

# 中華民國第 56 屆中小學科學展覽會

## 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學學科

佳作

052008

牙周病菌影響胰臟癌細胞的免疫調控作用

學校名稱：國立高雄師範大學附屬高級中學

作者： 高一 徐華佑	指導老師： 陳桂芳
---------------	--------------

關鍵詞：胰臟癌、牙周病菌、細胞激素

## 摘要

胰臟癌是台灣十大癌症死因的第八位，根據前人研究發現，小鼠若餵牙周病菌，會加速癌症發展，在癌組織中可找到牙周病菌與白血球浸潤的現象，但是牙周病菌引起的發炎現象與胰臟癌病理機制之關聯並不清楚。本實驗探討牙周病菌、胰臟癌細胞與白血球之間的交互作用，發現 Jurkat T 細胞、THP-1 等單核球細胞，以及胰臟癌細胞 BxPC-3 受牙周病菌刺激後，會增加特定趨化因子 (如：CCL-20) 或是細胞激素 (如：IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) 的表現。為探討發炎反應是否影響癌細胞，MTT assay 分析發現白血球釋放的因子會促進胰臟癌細胞的生長，瞭解胰臟癌發展的病理機制，未來在預防和治療上，將提供很重要的訊息。

## 壹、研究動機

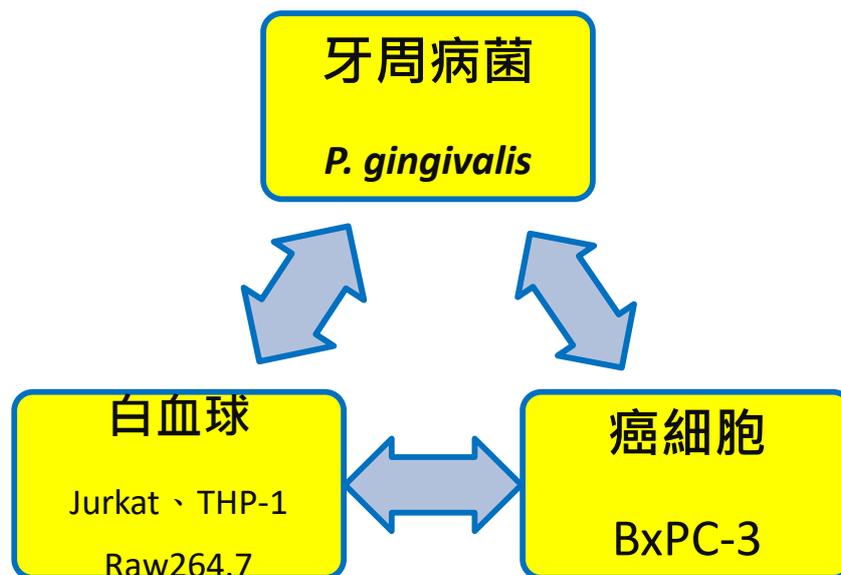
癌症多年來為臺灣十大死因之首，因此人們對於癌症的發生病因、診斷與治療一直盡心盡力地研究著，希望能找到那一絲轉機。生物老師在課堂中曾提到，消化道中的胃幽門桿菌若是在胃中長期導致胃慢性發炎，會提高胃癌的產生機率；在大腸中有益菌與壞菌共存，若是菌種平衡失調，則極有可能導致大腸癌。這些研究都指出一個重要的現象，即消化道中的微生物與癌症發生有很高的關聯性。令人好奇的是，在消化道中是否有其他部位會因為發炎而引發癌症呢？我想到了胰臟癌。在人類的癌症中，胰臟癌相當難在癌症早期發現，而且病人存活率很低，是一種嚴重威脅生命的癌症，根據參考資料 [1] 提到，胰臟的發炎與癌症的產生有關，排除自體免疫的因素後，有沒有可能與前述研究一樣，也是因為微生物所引起的發炎反應呢？那又會是哪一種微生物呢？

在一次逛圖書館時，我看到了“細胞轉型”一書，提到了一位癌症病患，在手術後感染了細菌，因此注射了濃度極高的抗生素，但神奇的是，其餘殘留在病患體內的腫瘤卻意外地消失，似乎是免疫細胞活化之後將癌細胞消滅了。可是這卻違背了我先前的見解，即細菌感染後，應該是會產生發炎反應，而長時間的慢性發炎會促使細胞產生如自由基等物質，這可能是促使癌細胞生成的一個重要因素，但書中描述的這位患者卻有出乎意料的結果。免疫反應究竟是可以對抗癌細胞，或是影響腫瘤微環境而促進癌細胞生長，其機制可能相當複雜，迄今仍未被清楚釐清，這些未解之謎引起我極高的興趣。

牙周病常發生在 35 歲以上的成年人，而 *Porphyromonas gingivalis* (以下以 *P. gingivalis* 表示) 是常見會引發牙周病的菌種，先前研究發現，若是將牙周病菌 *P. gingivalis* 注入罹患胰臟癌老鼠的胃中，會加速癌症的發展，在癌組織中也可以找到牙周病菌，更發現了免疫細胞浸潤到癌組織中，但是細菌、免疫細胞、以及癌細胞互相影響的作用卻仍是個謎，因此本研究嘗試建立研究模式來探討牙周病菌對胰臟癌的影響，進一步瞭解癌症的機制。

## 貳、研究目的

- 一、牙周病菌 *P. gingivalis* 是否會影響胰臟癌細胞 BxPC-3 發炎
- 二、牙周病菌 *P. gingivalis* 是否會影響 Jurkat T 細胞和 THP-1 單核球細胞發炎
- 三、受影響的白血球和胰臟癌細胞是否有相互影響的關係



圖一 研究目的關係圖

## 參、研究設備及器材

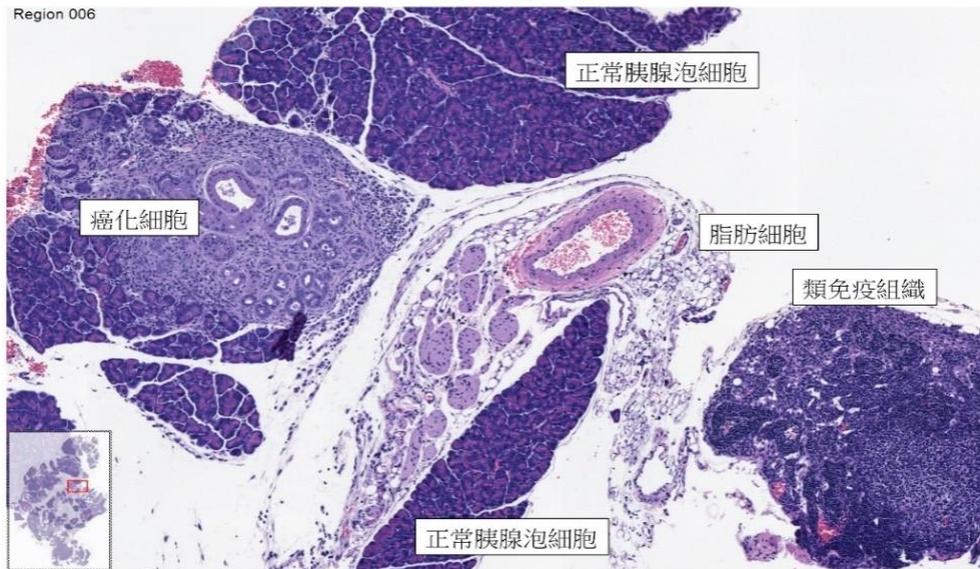
### 一、文獻探討

現今醫學已證實，胃幽門桿菌會引起胃的發炎，而長時間的慢性發炎會讓胃附近的細胞產生病變，使得細胞內的基因不穩定而容易產生突變，可能是抑癌基因 (tumor suppressor genes) 的破壞、或是致癌基因 (oncogenes) 的活化，最後引發癌症。因此，細菌感染造成組織慢性發炎，會進一步導致癌症發生的現象也漸漸受到重視。在 2006 年的時候，哈佛大學公衛學院的報告指出，分析資料庫中 216 位罹患胰臟癌的病人時，把吸菸、糖尿病、肥胖、運動、飲食等因素都考慮進去之後，最後發現有牙周病病史的人，罹患胰臟癌的風險比一般人高 63% [2]，但是在這篇報告中，並沒有指出為何有牙周病史的人會讓罹癌率增加。

