

후두편평상피세포암에서 종양괴사인자와 Interleukin-6의 발현양상

이화여자대학교 의과대학 이비인후과학교실, 병리학교실*

정 성 민 · 김 성 숙*

= Abstract =

Expression of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 in Larynx Squamous Cell Carcinoma

Sung Min Chung · Sung Sook Kim*

Department of Otolaryngology and Pathology, College of Medicine, Ewha Womans University*

Background : The host immune system normally functions to destroy neoplastic cells that continually develop as a result of somatic mutations. However, patients with head and neck squamous cell carcinoma have depressed cell-mediated immune function, which has recently been shown to be most pronounced in the local and regional environment of the primary tumor. Recent studies suggest a local modulation of the host immune response to tumor by secreted immunoregulatory factors such as cytokines, especially pro-inflammatory cytokines (interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, interferons, and tumor necrosis factor).

Materials and Methods : To assess the ability of head and neck squamous cell carcinoma to produce these cytokines, initially, we have performed immunohistochemical staining for interleukin-6 and tumor necrosis factor in 20 cases of laryngeal squamous cell carcinoma and 10 cases of laryngeal nodule as a control group.

Results : We detected interleukin-6 in 11 cases of laryngeal squamous cell carcinoma(55%) and tumor necrosis factor in 11 cases of laryngeal squamous cell carcinoma(55%). All of 10 papillomas showed no expression of interleukin-6 and tumor necrosis factor. There is no statistical correlation between interleukin-6 and tumor necrosis factor expression and clinical stage or pathologic grade.

Conclusion : These results suggest that laryngeal squamous cell carcinoma may secrete cytokines influencing the response of local immune cells. But future studies of the role of tumor-derived cytokines in the local immune response to tumor could be investigated, since cytokines may directly or indirectly regulate tumor growth and metastasis.

KEY WORD : TNF- α · Interleukin-6 · Laryngeal squamous cell carcinoma.

서 론

두경부편평상피세포암에서 숙주의 면역반응에 대한 이해가 높아지면서 국소 종양 미세환경(local tumor microenvironment)에 대한 관심이 높아지고 있다. 이것은 종양과 숙주의 상호작용을 의미하는데, 일차 두경부암과 가장 근접한 곳에서 발생하는 이러한 상호작용은 종양이 국소적으로 팽창하고 전이하는데 직접적인 영향을 준다는 것이다.

이러한 개념은 면역억제가 국소종양미세환경에서 가장 크고 일차 암으로부터의 거리가 멀어지면서 감소된다는 최초의 몇몇 연구에서 보고된 바 있다^{2,5)}. 또한 염증 반응은 종양의 범위와 역상관계가 있어서 종양이 적을수록 주변에 염증세포들이 있어서 더 많이 침윤되는 것으로 보고되고 있다^{6,8)}. 최근에는 두경부편평세포암의 미세환경에서 숙주와 종양의 상호작용의 가능성있는 매개체(mediator)는 cytokine으로 생각되어지고 있다. cytokine은 원래 백혈구 산물로써 알려져 왔으나 현재는 상피세포, 내피세포, 섬유아세포 등 비면역조직세포에서도 생성되는 것으로 보고되고 있다^{9,13)}.

그리고 이러한 비면역 조직세포에서 만들어진 cytokine은 국소면역반응에서 면역세포들의 기능을 조절하는 것으로 본다는 보고도 있다^{13,14)}. 따라서, 본 연구에서는 면역조절에 관여하는 단백질로서 일반적으로 종양 성장을 방해하는 것으로 알려져 왔으나 최근에는 일부종양에서도 만들어져 종양침습을 촉진시키는 것으로 알려진 종양괴사인자(tumor necrotic factor- α)와 염증반응에서 중요한 역할을 하는 다른 cytokine들, 즉 interleukin 1이나 innerleukin 8과 함께 림프구 점증(recruitment)과 종양혈관신생에 관여하면서 종양의 전이에도 관여하는 것으로 알려진 interleukin 6의 발현을 후두의 편평상피세포암에서 살펴보았다. 그리고 이들 종양에서 국소면역반응에 있어서의 종양에서 만들어진 cytokine의 역할을 이해하고 이러한 cytokine이 종양성장을 조절하고 전이를 조절하는데 어느정도 관여하는지 살펴보고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

1991년부터 1995년까지 이화여자대학교 부속 동대문

병원에서 후두의 편평상피세포암으로 수술 및 방사선 치료를 받았던 환자로써 이들의 생검 및 수술시 적출한 조직의 보관 및 처치가 양호하였던 20예와 대조군으로 성대결절 10예를 대상으로 하였다.

