ	TGCAATCTGAGCCAGTGCTT	62
	CAGGGTCACCTGACACATTCAA	
TGF- β 1	GCCCTGGACACCAACTATTGCT	161
	AGGCTCCAAATGTAGGGGCAGG	
TNF- α	GCAGGTCTACTTTGGGATCATTG	60
	GCGTTTGGGAAGGTTGGA	
Foxp3	CACCTGGCTGGGAAAATGG	62
	GGAGCCCTTGTCGGATGAT	
B7-H1	AGGAGATTAGATCCTGAGGAAAACC	102
	TCCCAGAATTACCAAGTGAGTCC	
B7-DC	GCCTTTGATAATTGGCACTATGG	66
	TACCCTTCTGCTCCACACATATGT	
CCL-2	CATGGTACTAGTGTTTTTTAGATACAGAGACTT	106
	TAATGATTCTTGCAAAGACCCTCAA	
CCL-7	TCTCAGTGCTGTAAAACTGTGG	63
	TTATACAATACCCCATGAGGTAGA	
CCL-21	AACCAAGCTTAGGCTGCTCCATCC	249
	TATGGCCCTTTAGGGGTCTGTGAC	

CXCL-9	GCATCATCTTGCTGGTTCTGATTGG	59
	GCGACCCTTTCTCACTACTGGGGT	
GM-CSF	TGGAGCTGTACAAGCAGGG	121
	TGGGTTGCACAGGAAGTTT	



表三：口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計

激素	Mean Rank		P value
	非癌症(n=4)	癌症(n=16)	
IL-1 β	4.25	12.06	0.018*
TNF- α	3.50	12.25	0.008*
CXCL-9	6.00	11.63	0.089
IL-6	4.25	12.06	0.018*
CCL-21	16.50	9.00	0.023*
CCL-22	5.75	11.69	0.073
IL-10	6.75	11.44	0.156
TGF- β	4.75	11.94	0.030*
Foxp3	16.00	9.13	0.038*
B7-H1	6.00	11.63	0.089
IL-17	15.67	8.27	0.028*
IL-22	9.33	10.13	0.823
IL-23	7.75	11.19	0.299
B7-DC	7.00	11.38	0.186
IL-4	13.00	6.50	0.109
IFN- γ	5.75	11.69	0.073
GM-CSF	8.75	10.94	0.508
CCL-2	10.25	10.56	0.925
CCL-7	3.75	11.67	0.012*

表四：口腔癌腫瘤組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計
各種激素表現量對照病理分期

激素	Mean Rank		P value
	早期(n=8)	晚期(n=8)	
IL-1 β	7.75	9.25	0.529
TNF- α	9.75	7.25	0.294
CXCL-9	9.38	7.63	0.487
IL-6	8.50	8.50	1.000
CCL-21	6.63	10.38	0.115
CCL-22	10.75	6.25	0.059
IL-10	7.38	9.63	0.345
TGF- β	9.00	8.00	0.674
Foxp3	6.88	10.13	0.172
B7-H1	10.00	7.00	0.208
IL-17	9.29	6.88	0.298
IL-22	10.13	6.88	0.172
IL-23	9.00	8.00	0.674
B7-DC	9.50	7.50	0.247
IL-4	7.86	4.60	0.123
IFN- γ	9.38	7.63	0.462
GM-CSF	8.25	8.75	0.487
CCL-2	10.13	6.88	0.298
CCL-7	8.25	7.71	0.817

各種激素表現量對照癌症部位

激素	Mean Rank				P value
	頰側(n=3)	牙齦(n=7)	舌(n=4)	上顎(n=2)	
IL-1 β	10.33	10.00	7.00	3.50	0.018*
TNF- α	4.67	9.71	9.25	8.50	0.008*
CXCL-9	6.00	8.29	10.75	8.50	0.089
IL-6	9.67	9.00	6.50	9.00	0.018*
CCL-21	7.67	8.57	12.25	2.00	0.023*
CCL-22	8.00	7.14	8.75	13.50	0.073
IL-10	11.00	7.86	12.25	3.50	0.156
TGF- β	11.00	8.43	6.75	8.50	0.030*
Foxp3	10.00	7.57	12.25	2.00	0.038*
B7-H1	11.00	9.43	7.50	3.50	0.089
IL-17	9.67	8.86	6.25	4.00	0.028*
IL-22	12.00	9.00	7.75	3.00	0.823
IL-23	12.00	7.71	8.50	6.00	0.299
B7-DC	9.33	8.14	8.50	8.50	0.186
IL-4	8.00	5.40	6.67	7.50	0.109
IFN- γ	8.67	8.86	8.00	8.00	0.073
GM-CSF	8.00	10.00	6.00	9.00	0.508
CCL-2	9.67	8.86	7.50	7.50	0.925
CCL-7	7.00	8.57	8.00	7.50	0.012*

表五：

Treg相關激素間的相關性

	CCL-21	CCL-22	IL-10	TGF-β	B7-H1
Foxp3	0.103	0.023	0.637*	0.172	-0.116

Th17相關激素間的相關性

	IL-17	IL-22
IL-23	0.302*	-0.026

	IL-6	IL-1β
IL-17	0.148	0.239

單核球及巨噬細胞相關激素間的相關性

	CCL-2	CCL-7	IL-6	IL-4	IFN-γ
B7-DC	0.758*	0.056	0.284	/	/
GM-CSF	0.356*	0.273	0.043	0.329*	0.556*

趨化激素間的相關性

	CXCL-9	CCL-21	CCL-22	CCL-2	CCL-7
CXCL-9		0.084	0.179	0.321*	0.059
CCL-21	0.084		-0.245	0.076	-0.076
CCL-22	0.179	-0.245		0.008	0.508*
CCL-2	0.321*	0.076	0.008		0.214
CCL-7	0.059	-0.076	0.508*	0.214	