在細胞轉型 (Steven Rosenberg 著) 一書中 [3]，提到癌症病患在開刀後感染細菌，為了將腹部的膿引流出來而施行了第二次手術，並且注射了濃度極高的抗生素。後來在患者身體的腫瘤附近，發現了許多的嗜酸性白血球及淋巴球聚集在腫瘤組織。引人注意的是在手術後，患者康復，而且腫瘤消失了，因此白血球引起的免疫反應被認為與腫瘤消失有關。近年腫瘤免疫學的研究愈趨熱門，許多科學家認為免疫細胞會攻擊癌細胞，使腫瘤消失；但是也有科學家認為免疫細胞會導致組織慢性發炎的現象，使得細胞內的基因不穩定，反而會導致癌病變的發生。究竟免疫細胞引起的發炎反應對癌症發展的影響為何，迄今仍有許多地方未被闡明。

胰臟發炎與癌化已經被證實是有密切關聯 [1]，在利用基因轉殖引發胰臟癌的動物模式中 [4]，若是將牙周病菌 *P. gingivalis* 注入罹患胰臟癌老鼠的胃中，會加速癌症的發展，在癌組織中也可以找到牙周病菌，更發現了免疫細胞浸潤到癌組織，以及形成類免疫組織的現象 (圖二)。身體內的免疫細胞除了抵抗牙周病菌以外，在癌症發展過程中也已經被證實有重要的影響，但是這樣的發炎現象與牙周病菌是否有關並未被證實，而牙周病菌刺激白血球活化的作用，對胰臟癌症發展的影響仍是未知。

## 小鼠胰臟腫瘤切片



圖二  $Kras^{G12D/+} Pdx-1-Cre$  小鼠胰臟癌組織附近出現類免疫組織。  
全圖為左下角腫瘤組織切片經 H&E 染色與全景掃描後，將紅框區域放大的結果  
(取自於成大醫技系實驗室)

## 二、研究設備

- (一) 無塵抽氣操作台 (Biosafety Cabinet Class . Type a2)
- (二) 倒立顯微鏡 (Nikon Eclipse TS100)
- (三) 培養皿
  1. 細胞培養瓶 (Flask)
  2. 6-cm 細胞培養皿 (Dish)
  3. 細菌培養盤 (Agar Plate)
- (四) 離心機 (Centrifuges)
- (五) 細胞濃度測定儀 (Ultrospec 10)
- (六) 濃度測定用試管 (Cuvette)
- (七) 試管震盪器 (vortex-2 genie)
- (八) 微吸管 (micropipette)
- (九) 電動吸管 (Pipet-aid)
- (十) 凝膠電泳 (Gel electrophoresis)
- (十一) 紫外光照膠系統 (ImageQuant 300)
- (十二) 梯度 PCR 溫度循環控制儀 (Mastercycler Gradient)

### 三、培養液

- (一) RPMI-1640 是培養細胞的培養液。成分詳 [7]
- (二) FBS 是胎牛血清，常跟 RPMI-1640 一起加，其中含有細胞所需的激素和生長因子，可刺激細胞生長。
- (三) 細菌培養液 ATCC Medium:2722 Supplemented Tryptic Soy Broth/Agar

成分:

- 1. Tryptic Soy Broth.....30.0 g
- 2. Tryptic Soy Broth..... 30.0 g
- 3. Yeast Extract.....5.0 g
- 4. L-cysteine hydrochloride..... 0.5 g
- 5. Hemin Stock (see below) .....1.0 ml
- 6. Vitamin K1 Stock (5 mg/ml)...0.2 ml
- 7. DI water.....1000 ml

➤ Hemin Stock Solution : Hemin (0.5 g)、 $K_2HPO_4$  (1.74 g)、DI water (100 ml)

細菌培養液置入高溫高壓蒸汽滅菌鍋中，加熱到 121°C 經過 15 分鐘，即完成滅菌 (圖三)。

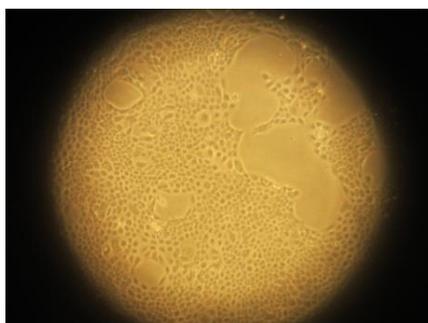


圖三 經過滅菌的細菌培養液

### 四、研究材料

- (一) 人類胰臟癌細胞 (取自成大醫技系實驗室)

人類胰臟癌細胞株 BxPC-3 (圖四)，以含有 10% 的胎牛血清 (FBS) 的 RPMI-1640 培養在 Flask 中。



圖四 人體胰臟癌細胞株 BxPC-3 (100X)

將細胞株放在 Flask 中培養到九分滿以後，將培養液吸出，加入 Trypsin & EDTA (TE) 使細胞脫離培養瓶底部，經顯微鏡觀察，待至大多數細胞懸浮，加入 RPMI-1640 培養液來稀釋 TE，再加入 FBS 讓 TE 酵素的作用減緩，避免細胞繼續受到酵素作用而受傷害。迅速將充分混合的液體吸到離心管中，以每分鐘 1200 轉的速度離心，讓細胞沉降至試管底部，倒掉廢液，將細胞彈鬆後，再加入 RPMI-1640，進行第二次離心。離心後加入 RPMI-1640 12ml，分配到 3 個 6-cm 培養皿中 (各加入細胞 3 ml + RPMI-1640 1.5 ml + FBS 0.5 ml)，使細胞貼附在培養皿以利後續實驗，剩餘的細胞再放回 Flask 繼續培養。

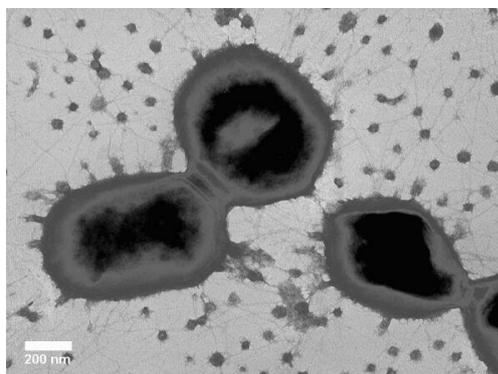
## (二) 牙周病菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)