2. 방 법

1) 면역 조직화학적 염색

Tumor necrotic factor- α 와 interleukin-6의 발현 양상을 보기 위한 면역조직화학적 염색을 Hsu가¹⁵⁾ 기술한 방법에 약간의 수정을 가하여 시행하였다.

즉, 파라핀에 포매된 조직을 5 μ m의 절편으로 깎아 alcohol과 xylene을 이용하여 탈파라핀과 hydration을 시켰다. Xylene에는 5분간 3회씩 담겼으며 alcohol은 100%, 90%, 80%, 70% 순으로 각 2번씩 2분간 처리하였다. 비특이적인 단백질의 결합을 막기위해 10% hydrogen oxide에 15분간 반응시켰다. 증류수로 2번 수세하고 PBS(phosphate buffered saline)에 5분간 담근 후 희석시킨 P-glycoprotein을 실온에서 2시간 반응시켰다.

그 후 PBS로 5분간 3회씩 DAKO 사의 LSAB(labelled streptavidin biotin) kit를 사용하여 면역 조직화학 염색을 시행하였다.

즉 link antibody를 20분간 반응시키고 그 후 streptavidin 20분 반응후 PBS로 수세후 AEC(3-amino-9-ethyl carbazole)로 발색하고 Meyer's hematoxyline으로 대조 염색한 후 mount하고 현미경으로 검색하였다.

양성 대조군으로는 가장 양성 반응이 잘 나오는 슬라이드를 골라 매번 염색시 1장씩 같이 염색하여 비슷한 염색상을 보이는지 비교하였다.

결과는 광학 현미경으로 관찰하여 음성 대조군의 경우를 (-)로 하고 염색이 종양세포 또는 간질세포에서 발현되는 경우 모두를 양성으로 분류하였다.

2) 병리조직학적 분화도의 구분

Hematoxylin-eosin 염색표본은 병리조직학적 분화도를 1992년 미국 암협회의 분류에 따라 grade 1은 분화도가 아주 좋은 예, grade 2는 분화도가 중등도인 예, grade 3은 분화도가 좋지 않은 예, grade 4는 미분화인 예로 재분정하였다.

3) 통계분석

통계 처리는 SAS program을 사용하였는데 양성 대조군(성대결절)과 암종과의 비교 및 암종에서 각 병기 또는 분화도와와의 비교에 student t-test를 이용하여 처리하였다. P값이 0.05이하인 경우를 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 후두 편평상피세포암과 대조군에서 TNF와 IL-6의 표현양상

후두편평상피세포암 20예중 TNF의 표현양상은 11례에서 양성으로 염색되어 55%의 양성율을 보였고 대조군인 성대결절 10예는 모두 염색되지 않아 양성율은 0%였다. 염색은 주로 종양세포의 세포질에서 관찰되었고 (Fig. 1) 간질조직에서도 일부 발현이 되었다. 또한 후두편평상피세포암에서 IL-6의 표현양상은 11례에서 발현되어 55%의 양성율을 보였고 대조군인 성대결절 10예는 모두 염색되지 않아 양성율은 0%였다(Table 1). 염색양상은 종양피사인과 비슷하게 관찰되었는데 (Fig. 2) 간질조직에서는 혈관내피세포와 일부의 염증세포에서 발현이 되었다.

2. 후두편평상피세포암의 임상적 병기와 TNF와 IL-6의 표현양상과의 관계

TNF의 표현양상은 후두암 병기 1기 5예중 양성인 한 예도 없어 양성율은 0%이며, 병기 2기 4예중 양성인 2예(50%)이고, 병기 3기 6예중 양성인 4예(66.7%), 병기 4기 5예중 양성인 3예(60%)로 병기가 높아짐에 따라 양성율이 증가되는 경향이 있었으나 통계적 의의는 없었다($p>0.05$). 또한 IL-6의 표현양상은 후두암 병기 1기 5예중 양성인 1예(20%), 2기 4예중 양성인 1예(25%) 3기 6예중 양성인 4예(66.7%), 병기 4기 5예중 양성인 3예(60%)로 병기가 증가됨에 따라 양성율이 증가되는 경향이 있었으나 통계적 의의는 없었다($p>0.05$) (Table 2).