表六：頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤頰黏膜組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計

激素	Mean Rank		P value
	非癌症 (n=3)	癌症(n=3)	
IL-1 β	2.33	4.67	0.127
TNF- α	3.00	4.00	0.513
CXCL-9	3.67	3.33	0.827
IL-6	2.67	4.33	0.275
CCL-21	5.00	2.00	0.050*
CCL-22	2.67	4.33	0.275
IL-10	2.00	5.00	0.050*
TGF- β	2.00	5.00	0.050*
Foxp3	5.00	2.00	0.050*
B7-H1	2.67	4.33	0.275
IL-17	4.50	2.00	0.083
IL-22	3.00	3.00	1.000
IL-23	3.00	4.00	0.513
B7-DC	3.00	4.00	0.513
IL-4	3.00	1.50	0.221
IFN- γ	2.33	4.67	0.127
GM-CSF	4.00	3.00	0.513
CCL-2	3.33	3.67	0.827
CCL-7	2.67	4.33	0.275

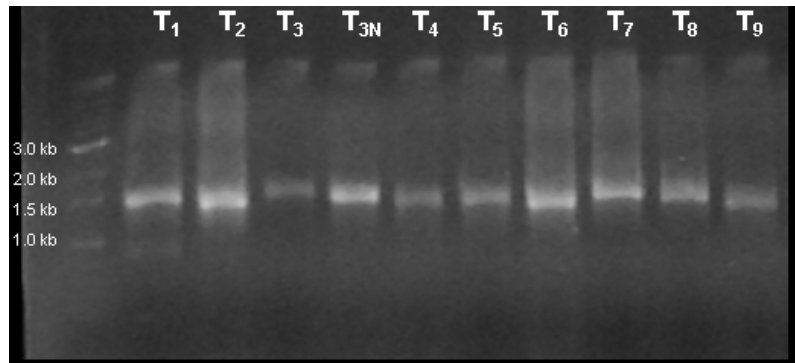
表七：牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦黏膜組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計

激素	Mean Rank		P value
	非癌症(n=1)	癌症(n=7)	
IL-1 β	1.00	5.00	0.127
TNF- α	1.00	5.00	0.127
CXCL-9	1.00	5.00	0.127
IL-6	2.00	4.86	0.275
CCL-21	7.00	4.14	0.275
CCL-22	1.00	5.00	0.127
IL-10	3.00	4.71	0.513
TGF- β	2.00	4.86	0.275
Foxp3	4.00	4.57	0.827
B7-H1	2.00	4.86	0.275
IL-17	8.00	4.00	0.127
IL-22	2.00	4.86	0.275
IL-23	1.00	5.00	0.127
B7-DC	1.00	5.00	0.127
IL-4	0.00	3.00	cannot be performed on empty groups
IFN- γ	2.00	4.86	0.275
GM-CSF	1.00	5.00	0.127
CCL-2	3.00	4.71	0.513
CCL-7	1.00	5.00	0.127

表八：非腫瘤頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織內細胞激素和趨化激素表現量和臨床病理資料統計

激素	Mean Rank		P value
	頰側(n=3)	牙齦(n=1)	
IL-1 β	2.33	3.00	0.655
TNF- α	2.00	4.00	0.180
CXCL-9	2.67	2.00	0.655
IL-6	2.00	4.00	0.180
CCL-21	3.00	1.00	0.180
CCL-22	3.00	1.00	0.180
IL-10	3.00	1.00	0.180
TGF- β	2.33	3.00	0.655
Foxp3	3.00	1.00	0.180
B7-H1	3.00	1.00	0.180
IL-17	2.00	2.00	1.000
IL-22	2.00	2.00	1.000
IL-23	2.67	2.00	0.655
B7-DC	2.67	2.00	0.655
IL-4			cannot be performed on empty groups
IFN- γ	2.67	2.00	0.655
GM-CSF	3.00	1.00	0.180
CCL-2	2.67	2.00	0.655
CCL-7	3.00	1.00	0.180