*P. gingivalis*(圖五) 屬於 Bacteroidetes 門 (擬桿菌門)，外觀成棒狀，此菌為革蘭氏陰性，有厭氧的特性。

培養方法一：

*P. gingivalis* 為厭氧菌，將細菌均勻塗在含有洋菜膠的細菌培養盤，放置於灌入氮氣的厭氧恆溫 37°C 培養箱中。

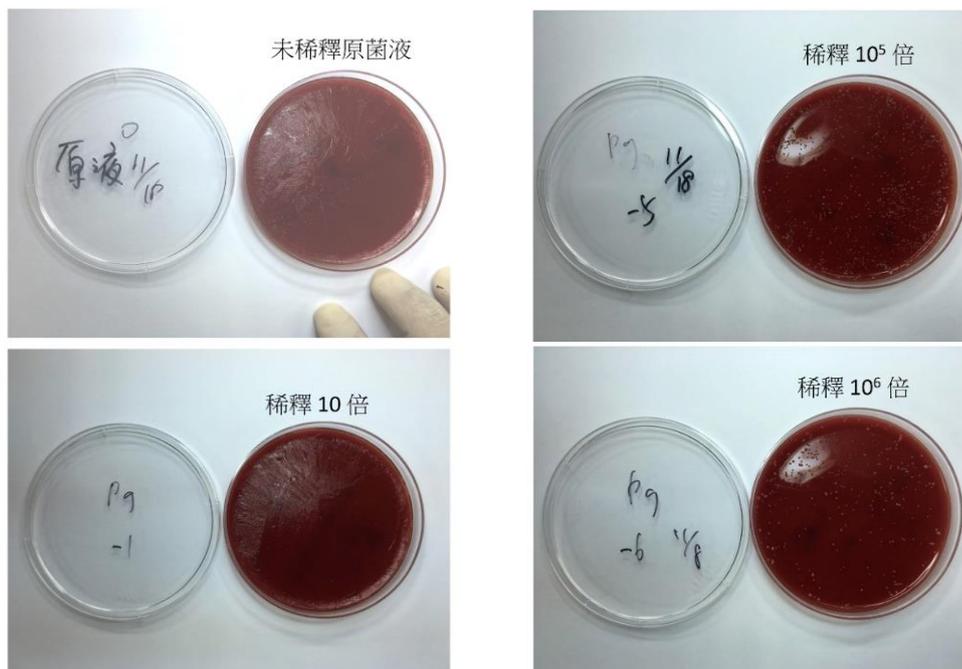
培養方法二：以接種環將細菌接種至細菌培養液 (ATCC Medium:2722 Supplemented Tryptic Soy Broth/Agar) 中，培養於試管，放置於灌入氮氣的厭氧恆溫 37°C 培養箱中輕輕搖晃生長。



圖五 牙周病菌 *Porphyromonas gingivalis* [8]

(圖片來源：[http://en.citizendium.org/wiki/Porphyromonas\\_gingivalis](http://en.citizendium.org/wiki/Porphyromonas_gingivalis))

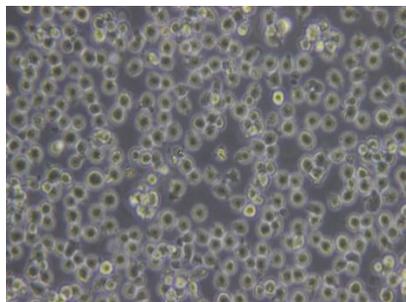
菌液經連續稀釋後塗盤，以厭氧細菌培養箱培養至長出菌落以後，計算稀釋到  $10^5$  和  $10^6$  倍的培養盤，回推得知未稀釋原菌液中的細菌濃度為  $1.314 \times 10^8/\text{ml}$ ，而利用分光光度計來檢測菌液吸光值時，測得原菌液的 OD 值為 0.52，無菌細菌培養液的 OD 值為 0.05 (blank)，因此當利用細菌培養液將原菌液稀釋到測得的 OD 值為 0.41 時，此時的細菌濃度即為  $1 \times 10^8/\text{ml}$ ，可以用於後續實驗之中。



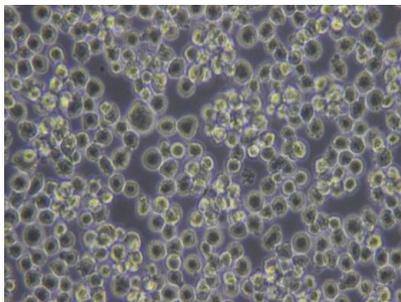
圖六 *P. gingivalis* 菌落

### (三) 白血球細胞株 (取自成大醫技系實驗室)

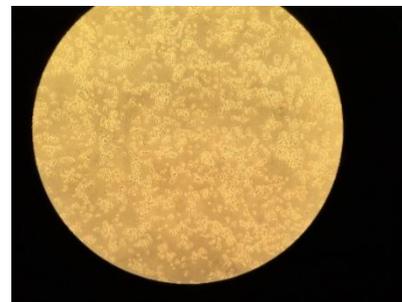
人類 Jurkat T 細胞株 (圖七)、人類單核球細胞株 THP-1 (圖八)、以及小鼠單核球細胞株 Raw264.7 (圖九) 來進行實驗。這些細胞株都培養在含有 10% 的胎牛血清的 RPMI-1640 中。



圖七 人類 Jurkat T 細胞株 (400X)



圖八 人類單核球細胞株 THP-1 (400X)



圖九 小鼠單核球細胞株 Raw264.7 (400X)

白血球細胞株的培養方法如同胰臟癌細胞株。

## 五、實驗用引子

### (一) Human primer pairs

	Forward	Reverse
IL-1 $\beta$	5'-ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA-3'	5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT-3'
IL-6	5'-GTAGCCGCCCCACACAGA-3'	5'-GTCTCCTCATTGAATCCAG-3'
IL-10	5'-GGGTTACCTGGGTTGCCAAGC-3'	5'-TCGATGACAGCGCCGTAGCC-3'
IL-17A	5'-CAATCCCACGAAATCCAGGATG -3'	5'-GGTGGAGATTCCAAGGTGAGG-3'
TGF- $\beta$ 1	5'-CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3'	5'-GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3'
TNF- $\alpha$	5'-GTTCCCCAGGGACCTCTCTC-3'	5'-AGGGCATTGGCCCGGCGGTT-3'
CCL-20	5'-CTGGCTGCTTTGATGTCAGT-3'	5'-CGTGTGAAGCCCACAATAAA-3'
CXCL-12	5'-TCAGCCTGAGCTACAGATGC-3'	5'-CTTTAGCTTCGGGTCAATGC-3'
COX2	5'-CAAAAGCTGGGAAGCCTTCT-3'	5'-CCATCCTTGAAAAGGCGCAG-3'
$\beta$ -actin	5'-AGCGGGAAATCGTGCGTG-3'	5'-CAGGGTACATGGTGGTG-3'

### (二) Mouse primer pairs

	Forward	Reverse
IL-1 $\beta$	5'-GCAAGTGTCTGAAGCAGCTATG-3'	5'-CCACAGCCACAATGAGTGATAC-3'
IL-6	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCA-3'	5'-TCCACGATTTCCAGAGAAC-3'
IL-10	5'-TGCACTACCAAAGCCACAAGGCA-3'	5'-TCGGTTAGCAGTATGTTGTCCAGC-3'
$\beta$ -actin	5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC-3'	5'-TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'

## 肆、研究過程及方法

### 一、細菌定量：

#### (一) 將細菌溶液利用分光光度計測定光學吸光值 (Optical Density; OD)：

把 500  $\mu\text{l}$  無菌的細菌培養液放入透明 cuvette 中，利用分光光度計測定透光度，先在儀器上設定這個吸光值為 blank 而歸零。使用試管震盪器將細菌充分混和均勻，其後將 500  $\mu\text{l}$  菌液也放入 cuvette 中，同樣利用檢測透光度而得到另一個吸光值。後續再將菌液進行連續稀釋 (Serial Dilution) 後塗盤計算菌數，可得一條線性函數，往後只要利用分光光度計測定吸光值而檢測得到細菌濃度，就可以套用此線性函數而直接換算出菌液中細菌的含量，不需要再經過連續稀釋和塗盤培養。