3. 후두편평상피세포암의 병리 조직학적 분화도와 TNF, IL-6의 표현양상과의 관계

TNF의 표현 양상은 grade 1의 분화도를 보인 13예중 양성인 2예(15.4%)였으나 grade 2의 분화도를 보인 4예에서는 양성인 4예(100.0%)였고 grade 3의 분화도를 보인 3예에서도 양성인 3예(100.0%)로 분화도가 낮을수록 TNF의 발현은 의미있는 증가를 보였다($p<0.05$). IL-6의 표현 양상은 grade 1의 분화도를 보인

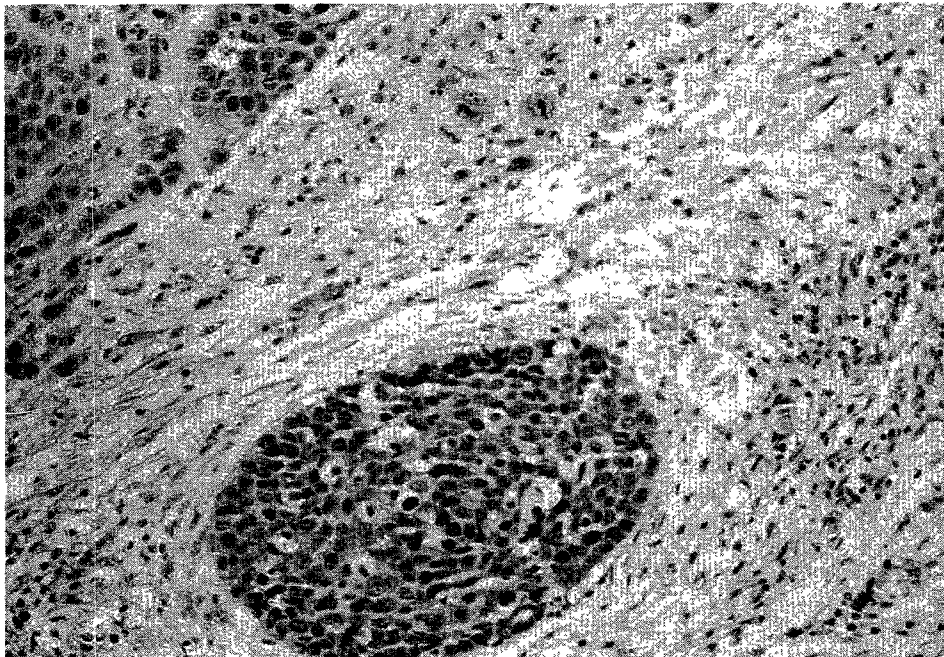


Fig. 1. Tumor cells and stromal cells mildly expressed TNF by immunohistochemistry(Immunostain, $\times 100$).

Table 1. Expression of TNF- α and IL-6 in squamous cell carcinoma of the larynx and vocal nodules

	No. of cases(%)				Total
	TNF- α		IL-6		
	+/+/+++	-	+/+/+++	-	
sq.cell carcinoma	9 (45.0)	11 (55.0)	9 (45.0)	11 (55.0)	20 (100.0)
Vocal cord nodule	0 (0.0)	10 (100.0)	0 (0.0)	10 (100.0)	10 (100.0)

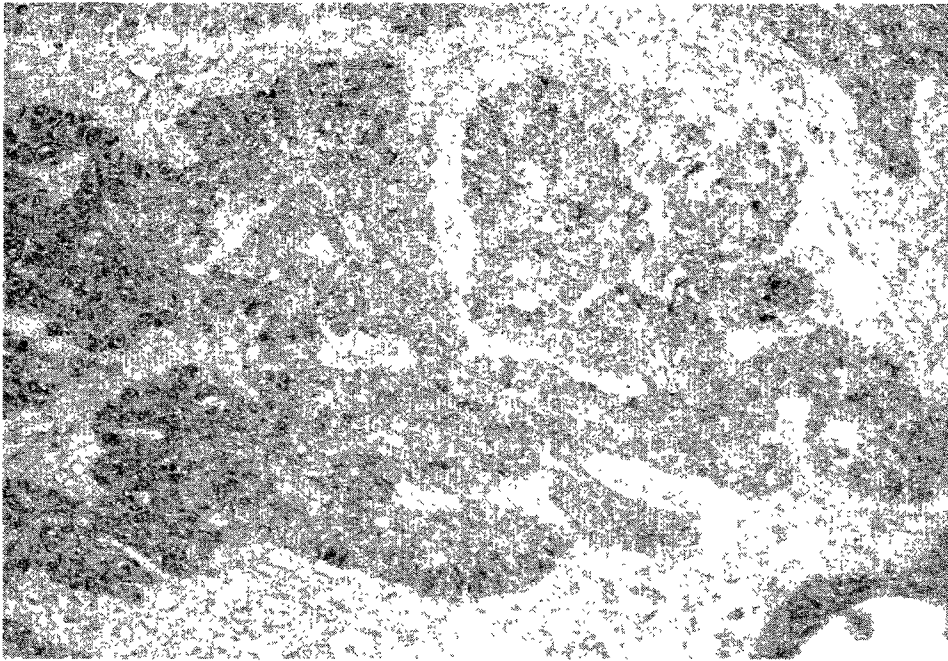


Fig. 2. IL-6 was detected in cytoplasm of tumor cells(Immunostain, $\times 100$).