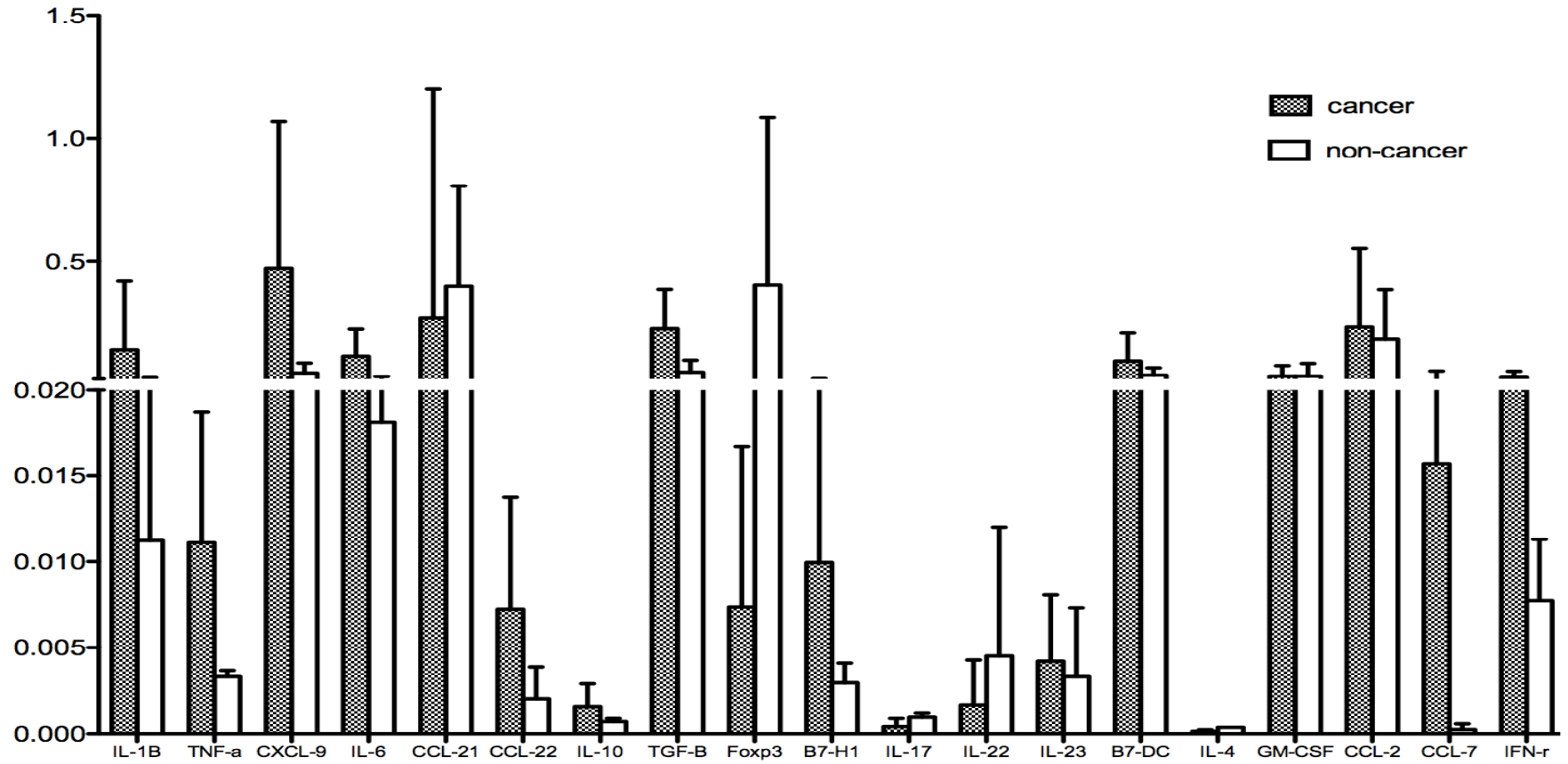
圖一



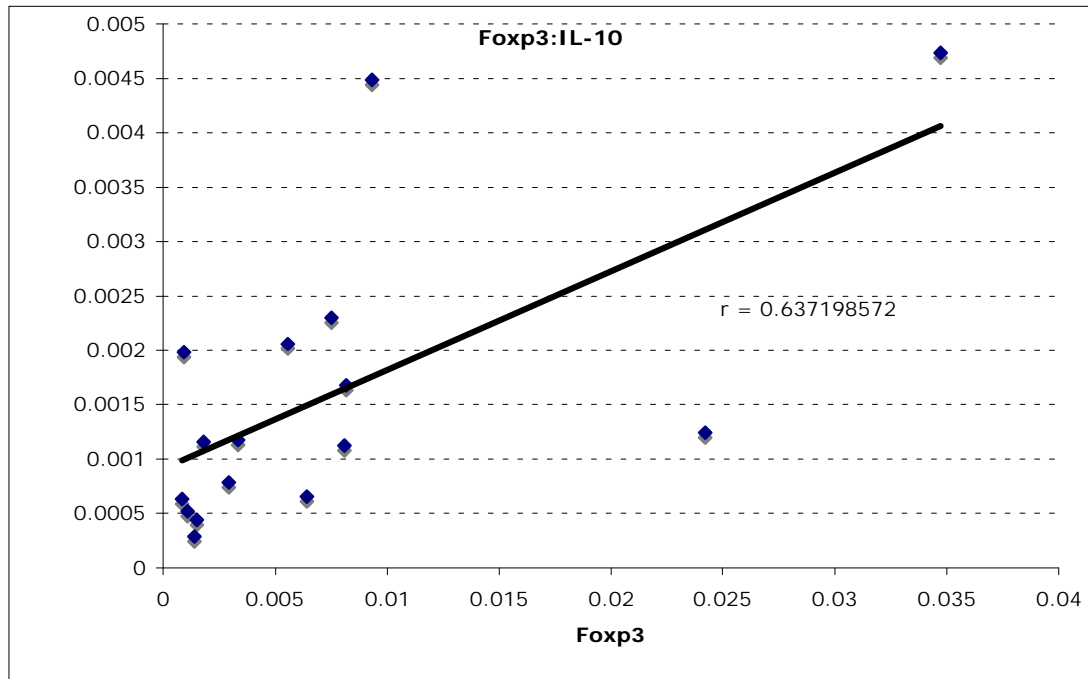
利用聚合酶鏈鎖反應觀察細菌DNA在不同病患之口腔組織的表現，除了樣本T_{3N}是口腔癌患者鄰近非腫瘤黏膜組織以外，其餘皆為口腔鱗狀上皮細胞癌組織。