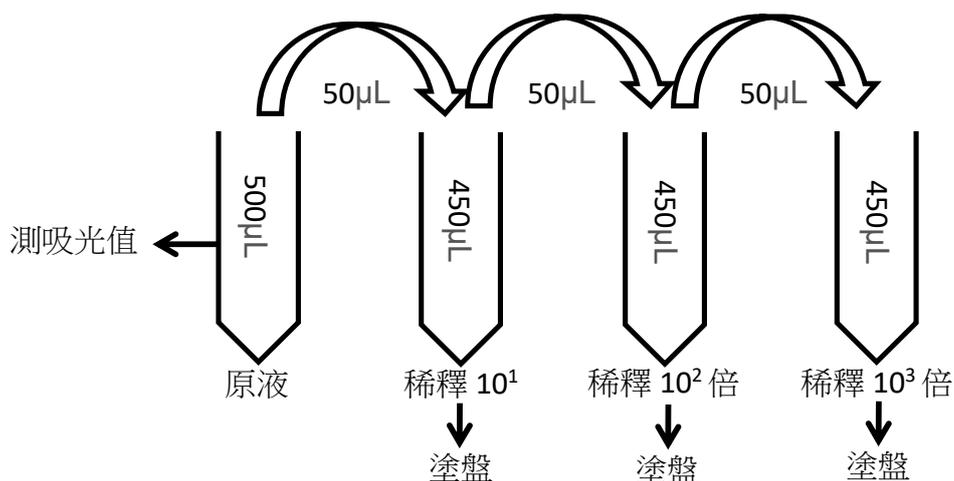
#### (二) 連續稀釋 (Serial Dilution)

在容積為 1.5-ml 的無菌小試管 (microcentrifuge tube) 中，都加入 450  $\mu\text{l}$  滅過菌的細菌培養液，以方便進行連續稀釋。

此菌因為較黏而不易分散在培養液中，故先使用試管震盪器將細菌充分混和均勻。用微量吸管從含有原菌液的試管中吸取 50  $\mu\text{l}$ ，加入已含有 450  $\mu\text{l}$  無菌細菌培養液的無菌小試管中，使最終體積達 500  $\mu\text{l}$ ，即完成 10 倍稀釋。接著再將已經完成 10 倍稀釋的菌液以震盪器充分混合後，從中吸取 50  $\mu\text{l}$  加入另一試管，即完成  $10^2$  倍稀釋。繼續重複以上動作，稱為連續稀釋法，每重複一次即可得到稀釋 10 倍的菌液 (圖十)。

#### (三) 塗盤培養

以微量吸管吸取 100  $\mu\text{l}$  連續稀釋後的菌液，放在細菌培養盤 (agar plate) 中，用消毒過的玻璃棒，將細菌均勻分散塗滿，之後把培養盤倒置放入充滿氮氣的厭氧恆溫培養箱中，在 37°C 培養 2~3 天，計數菌落數目，一個菌落即代表原先有一個細菌在這裡，乘上稀釋倍數後，即可回推細菌含量。



圖十 連續稀釋示意圖

## 二、細胞與細菌共同培養

使用 *P. gingivalis* 菌液來進行刺激。當細菌被加到癌細胞或是白血球細胞株時，一定要置入含有 5% 二氧化碳的 37°C 恆溫培養箱中進行培養，才能維持細胞株的活性，但在此時，細菌一定會接觸到氧氣，活性有可能會變得比較差，因此以細菌的產物來刺激細胞株，再相互比較。

- (一) 時間差的實驗 (Time course)：分析細胞受到細菌刺激後，隨時間 (3、6、12 小時) 延長所出現的變化。
- (二) 濃度反應實驗 (Dose response)：分析細胞受到不同量的細菌刺激後，隨菌量增加所出現的變化。

## 三、萃取細胞的 RNA

將受到細菌刺激過後的細胞收集離心後，倒除培養液，加入 1 ml RNA 萃取試劑 (Trizol) 後，輕輕沖吸混合直至溶液呈現透明果凍狀，再將液體轉置入微量離心管之中。在每個微量離心管中加入 200 μl 三氯甲烷 (chloroform)，搖晃混合直至液體呈現乳粉紅色後，於 4°C 以 12000 rpm 的轉速離心 15 分鐘。離心後溶液會形成三層分層，利用微量吸管小心地吸取最上層含有 RNA 之水層，再加入到新的微量離心管之中，這個過程要避免吸取到其他層之溶液，以免影響萃取得到之 RNA 品質。加入與所吸取的水層等體積的異丙醇 (Isopropanol)，搖晃使其混合均勻後，再以 12000 rpm 的轉速，在 4°C 的



(二) 吸光值測定：將細胞的 RNA 萃取出來後，利用分光光度計進行吸光值測定，使用的吸光值波長分別為 230 nm、260 nm 及 280 nm。利用波長 230 nm 得到的吸光值是有機鹽類的殘留量，260 nm 是測量核酸濃度(包括 DNA 及 RNA)，280 nm 則是測量蛋白質濃度。吸光值 260/230 的比例應介於 2~2.4 間，吸光值 260/280 的比例應介於 1.9~2.1。

## 五、DNA 反轉錄 (reverse transcription)

實驗取 5 µg 之 RNA，加入含有 RNase inhibitor 之 Milli-Q 純水，使其最終體積為 35.5 µl，再加入 1 µl 濃度為 500 µg/ml 之 oligo(dT) primer，混合均勻後放置於 PCR 溫度循環控制儀中，以 65°C 先加熱 5 分鐘，隨後於室溫中靜置 10 分鐘使 oligo(dT) primer 緩緩與 RNA 結合，之後再加入：

10 mM dNTP	2.5 µl
5X RT buffer	10 µl
MMLV-reverse transcriptase	1 µl

同樣置於 PCR 溫度循環控制儀中，以 37°C 作用 2 小時後，加熱至 90°C 維持 5 分鐘使 reverse transcriptase 失去活性，合成之 cDNA 冷凍保存於 -20°C 冰箱內備用。

## 六、聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR) [10]

利用特定鹼基序列的引子 (primer)，PCR 還可針對引子對應的特定基因序列，進行特異性的擴增。人工所合成之一對引子的序列，是依據被擴增區域的兩側邊界 DNA 序列所決定的，而且每個引子可分別與相對的一股 DNA 互補。

### (一) 標準 PCR 反應試劑

1. DNA 模板 (cDNA) 1 µl
2. 引子 (Forward primer 1 µl、Reverse primer 1 µl)
3. Taq DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 0.2 µl
4. dNTP (dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 2 µl
5. PCR 反應緩衝液 (10x reaction buffer) 2 µl
6. 水 12.8 µl

## (二) PCR 三步驟 (循環 35 次):

### 1. 變性 (denature)

溫度：95°C。時間：第一次 2 分鐘，接下來都 1 分鐘。

模板 DNA 在 95°C 左右的高溫條件下，雙螺旋 DNA 間的氫鍵斷裂，雙股 DNA 解鏈成為單股 DNA，並游離於反應液中。

### 2. 沾黏 (annealing)

溫度：60°C。時間：1 分鐘。

人工合成的兩個寡核苷酸 (oligonucleotide) 引子在適當的溫度下，分別與模板 DNA 擴增區域的兩個側翼準確配對結合。由於添加的引子數量和模板 DNA 的分子數相比之下遠遠過量，因此引子與模板 DNA 形成複合物的機率，遠遠高於 DNA 分子自身的複合性。

### 3. 延伸 (extension)

溫度：72°C。時間：1 分鐘，最後一次 10 分鐘。

在四種 dNTP 及 Mg<sup>2+</sup> 存在等的條件下，Taq DNA 聚合酶在最適當的作用溫度下，可將核苷酸從引子的 3'-OH 端，依序沿模板由 5' 往 3' 的方向延伸合成新的互補股，每一循環的產物將可作為下個循環的模板。