Table 2. Correlation of TNF- α and IL-6 positivity with clinical stages

Clinical Stage	No. of cases(%)				Total
	TNF- α		IL-6		
	+	-	+	-	
I	0(0.0)	5(100.0)	1(20.0)	4(80.0)	5(100.0)
II	2(50.0)	2(50.0)	1(25.0)	3(75.0)	4(100.0)
III	4(33.3)	2(66.7)	4(66.7)	2(33.3)	6(100.0)
IV	3(60.0)	2(40.0)	3(60.0)	2(40.0)	5(100.0)
Total	9(45.0)	11(55.0)	9(45.0)	11(55.0)	20(100.0)

13예중 양성인 3예(23.1%) 이고, grade 2의 분화도를 보인 4예중 양성인 3예(75.0%) 였고 grade 3의 분화도를 보인 3예중 양성인 3예로(100.0%) TNF와 마찬가지로 분화도가 낮을수록 양성율이 의미있게 증가되었다 ($p < 0.05$)(Table 3).

고 찰

숙주면역계는 정상적으로는 체성 돌연변이에 의해서 끊임없이 발생되는 종양세포를 파괴시킬 수 있는 기능을

Table 3. Correlation of TNF- α and IL-6 positivity with pathologic(histologic) grades

Histopathologic Grad	No. of cases(%)				Total
	TNF- α		IL-6		
	+	-	+	-	
G1	2(15.4)	11(84.6)	3(23.1)	10(76.9)	13(100.0)
G2	4(100.0)	0(0.0)	3(75.0)	1(25.0)	4(100.0)
G3	3(100.0)	0(0.0)	3(100.0)	0(0.0)	3(100.0)
Total(%)	9(45.0)	11(55.0)	9(45.0)	11(55.0)	20(100.0)

G1 : well differentiated, G2 : mod. well differentiated, G3 : poorly differentiate

가지고 있다. 그러나 두경부편평상피세포암이 있는 환자는 세포매개면역기능이 저하되어 있으며^{31,16-18)} 최근에 이런 현상은 일차 암의 국소 또는 주변 환경에서 가장 현저하게 나타난다는 것이 보고되고 있다⁴⁾⁵⁾. 또한 두경부 편평상피세포암과 주변 림프절에서 림프킨으로 활성화된 살세포(lymphokine-activated killer cell, LKC)의 종양독성능력(tumoricidal)을 방해하는 가용성인자를 생산하는 것이 보고되고 있다²⁾⁴⁾. 이런 연구들에 의해 종양에 대한 숙주의 면역반응은 cytokine 같은 면역조절인자들의 분비에 의해 국소적으로 조정된다는 것을 알 수 있다. 최근 수년간 cytokine으로 알려진 작은 glycoprotein hormones에 의한 면역계의 세포상의 조절이 잘 알려져 있는데, cytokine은 서로 기능상 중복되는 것이 많지만 크게 두 종류로 분류할 수 있다.

그 중 하나는 염증 전달계의 cytokines(interleukin1, interleukin 6, interleukin 8, interferons, tumor necrosis factor)이고 또 하나는 성장인자 cytokines(interleukin-3, interleukin 4, interleukin 5, interleukin 7, interleukin 10, colony stimulating factors)이다. 이러한 cytokines은 원래는 대식세포, 단핵세포, 림프구 등에서 만들어져 다른 백혈구 등의 기능과 성장분화 등을 조절하는데 관여하는 것으로 알려져 있으나¹⁹⁾²⁰⁾ 최근에는 비면역세포들도 cytokines를 분비하는 것으로 알려져 있다. 특히 상피세포나 내피세포는 interleukin-1, interleukin-8을 생성하는 것으로 알려져 있고⁹⁻¹²⁾ 섬유아세포는 interferon, colony-stimulating factor, interleukin-6 등을 생성하는 것으로 알려져 있다¹³⁾²¹⁾. 이와 같이 잔류조직세포가 cytokines를 생성하여 국소면역반응을 조정한다는 것은 종양의 미세 환경에서 종양세포와 잔류조직세포들 즉 섬유아세포 등이 cytokines를 만들고 종양부위에서 국소적으로 면역세포기능을 조절한다는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