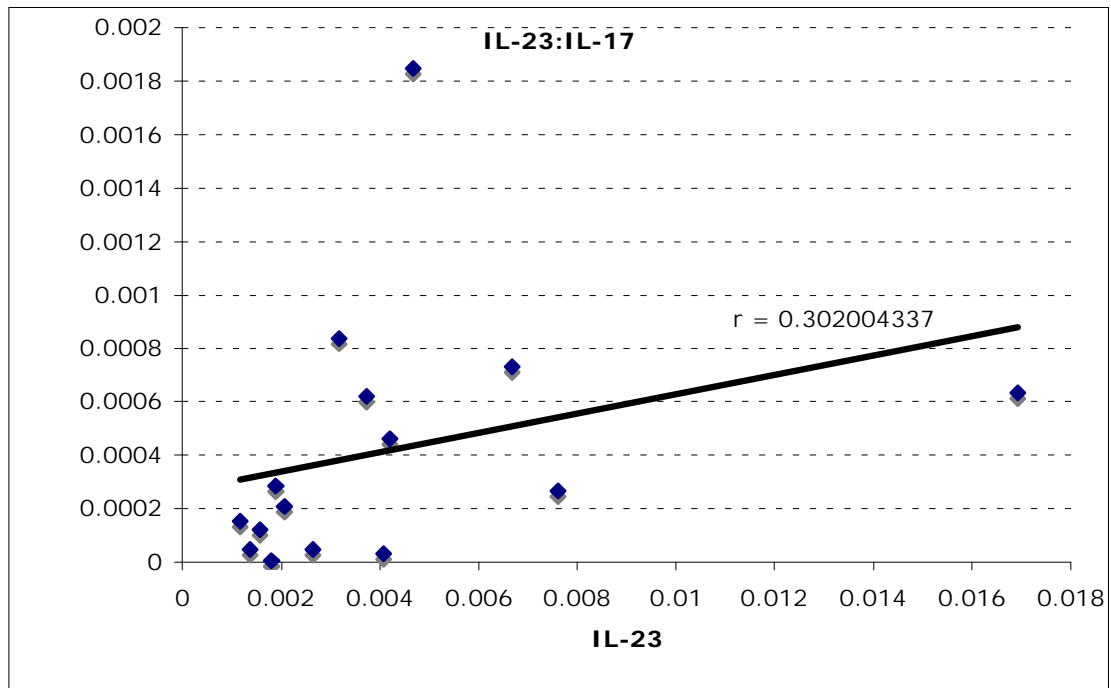
圖二：口腔癌腫瘤及非腫瘤組織的細胞激素和趨化因子表現量比較



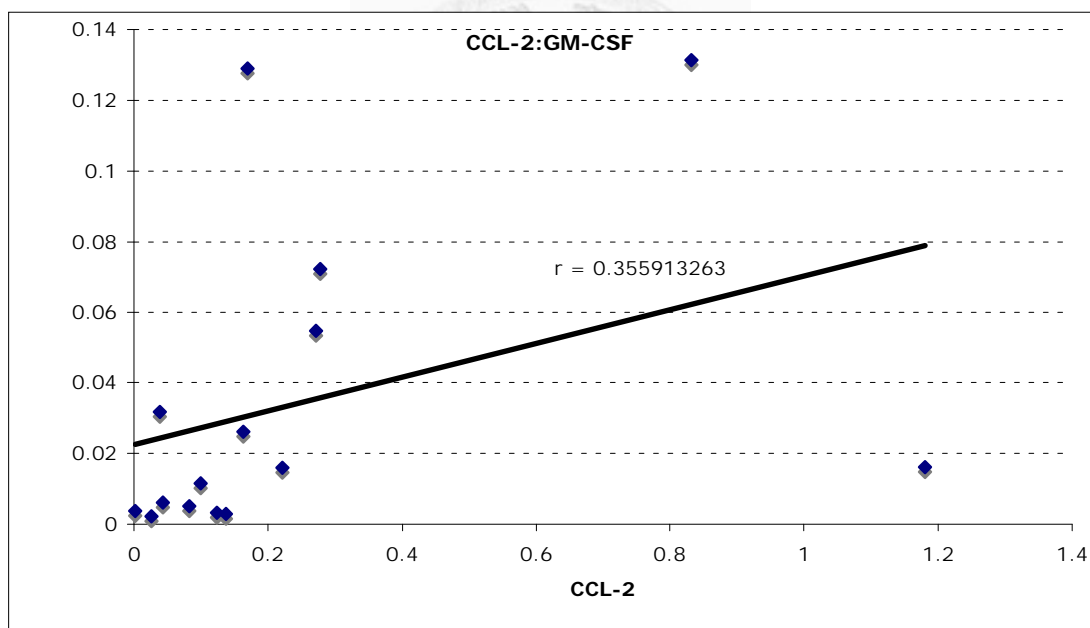
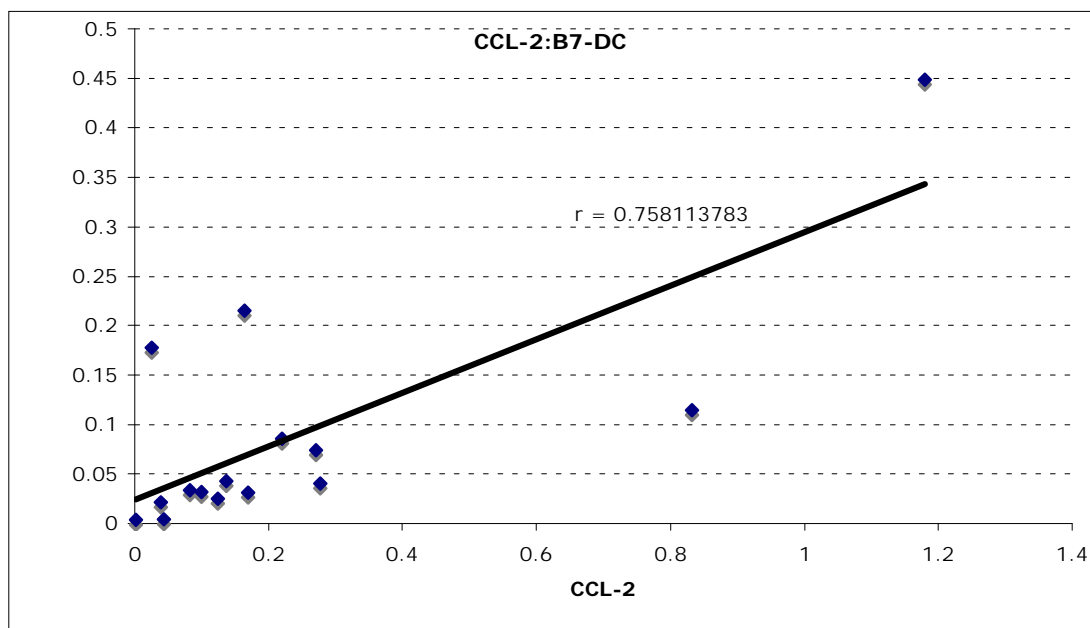
圖三：癌症組織中Treg相關激素間的相關性(具中度相關性以上)