## 七、膠體電泳 (agarose gel electrophoresis)

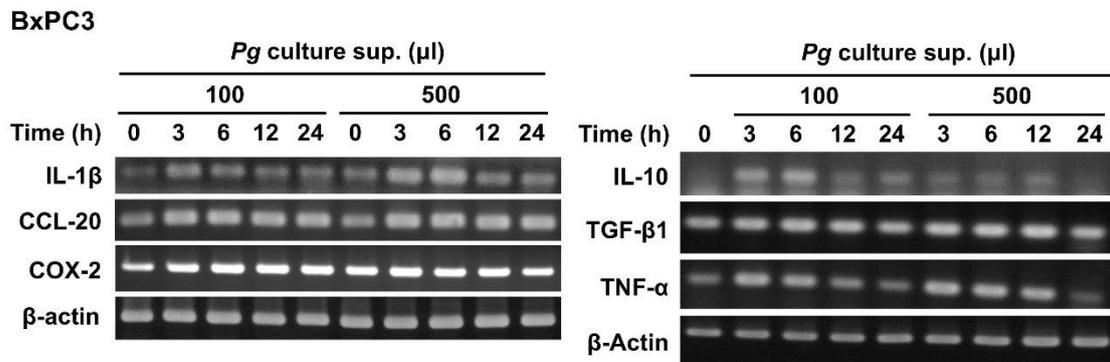
將待測樣品混合均勻後，用微量吸管吸出 5 µl，與 1 µl 的 6x loading buffer (內含 bromophenol blue 及甘油) 混合，再緩緩注入膠體孔洞中，並在最側邊的孔洞中加入 100-bp 標準液 (marker) 來標定 DNA 分子大小。以 100V 的電壓通電，進行 30 分鐘的電泳。電泳後，將洋菜膠放入 Ethidium Bromide (EtBr) 中染色約 3~5 分鐘，再移往清水中浸泡 10 分鐘以去除多餘的 EtBr，將染色後的洋菜膠利用紫外光照膠系統 (ImageQuant 300) 用紫外光激發進行拍攝。

## 伍、研究結果

### 一、人類胰臟癌細胞株 BxPC-3 受 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內的基因表現情形：

首先探討 BxPC-3 胰臟癌細胞在受到不同量 *P. gingivalis* 菌液刺激後，隨時間增加，細胞內基因的改變情形，以 time course 與 dose response 的實驗進行分析。BxPC-3 細胞受刺激 3、6、12、24 小時後，收集細胞並且純化 RNA，先利用分光光度計測定 RNA 樣品的濃度和品質，接著以 RT-PCR 的方法分析細胞內基因的表現情形。

#### (一) time course



圖十二 BxPC-3 胰臟癌細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內趨化因子和細胞激素的表現情形。

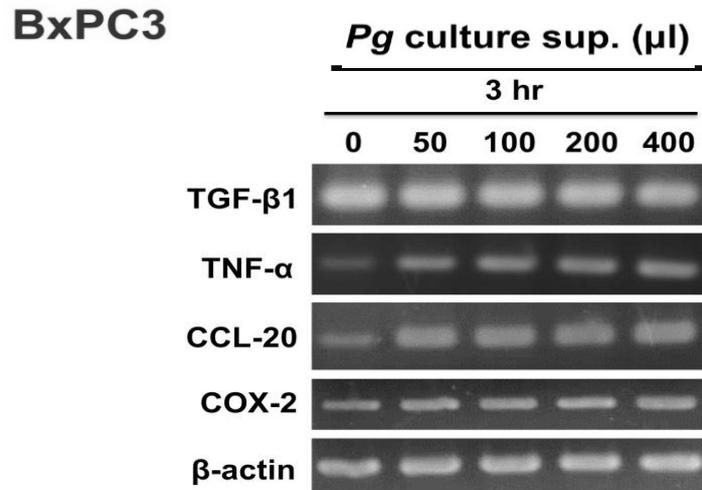
先利用分析  $\beta$ -actin 基因表現，觀察是否取得等量樣品來分析比較。

結果如圖十二所示， $\beta$ -actin 基因表現量相當一致，得知此次 BxPC-3 細胞實驗取樣的樣本沒有問題，可以用來分析其他基因（例如趨化因子和細胞激素）的表現情形。

進一步的實驗結果發現，BxPC-3 細胞受到刺激後，細胞內與發炎反應有關的 **IL-1 $\beta$** 、**COX-2**、**TNF- $\alpha$**  在刺激後 3 小時即顯著增加，並且多隨著加入高量 *P. gingivalis* 菌液 (500  $\mu$ l) 而有更高的趨勢。TGF- $\beta$ 1 的表現量似乎有微量增加，但須更進一步實驗來驗證。

值得注意的是，BxPC-3 癌細胞內的趨化因子 **CCL-20** 在受到刺激後 3 小時也有顯著上升的現象，暗示著癌細胞有可能藉由產生趨化因子，吸引白血球進入腫瘤之中，導致癌組織發炎的現象。

(二) dose response



圖十三 BxPC-3 胰臟癌細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內趨化因子和細胞激素的表現情形。

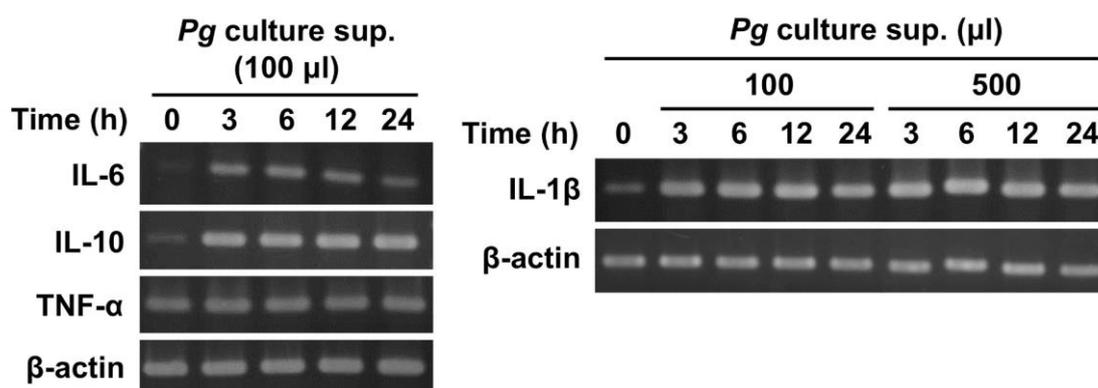
利用  $\beta$ -actin 基因表現，先觀察是否取得等量樣品來分析比較。結果如圖十三所示， $\beta$ -actin 基因表現量相當一致。

實驗結果發現，BxPC-3 細胞受到刺激後，細胞內與發炎反應有關的 **TNF- $\alpha$**  表現量隨著 *P. gingivalis* 菌液的濃度而增加，並且濃度愈高 (50  $\mu$ l 到 400  $\mu$ l) 時的作用愈明顯。值得注意的是，BxPC-3 癌細胞在受到刺激後，細胞內的趨化因子 **CCL-20** 表現量也明顯增加，再次確認與 time course 有著相同的結果。這些結果暗示著癌細胞有可能藉由產生趨化因子，吸引白血球進入腫瘤之中，導致癌組織發炎的現象。

## 二、小鼠 Raw264.7 單核球細胞受 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內的基因表現情形：

測試小鼠 Raw264.7 單核球細胞在受到不同量 *P. gingivalis* 菌液刺激後，隨時間增加，細胞內基因的改變情形。實驗中，Raw264.7 細胞受到刺激 3、6、12、24 小時後，收集細胞並且純化 RNA，利用分光光度計測定 RNA 樣品的濃度和品質，接著進一步以 RT-PCR 的方法分析細胞內基因的表現情形。

### Raw264.7



圖十四 Raw264.7 單核球細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內細胞激素的表現情形。