여러 문헌에서 보고된 바와 같이 최근 암의 전이가 cytokine에 의해 일어난다고 생각되어지고 있으며 이 cytokine들은 암세포 자체에서 직접 생산되거나 또는 암세포와 반응하는 면역세포들에서 생산되는 물질로써 여기에는 IL-1, IL-2, IL-6, 종양괴사인자, interferon(IFN)- γ 등 여러물질이 관여한다고 알려져 있다²²⁾²³⁾. 이 중에서 가장 많이 연구가 진행되고 있는 것은 IL-1 및 TNF- α 이다. 이들 물질은 주로 염증반응시 활성화된 대식세포에서 생산되는 소위 염증성 cytokine으로 최근 암의 전이에 관여한다고 보고되고 있다²⁴⁻²⁷⁾. TNF- α 는 항종양작용을 갖는 cytokine이지만 잘 알려진 염증과 면역의 매개체이며 세균의 내독소에 노출된 후 제일 많이 생성된다²⁸⁻³¹⁾. 최근들어 TNF- α 가 어떤 경우에 있어서는 종양 증식에 실제적으로 도움을 줄 수도 있다는 보고가 있다. TNF- α 생성이 원래는 대식 세포와 단핵세포에서 이루어지지만 최근 보고에 의하면 난소암³²⁾³³⁾과 흑색종 종양에서도 만들어지는 것으로 알려져 있다. TNF- α 가 종양세포에서 만들어지면 종양의 행동양상에 많은 영향을 미치며 또한 숙주의 임상상태에도 영향을 미칠 수 있다. 강력한 cytokine인 TNF- α 는 암환자의 혈청에서 증가되는 것을 발견했는데³¹⁾ 이러한 현상은 종양과 관계된 악액질과 빈혈의 원인으로 보인다고 하였다. 보고에 의하면 두경부 암환자 24명과 대조군 8명을 비교하여 두경부 암환자에서 대조군보다 혈청 TNF- α 수준이 100배나 높은 것을 보고하며³⁵⁾, 이러한 결과가 암에 대한 숙주반응인지 또는 종양 발생(형성)과정의 현상인지는 확실하지 않다고 하였다³⁰⁾³¹⁾.

또한 다른 보고에서는 9명의 두경부 편평상피암환자를 대상으로 면역조직화학방법으로 TNF- α 의 존재를 검사하여 TNF- α 가 종양자체와 혈관내피세포에 분포하는 것을 보고 하면서³⁶⁾, TNF- α 가 두경부 편평상피세포 암 환자의 전신적, 국소적 영향에 대해 설명할 수 있다고

보고한바 있다. TNF- α 가 혈관형성을 자극하여 주변으로부터 혈관이 자라 들어오는 것을 촉진시킴으로써 종양 성장을 국소적으로 도와준다는 보고도 있으며³⁷⁾³⁸⁾, TNF- α 가 collagenase 생성을 자극하여 종양침습을 촉진시키며 골 및 연부조직을 파괴시킨다는 보고도 있다³⁹⁾⁴¹⁾. 그 외에도 IL-1과 같이 골과피세포 생성을 자극하여 골흡수를 직접적으로 일으킬 수도 있다⁴¹⁾(Yan 1991). 최근의 연구에 의하면 TNF- α 유전자로 transfection된 종양세포에서 전이가 증가되는 것을 쥐실험에서 보여 주고 있는데, 이는 종양세포의 국소적 혈관형성과 증가된 유착때문인 것으로 결론짓고 있다.

따라서 이들은 TNF- α 생성하는 종양세포는 침습력이 증가된다고 가정하였다⁴²⁾. 최근의 또다른 연구에서도 TNF- α 를 생산할 수 있는 종양세포는 이 cytokine의 정상적인 세포용해에 내성이 있을 수 있다고 하였다⁴³⁾. Gallo⁴⁴⁾등은 10명의 두경부 편평상피세포암환자로부터의 단핵세포를 분리하여 lipopolysaccharide와 함께 배양한 결과 TNF- α 의 농도가 대조군의 단핵세포에서 만들어진 것보다 현저하게 높음으로써 두경부암환자에서 만들어지기 때문인 것으로 보고하고 있다. Gallo⁴⁴⁾등은 두경부편평상피세포암환자에서 TNF- α 의 발현증가와 암의 임상적 병기와, 체중감소, 작위상태(performance status)와는 연관이 없다고 보고하고 있다.