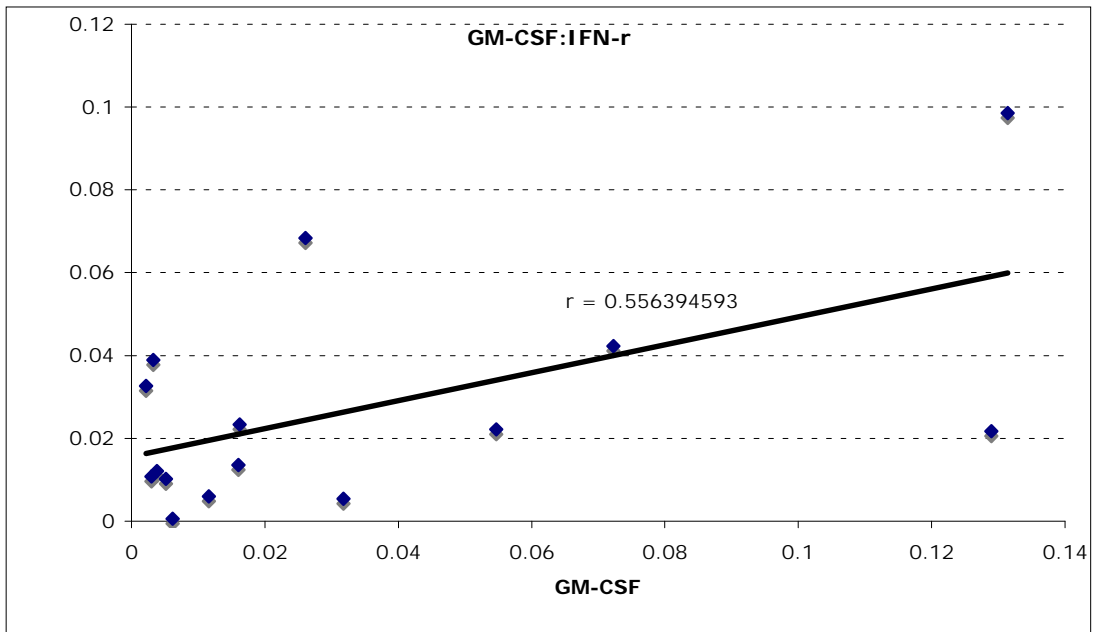
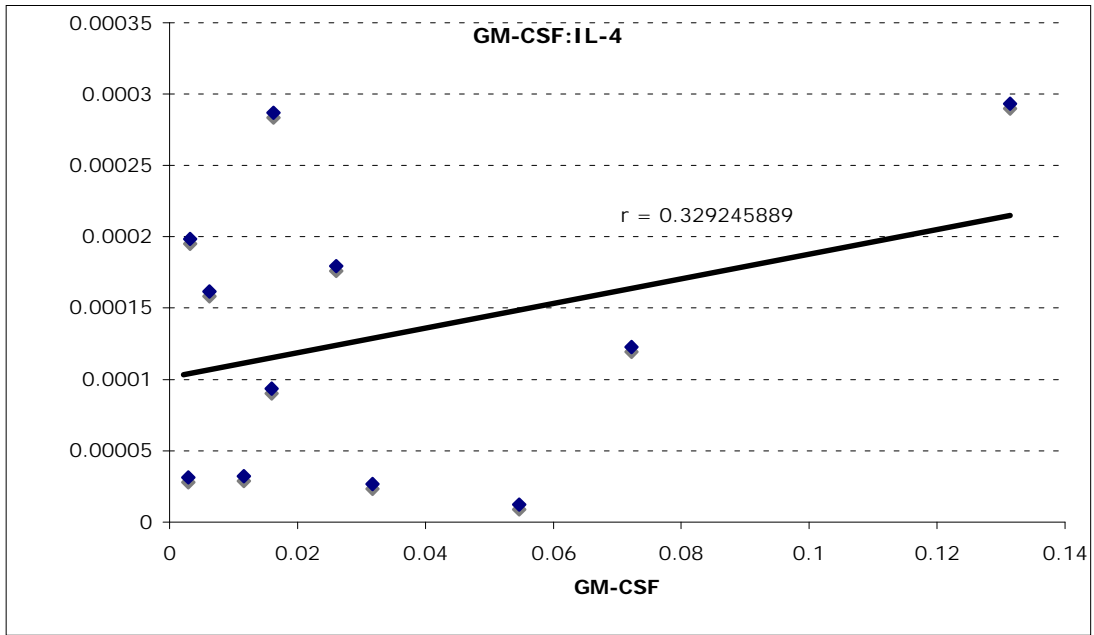