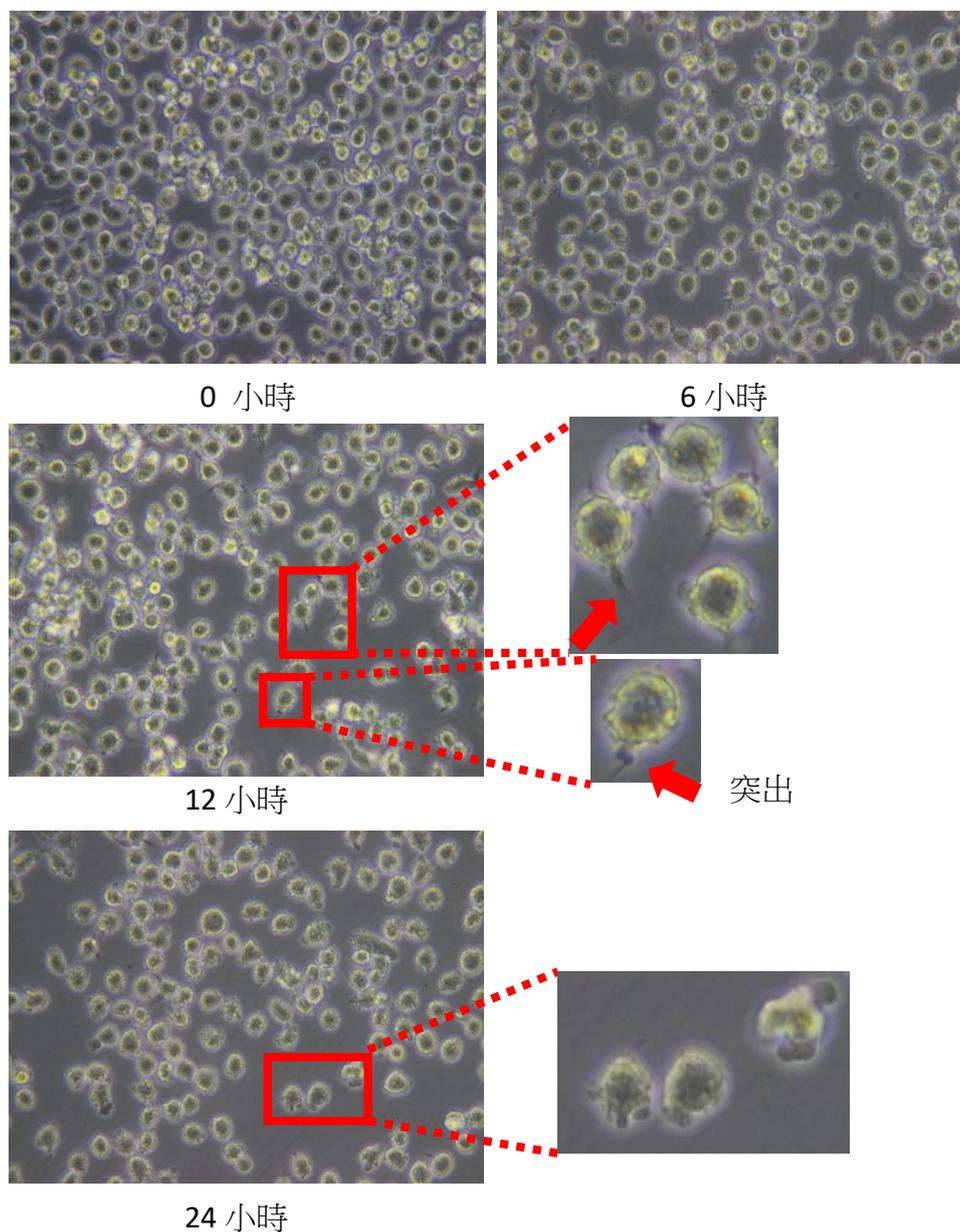
先利用  $\beta$ -actin 基因表現，來觀察是否取得等量樣品進行分析比較。結果如圖十四所示， $\beta$ -actin 基因表現量相當一致，顯示此次 Raw264.7 細胞實驗樣本 RNA 定量沒有問題，可以用來分析其他基因的表現情形。

實驗結果發現，Raw264.7 細胞受到刺激後，細胞內與發炎反應有關的 **IL-1 $\beta$** 、**IL-6** 在刺激後 3 小時即顯著增加，**IL-6** 的表現量在刺激後 24 小時後**降低下來**，但是 **IL-1 $\beta$**  增加的現象**維持到 24 小時以後**。這次實驗的結果測得另一個與發炎反應有關的**細胞激素 TNF- $\alpha$**  並沒有隨著刺激而增加，但十分有趣的是，與免疫調控有關的 IL-10 也隨著菌液刺激而增加，IL-10 增加的現象對於癌組織的作用則有待後續實驗分析。

三、人類單核球 THP-1 細胞受 *P. gingivalis* 菌液刺激後，不同時間其細胞型態的變化、和細胞內基因表現的情形：

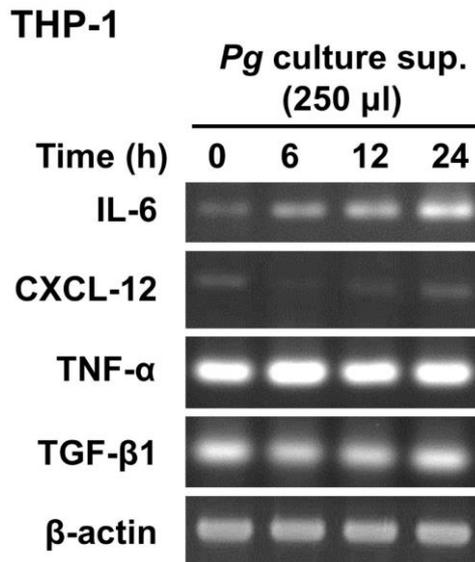
THP-1 細胞培養在 5 ml 細胞培養液中，加入 250  $\mu$ l 的菌液以後，分別等待 0、6、12、24 小時，觀察細胞型態的變化、和細胞內基因表現的情形。

(一) 細胞受刺激後照片



圖十五 人類 THP-1 單核球細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞型態改變的情形。(400x)

如圖十五可以看到 THP-1 單核球細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，經過 12 小時可以很明顯地看到細胞型態改變(突出)，24 小時的細胞內部已呈現混濁狀，由此可知，THP-1 細胞已對 *P. gingivalis* 菌液的刺激產生了反應，有受到活化的現象。



圖十六 人類 THP-1 單核球細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內趨化因子和細胞激素的表現情形。