저자의 경우 추두편평상피세포암 20예중 9예에서 TNF- α 가 발현되는 반면 대조군이 성대결절에서는 TNF- α 가 전혀 발현되지않아 후두편평상피세포암이 TNF- α 를 생성하는 것으로 추측할 수 있으며 통계적 의미는 나타나지 않았으나 임상적 병기가 증가됨에 따라 TNF발현이 증가되는 경향이 있었으며 병리조직학적 분화도가 나뉠수록 TNF 발현이 증가되었다. 후두편평상피세포암에서 TNF 발현의 증가는 이 종양의 공격적인 생물학적 행동양상에 관계될 수 있다는 것을 추측해볼 수 있었다.

이상의 결과로 TNF- α 는 두경부의 편평상피세포암에서 종양자체 또한 주변 혈관내피세포에서 그리고 혈청에서 정상에 비해 높게 발현됨으로써 이 cytokine이 종양의 침습력에 영향을 미친다는 것을 가정해 볼 수 있겠다. 그러나 이러한 현상이 TNF- α 의 단독 작용인지 아니면 TNF- α 와 상당히 증폭되는 기능을 가진 interleukin 1 또는 interferon, interleukin 6 등의 작용에 의해 유도되거나 또는 방해되는 것은 아닌지를 연구해 보는 것이

TNF- α 의 증가가 숙주의 면역학적반인지 또는 종양자체에서 만들어지는 것인지를 알기 위하여 interleukine 1과 TNF- α 를 동시에 검사하였다. IL-6는 IL-1과 같이 염증작용에 있어서 중심적인 역할을 하는 cytokine으로 T와 B 림프구와 간세포의 성장과 분화에 관계된다⁴⁵⁾⁴⁷⁾. IL-6는 원래 T 림프구, 단핵세포, 섬유아세포에서 생성되는 것으로 생각되어 왔으나, 최근 Kirnbauer⁴⁸⁾등은 편평상피세포주를 IL-1으로 자극하였을 때 IL-6가 생성되는 것을 보고하고 있으며 또한 Mann⁴⁹⁾등도 두경부편평상피세포암의 균등질과 일차배양의 상층액에서 IL-6가 존재하는 것을 보고한 바 있다.

저자의 경우도 IL-6가 후두편평상피세포암 20예중 9예에서 발현되었으나 성대결절조직에서는 발현되지 않아 후두편평상피세포암이 IL-6를 생성함을 알 수 있었고 임상적 병기와는 통계적 의미 있는 관계가 있었으나 병리조직학적 분화도와는 분화도가 나뉠수록 발현양상이 증가되는 것이 나타났다.

그 결과 IL-6나 TNF- α 모두 대조군보다 종양조직에서 높게 발현되어 이들 cytokine 이 종양세포 자체에서 만들어져 종양의 주위의 침습력을 증가시키고 전이를 촉진시키는데 동시에 관여 할 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 앞으로 좀 더 많은 예에서 전진전이 및 환자의 임상적 상태 등과 이들 cytokine의 발현정도를 비교하여 두경부편평상피세포암의 행동양상과 예후를 측정해 볼 수 있는 것이 필요하다 하겠다.

결 론

후두편평상피세포암 20예와 대조군으로 성대결절 10예를 대상으로 TNF- α 와 interleukin 6의 발현양상은 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 후두편평상피세포암 20예중 9예에서 종양괴사인자와 interleukin-6이 발현되었고 대조군인 성대결절에서는 전혀 발현되지 않았다.
- 2) 임상적 병기가 증가됨에 따라 종양괴사인자와 interleukin-6의 발현이 증가되는 경향이 있었으나 통계적 의미는 없었다.
- 3) 병리조직학적 분화도가 낮을수록 종양괴사인자와 interleukin 6의 발현이 증가 되었다.

이상의 결과로 후두편평상피세포암이 TNF와 interleukin-6의 생성을 유도한다는 것을 확인하였으며

앞으로는 이들 cytokine 이 종양의 국소미세환경에서 종양의 성장과 전이에 어떠한 영향을 미치는 지를 좀 더 연구해봄으로써 두경부 편평상피세포암의 새로운 접근 방법을 시도할 수 있으리라 본다.