圖四：癌症組織中Th17相關激素間的相關性(具中度相關性以上)

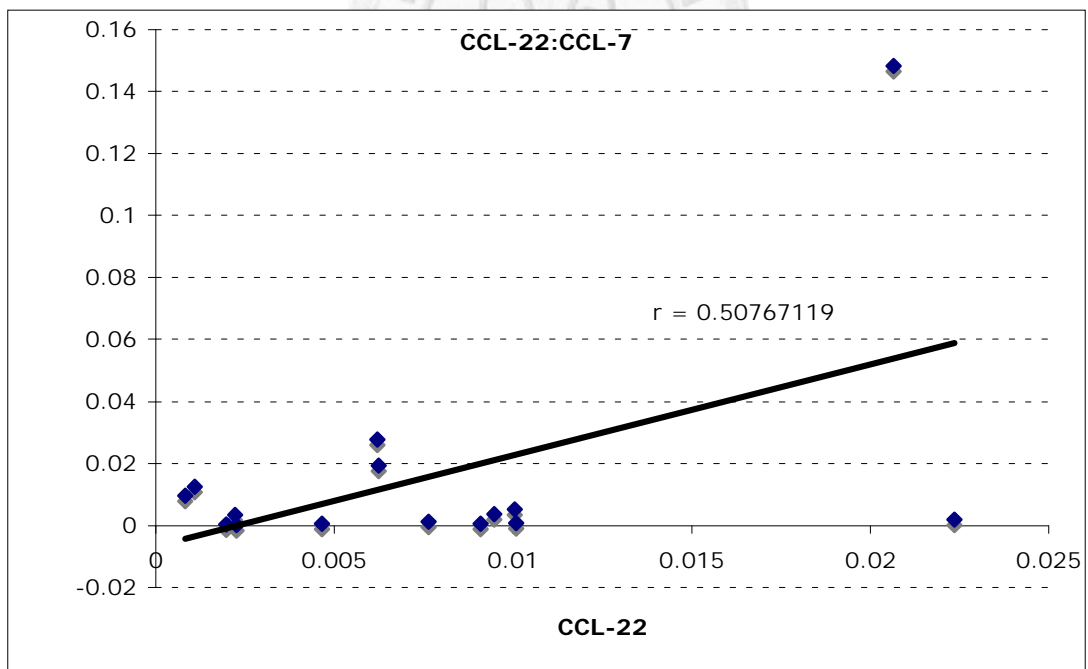
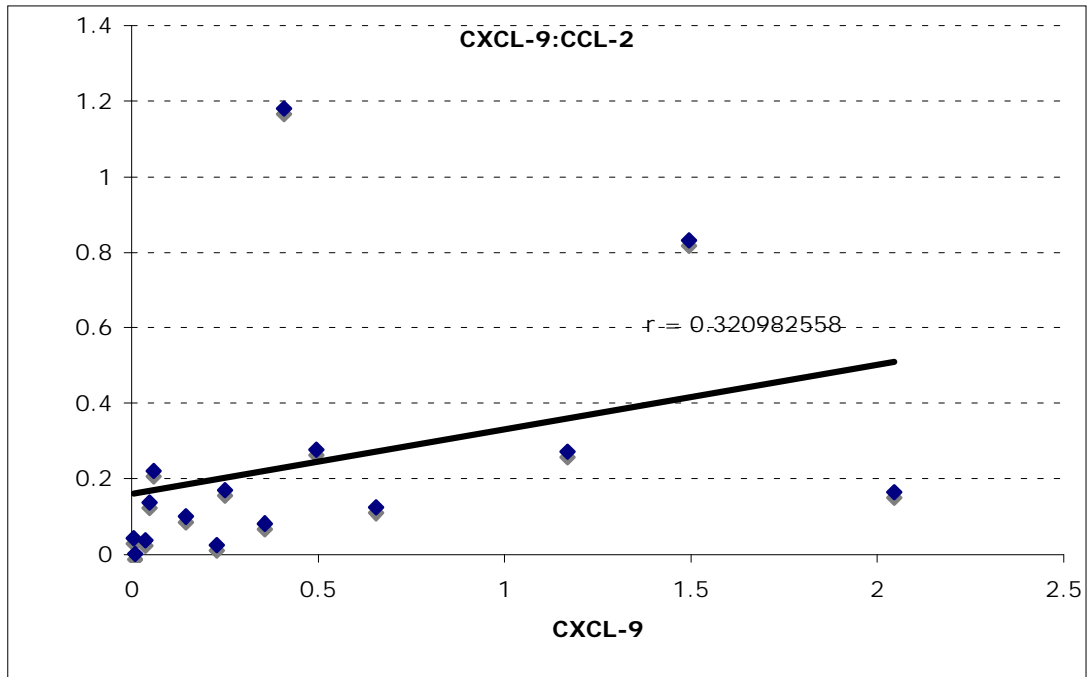