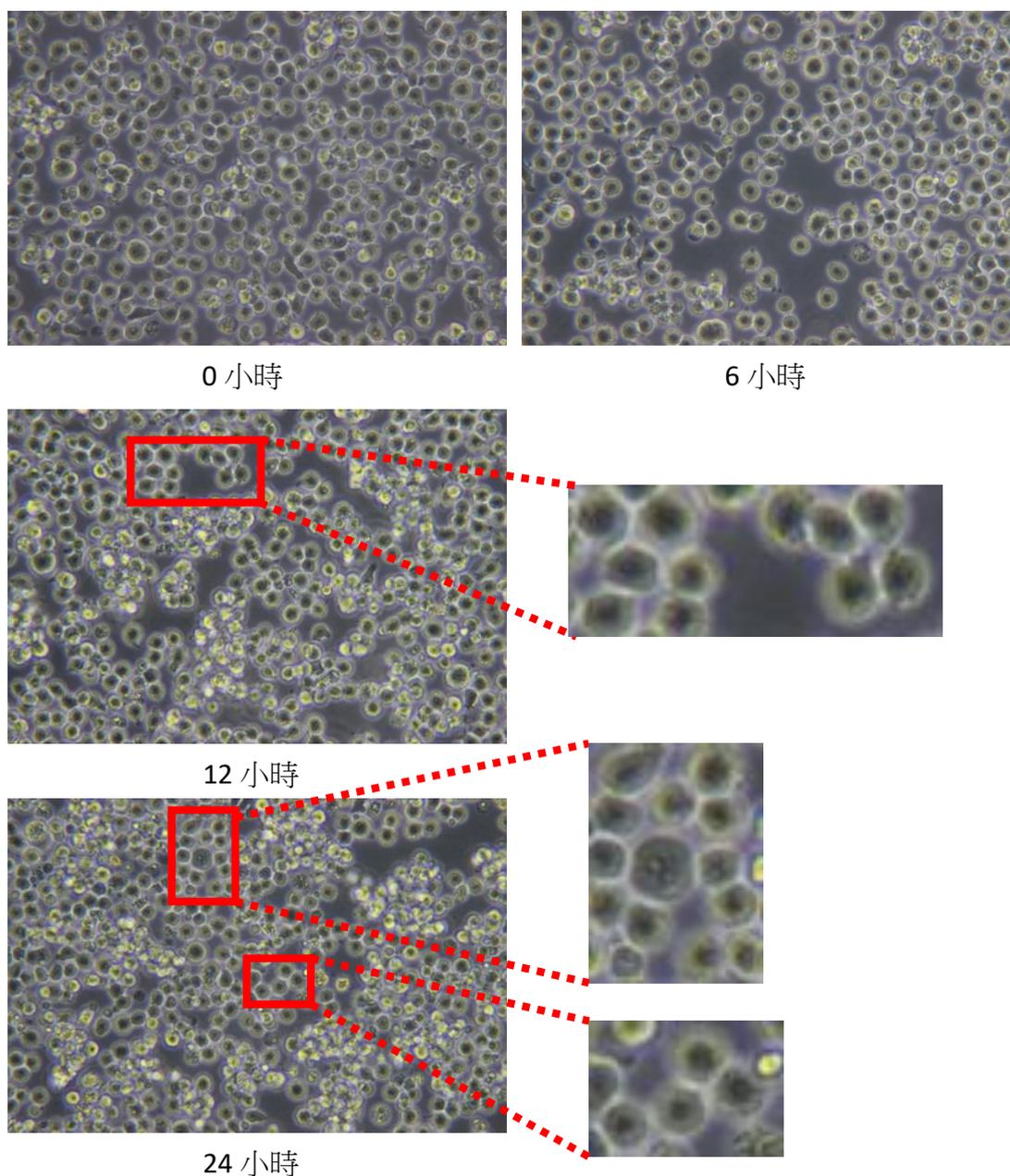
結果如圖十六所示， $\beta$ -actin 基因表現量相當一致，顯示此次 THP-1 細胞實驗樣本 RNA 定量沒有問題，可以用來分析其他基因的表現情形。

實驗結果發現，與小鼠 Raw264.7 單核球細胞的實驗結果類似，THP-1 細胞受到刺激後，細胞內與發炎反應有關的 **IL-6** 在刺激後六小時即顯著增加，其表現量在 24 小時仍持續提高。另一個與發炎反應有關的細胞激素 **TNF- $\alpha$**  在刺激後六小時似乎也有增加。初步結果顯示趨化因子 CXCL-12 與細胞激素 TGF- $\beta$ 1 的表現量似乎沒有明顯受到影響，未來也將進一步分析確認。

四、人類 Jurkat T 細胞受 *P. gingivalis* 菌液刺激後，不同時間其細胞型態的變化、和細胞內基因表現的情形：

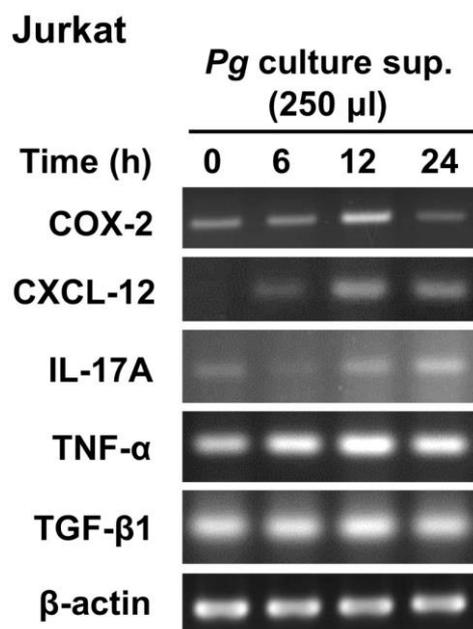
Jurkat T 細胞培養在 5 ml 細胞培養液中，加入 250  $\mu$ l 的菌液以後，分別等待 0、6、12、24 小時，觀察細胞型態的變化、和細胞內基因表現的情形。

(一) 細胞受刺激後照片



圖十七 人類 Jurkat T 細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞型態改變的情形。(400x)

如圖十七可以看到 Jurkat T 細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內部開始產生變化，比較 0 小時和 24 小時，細胞核已經沒有那麼的明顯了，而且細胞有些微增加的趨勢，由此可知，Jurkat T 細胞已對 *P. gingivalis* 菌液刺激產生了反應。



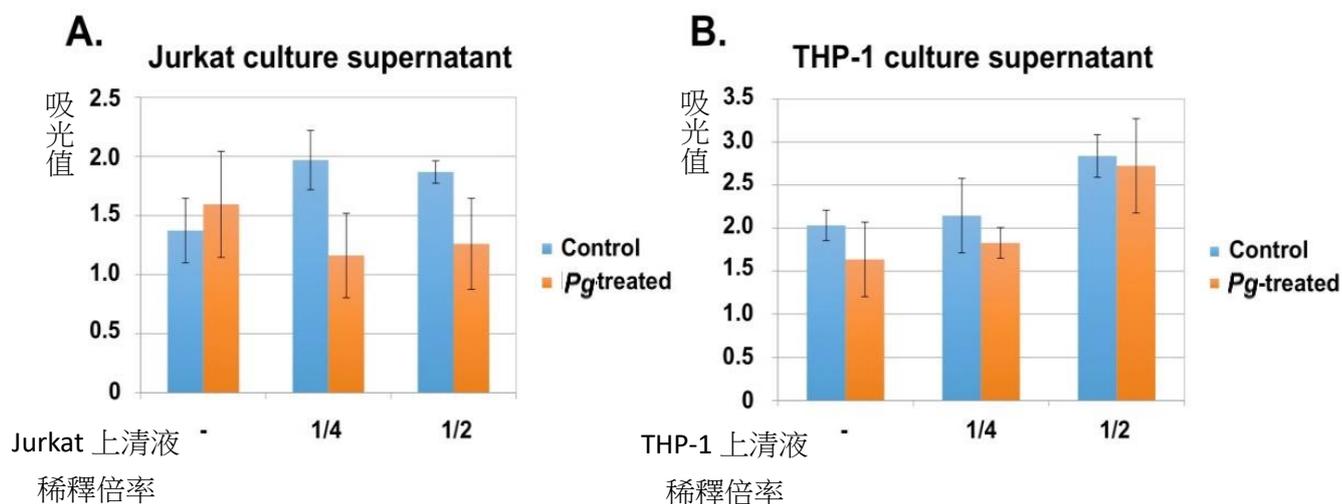
圖十八 人類 Jurkat T 細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞內趨化因子和細胞激素的表現情形。

結果如圖十八所示， $\beta$ -actin 基因表現量相當一致，顯示此次 Jurkat T 細胞實驗樣本 RNA 定量沒有問題。

實驗結果發現 Jurkat T 細胞在受到刺激以後，與發炎反應有關的環氧化酶 COX-2 (cyclooxygenase-2)、以及細胞激素 **IL-17A** 和 **TNF- $\alpha$**  都有隨著時間增加的現象，另外，與免疫調控反應有關的細胞激素 TGF- $\beta$ 1 變化並不明顯，未來將會繼續確認。同時也發現 Jurkat T 細胞在受到刺激以後會增加趨化因子 CXCL-12 的表現量，這個現象對癌症發展的意義將待後續進一步的實驗分析。