References

- 1) 김종남 · 정성민 · 박미향 · 신종철 · 이민경 : 두경부 편평상피암 세포주에 종양괴사인자와 항암제 투여가 세포생존율에 미치는 영향. 대한이비인후과 학회지 1994 ; 37 : 5호
- 2) Strasnick B, Lagos N, Lichtenstein A, et al : *Suppression of lymphokine-activated killer cell cytotoxicity by a soluble factor produced by squamous tumors of head and neck. Otolaryngol Head Neck Surg 1990 ; 103 : 534-549*
- 3) Kessler DJ, Mickel RA, Lichtenstein A : *Depressed natural killer cell activity in cervical lymph nodes containing focal metastatic squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1988 ; 114 : 313-318*
- 4) Mickel RA, Kessler DJ, Taylor JM, et al : *Natural killer cell cytotoxicity in the peripheral blood, cervical lymph nodes, and tumor of head and neck cancer patients. Cancer Res 1988 ; 48 : 5017-5022*
- 5) Wang MB, Lichtenstein A, Mickel RA : *Hierarchical immunosuppression of regional lymph nodes in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Otolaryngol Head Neck Surg 1991 ; 105 : 517-527*
- 6) Guo M, Rabin BS, Johnson JT, Paradis IL : *Lymphocyte phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer. Head Neck Surg 1987 ; 9 : 265-271*
- 7) Boheim K, Denz H, Boheim C, et al : *Immunohistologic study of the distribution and status of activation of head and neck tumor infiltrating leukocytes. Arch Otolaryngol. 1987 ; 244 : 127-132*
- 8) Wolf GT, Hudson JL, Petoson Ka, Miller HL, et al : *Lymphocytes subpopulations infiltrating squamous cell carcinomas of head and neck : Correlations with extent of tumor and prognosis. Otolaryngol Head Neck Surg 1986 ; 95 : 142-152*
- 9) Elnor VM, Strieter RM, Pavilack MA, et al : *Human corneal interleukin-8, IL-1 and TNF-induced gene expression and secretion. Am J Pathol 1991 ; 139 : 977-988*
- 10) Seifert ps, Haeffner-Caaillon N, Appay MD, et al : *Bacterial lipopolysaccharides alter human endothelial cell morphology in vitro independent of cytokine secretion. J Lab Clin Med 1991 ; 118 : 563-569*
- 11) Galy AH, Spits H : *IL-1, IL-4, INF-gamma differentially regulates cytokine production in cultured human thymic epithelial cells. J Immunol 1991 ; 147 : 3823-3830*
- 12) Ehlers Wh, Fishman JB, Donshik Pc, et al : *Neutrophil chemotactic factor derived from conjunctival epithelial cells : Preliminary characterization. CLAO J 1991 ; 17 : 65-68*
- 13) Denburg JA, Gauldie J, Dolovich J, et al : *Structural cell derived cytokines in allergic inflammation. Int Arch Allergy Appl Immunol 1991 ; 1 : 127-132*
- 14) Goust J : *Rheumatoid arthritis. In : Introduction to medical immunology. New York : Marcel Dekker, Inc, 1990 ; 465-479*
- 15) Hus SM, Raine I : *The use of the avidin-biotin-peroxidase complex(ABC) in diagnostic and research pathology. In advances in immunohistochemistry, 2nd Ed. New York, Masson, 1984 ; p31*
- 16) Lundy J, Wanebo HJ, Ponsky C, et al : *Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg 1974 ; 128 : 530-533*
- 17) Wanebo HJ, Jun MY, Strong EW, et al : *T-cell deficiency in patients with squamous cell cancer of the head and neck. Am J Surg 1975 ; 130 : 445-457*
- 18) Wustrow TP, Kabelitz D : *Interleukin-2 release from lymphocyte with head and neck cancer. Ann Otol Rhinol Laryngol 1989 ; 98 : 179-184*
- 19) Strober W, James SP : *The interleukins. Pediatr Res 1988 ; 24 : 549-557*
- 20) Staren ED, Essner R : *Economou JS Overview of biological response modifiers. Semin Surg Oncol 1989 ; 5 : 379-384*
- 21) Borden EC : *Progress toward therapeutic application of interferons, Cancer 1979-1983 ; 54 : 2770-2776*
- 22) Tisdale MJ : *Cancer cachexia. Anti-Cancer 1993 ; Drug(2) : 115-125*
- 23) Moldawer LL, Rogy MA, Lowry SF : *The role of cytokines in cancer cachexia. J Parenteral & Enteral*