圖五：癌症組織中單核球及巨噬細胞相關激素間的相關性(具中度相關性以上)

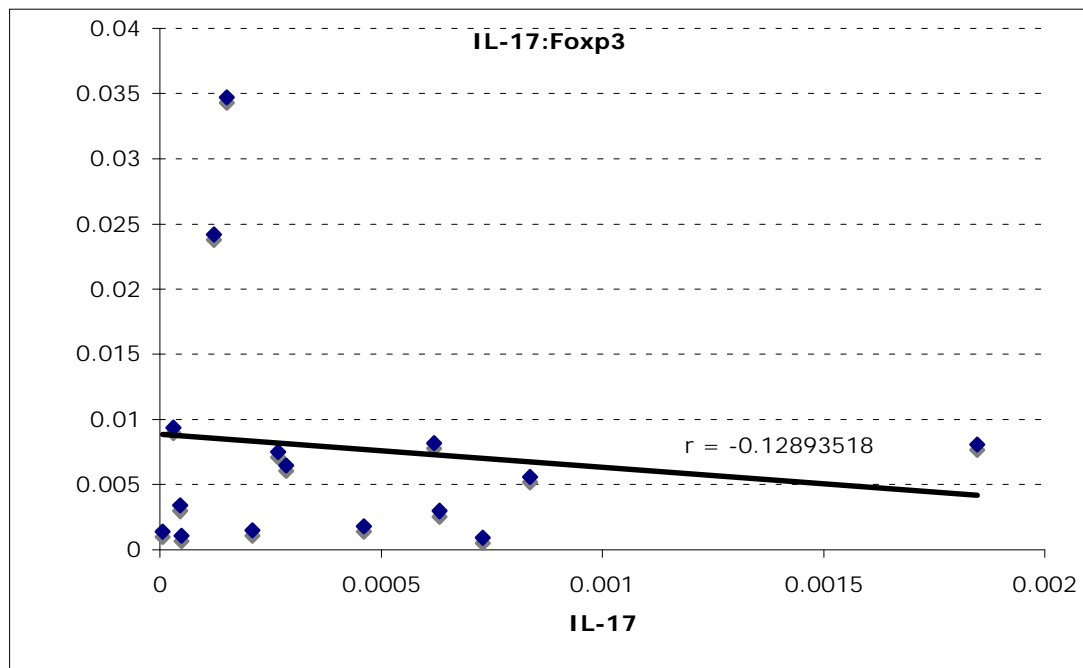




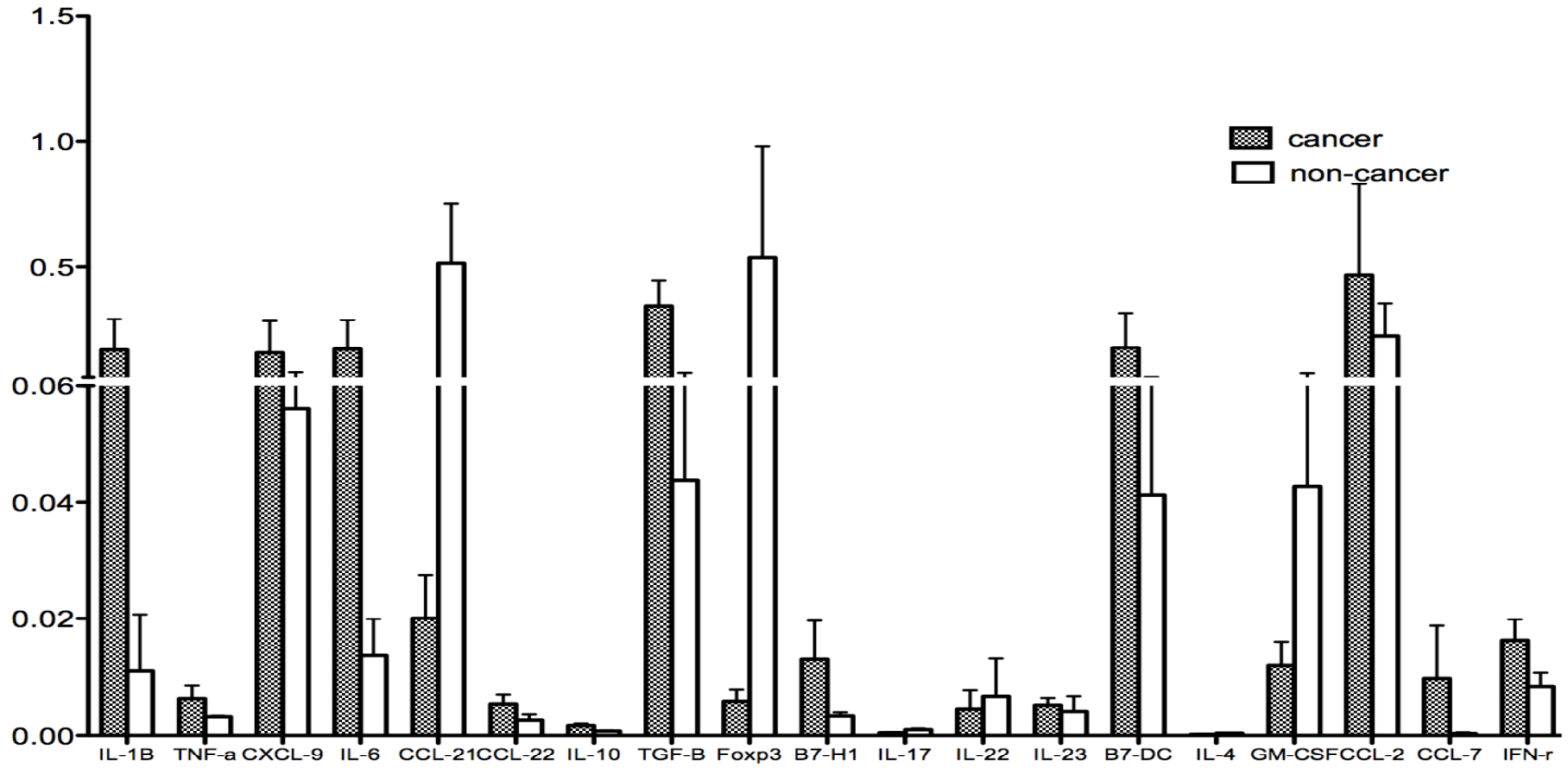
圖六：癌症組織中趨化激素間的相關性(具中度相關性以上)



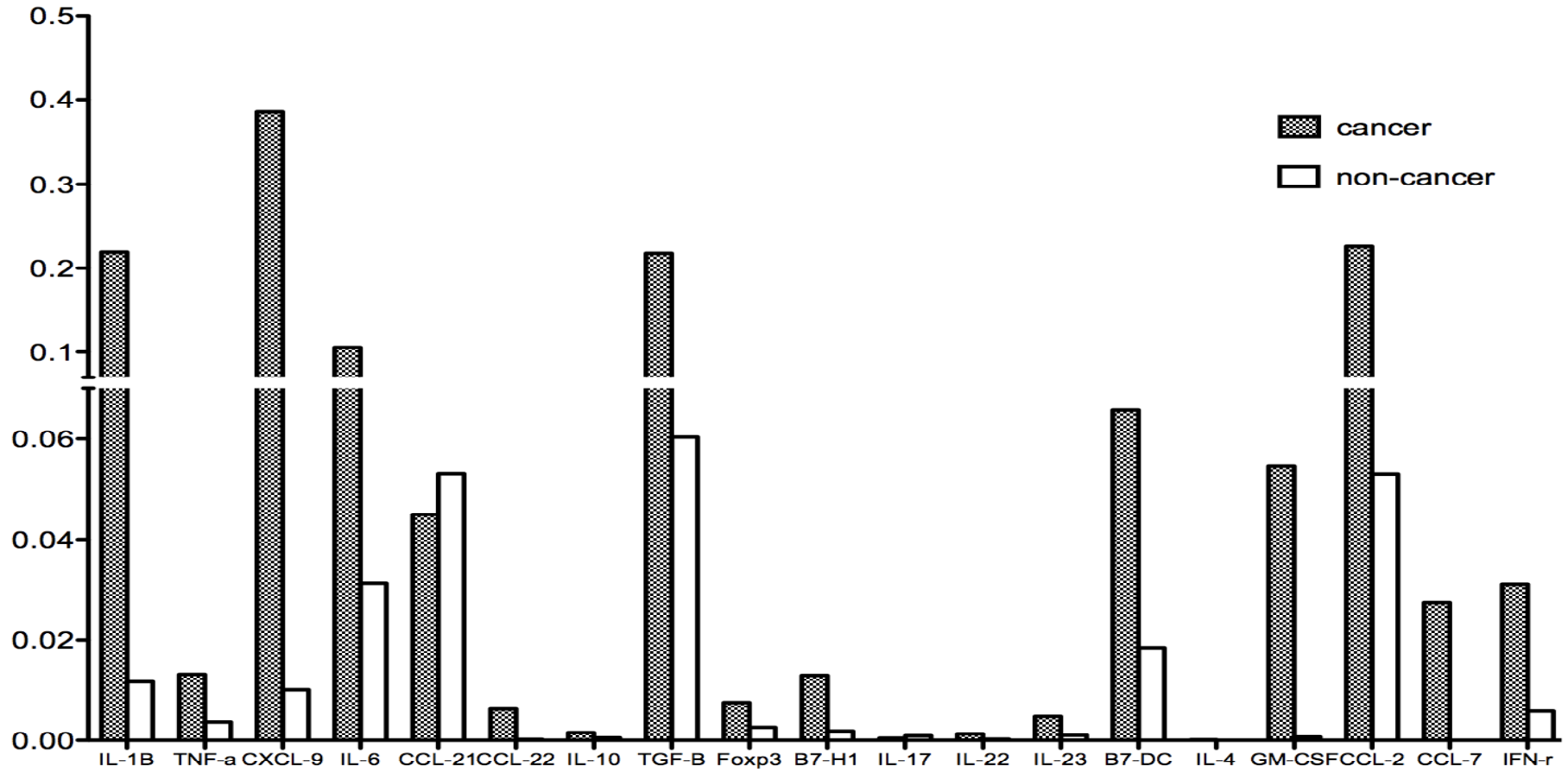
圖七：癌症組織中Foxp3及IL-17表現量的相關性



圖八：頰黏膜癌腫瘤組織及非腫瘤頰黏膜組織的細胞激素和趨化激素表現量比較



圖九：牙齦癌腫瘤組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較



圖十：非腫瘤頰黏膜組織及智齒遠心側牙齦組織的細胞激素和趨化激素表現量比較