- Nutrition* 1992 ; 16(6 suppl) : 43S-49S
- 24) Orosz P, Echtenacher B, Falk W, Ruschoff J, et al : *Enhancement of experimental metastasis by tumor necrosis factor. J Exp Med* 1993 ; 177 : 1391-1398
 - 25) Collini PL, De Giovanni C, Nioletti G, et al : *Enhancement of experimental metastatic activity by tumor necrosis factor-alpha alone or in combination with interferon-gamma. Cli Exp Metastasis* 1992 ; 8 : 215
 - 26) Iizumi T, Yazaki T, Umeda T, et al : *Promotion of metastasis by tumor necrosis factor in rats bearing Dunning R3327 MAT-LyLu prostatic tumor. Urologia Internationalis* 1990 ; 51 : 85
 - 27) Chirivi RG, Garofalo Aa, Paadura IM, et al : *Interleukin-1 receptor antagonists inhibits the augmentation of metastasis induced by IL-1 or LPS in a human melanoma/nude mouse system. Cancer Res* 1993 ; 55 : 505
 - 28) Old LJ : *Tumor necrosis factor(TNF). Science* 1985 ; 230 : 630-632
 - 29) Bentler B, Cerami A : *Cachectin more than a tumor necrosis factor. N Engl J Med* 1987 ; 316 : 379-385
 - 30) Saarinen UM, Koskelo EK, Teppo AM, et al : *Tumor necrosis factor in children with malignancies. Cancer Res* 1990 ; 50 : 592-595
 - 31) Balk F, Burke F, Talbot D, et al : *Evidence for tumor necrosis factor/cachectin production in cancer. Cancer* 1987 ; 28 : 1229-1232
 - 32) Nagler MS, Malik STA, Stamp GWH, et al : *In situ detection of tumor necrosis factor in human ovarian cancer specimens. Int J Cancer* 1990 ; 26 : 1027-1030
 - 33) Takeyama H, Wakamiya N, O'Hara C, et al : *Tumor necrosis factor expression by human ovarian carcinoma in vivo. Cancer Res* 1991 ; 51(16) : 4476-4480
 - 34) Lugassy C, Escande JP : *Immunolocation TNF- α /Cachectin in human melanomas cells : Studies on Co-Cultivated malignant melanoma. J Invest Dermatol* 1991 ; 96 : 238-242,
 - 35) Soyulu L, Ozcan C, Cetik F, et al : *Serum levels of tumor necrosis factor in squamous cell carcinoma of the head and neck. Am J Otolaryngol* 1994 ; 15(4) : 281-285
 - 36) Parks R, Yan SD, Huang CC, et al : *Tumor necrosis factor-alpha production in human head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope* 1994 ; 104 : 860-864
 - 37) Folkman J : *Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res* 1974 ; 34 : 2109-2133
 - 38) Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, et al : *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor alpha. Nature* 1987 ; 329 : 630-632
 - 39) Dayer JM, Bentler B, Cerumi A, et al : *Cachectin/Tumor necrosis factor Stimulates Collagenase and prostaglandin E₂ production by human synovial cells and dermal fibroblast. J Exp Med* 1985 ; 162 : 2163-2168
 - 40) Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, et al : *Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumor necrosis factor. Nature* 1986 ; 319 : 516-518
 - 41) Yan SD, Huang CC : *The role of tumor necrosis factor-alpha in bone resorption of cholesteatoma. Am J Otolaryngol* 1991 ; 12 : 83-89
 - 42) Malik STA, Naylor MS, East N, et al : *Cells secreting tumor necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. Eur J Cancer*, 1990 ; 26 : 1031-1034
 - 43) Spriggs DR, Imamura K, Rodriguez S, et al : *Tumor necrosis factor expression in human epithelial tumor cell lines. J Clin Invest* 1988 ; 81 : 455-460
 - 44) Gallo O, Pinto S, Boccuzzi S, et al : *Monocyte tumor necrosis factor production in head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope* 1992 ; 102 : 447-450
 - 45) Revel M, Zilberstein A : *Interferon-beta 2 living up to its name. Nature* 1987 ; 325 : 582
 - 46) Gauldie J, Richards C, Harnish D, et al : *Interferon-beta 2/B cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci USA* 1987 ; 84 : 7251-7255
 - 47) Kohause M, May LT, Tamm I, et al : *A cytokine network in human diploid fibroblasts : Interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor, platelet-derived factor and interleukin-1. Mel Cell Biol* 1987 ; 7 : 273-280
 - 48) Kirnbauer R, Koch A, Schwarz T, et al : *IFN-beta, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor(IL-6) is expressed and released by human ep-*

- idermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. J Immunol 1989 ; 142 : 1922-1928*
- 49) Mann EA, Spiro JD, Chen LL, et al : *Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinoma. Am J Surg 1992 ; 164 : 567-573*
- 50) Beahrs OM, Hensen DE, Hutter RVP : *Manual for staging of cancer, 3rd Ed. Philadelphia, JB Lippincott Co, 1988 ; p41*