## 五、交互作用

為了觀察細胞之間的交互作用，實驗初步先分析免疫細胞在受到 *P. gingivalis* 刺激後，細胞所釋放出的物質是否會影響胰臟癌細胞的生長。我們先準備 THP-1 和 Jurkat T 細胞各兩盤，分別都在其中一盤加入 250  $\mu$ l 的 *P. gingivalis* 菌液，另一盤則沒加而做為控制組 (control)。待免疫細胞受刺激一小時後，將 THP-1 和 Jurkat T 細胞收集到離心管離心，倒掉上清液以去除菌液，利用細胞培養液將細胞清洗一次以後，重新加入新鮮的細胞培養液和胎牛血清，放在全新的培養盤中，置入細胞培養箱中進行培養。等待 24 小時後將細胞培養上清液收集起來，以不同濃度加入 BxPC-3 細胞中 (2 倍稀釋與 4 倍稀釋)，利用 MTT assay 看看 BxPC-3 的生長情形，分析癌細胞是否會因為受到免疫細胞釋放物質的刺激而產生變化。



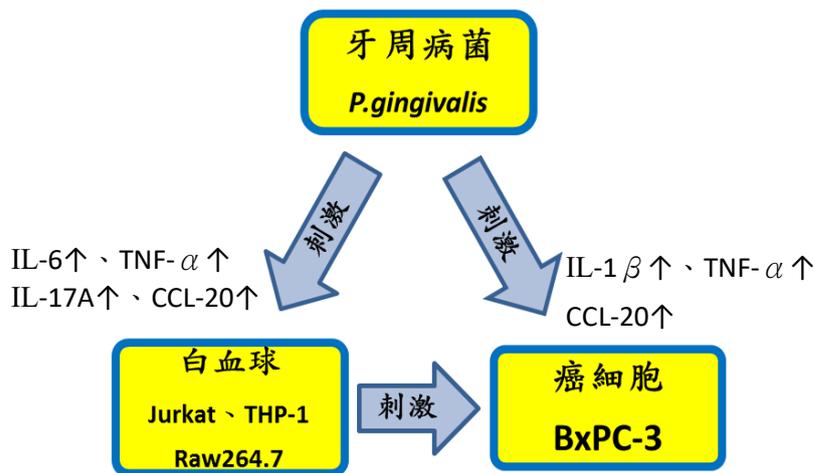
圖十九 人類 Jurkat T 和 THP-1 單核球細胞受到 *P. gingivalis* 菌液刺激後，細胞所分泌的物質對 BxPC-3 胰臟癌細胞生長的影響。

實驗結果如圖十九所示，免疫細胞所分泌的物質似乎會對 BxPC-3 細胞生長有刺激的作用，但是受到菌液刺激過後的 Jurkat T 細胞似乎失去這個作用 (圖十九 A)，而 THP-1 細胞分泌的物質也會刺激 BxPC-3 細胞生長，然而 THP-1 細胞是否受過菌液刺激並不改變這個現象。

## 陸、討論

### 一、牙周病菌 *P. gingivalis* 刺激不同細胞分泌細胞激素的比較分析 (圖二十)

經 *P. gingivalis* 菌液刺激過的細胞，都會產生導致發炎反應的細胞激素，如：IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6，這些發炎反應極有可能是影響癌細胞生長的因素。在 BxPC-3 受菌液刺激後，產生了 IL-1 和 TNF- $\alpha$  進而導致發炎，但抑制發炎的 TGF- $\beta$ 1 卻沒有顯著的增加，IL-10 雖然也有增加，推論是因應發炎現象而產生的制衡反應。實驗另外還發現，BxPC-3 會分泌 CCL-20 吸引免疫細胞進入到發炎部位，透過用菌液刺激 THP-1、Jurkat 和 Raw264.7 後發現，THP-1、Jurkat 和 Raw264.7 在接觸到菌液時也會分泌導致發炎反應的細胞激素，如：IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ，甚至還會分泌 CXCL-12 吸引更多免疫細胞。



圖二十 細胞間的相互作用

### 二、交互作用實驗的實質意義

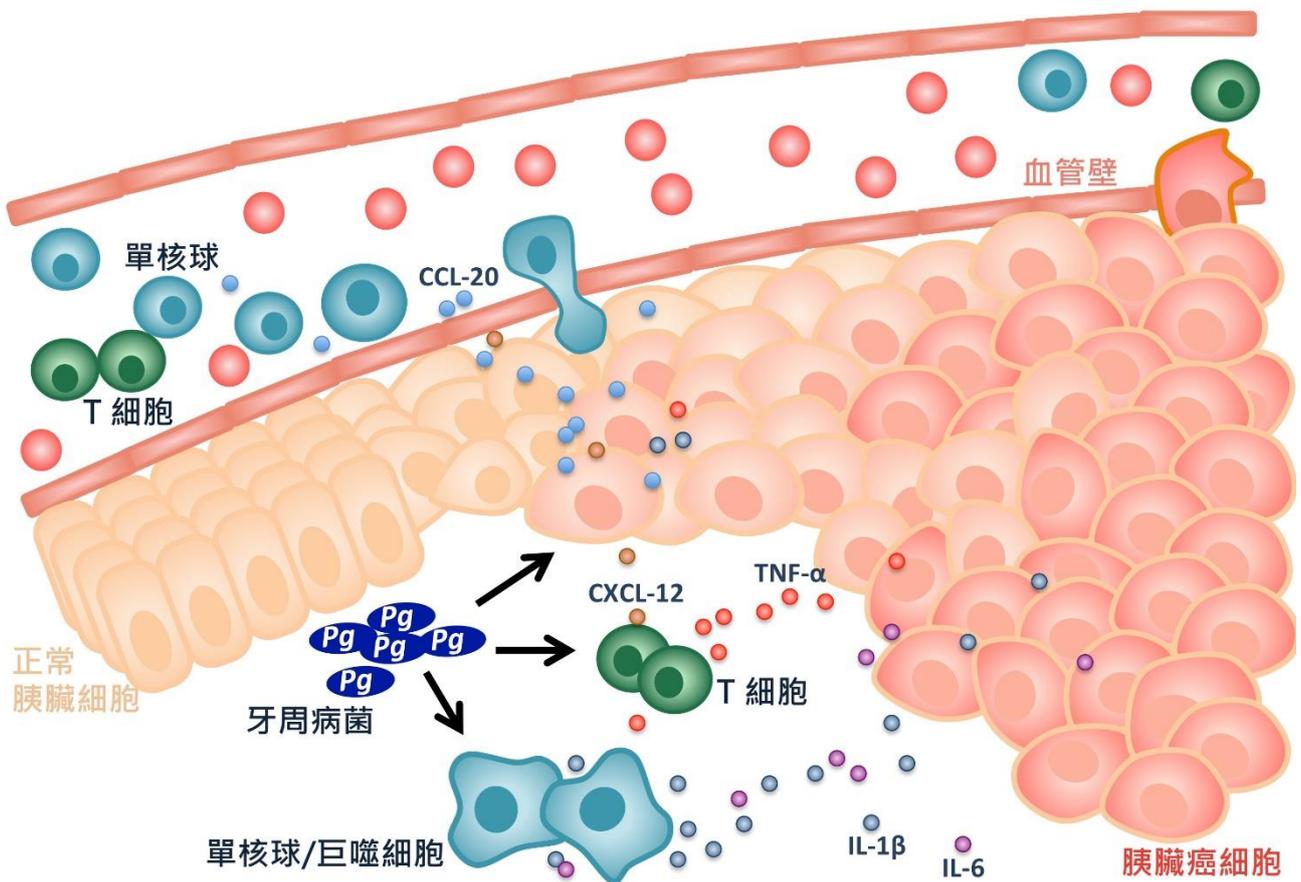
在最後交互作用的實驗中發現，只要有加入白血球上清液，就會明顯增加 BxPC-3 胰臟癌細胞的生長，但濃度影響的部分則有待進一步的驗證。總歸來說 BxPC-3 利用發炎反應，使自身有良好的生長環境，還會吸引白血球，可以加速其生長速度。另外，若能進一步增加白血球的種類，來測試細胞反應，相信將會更清楚其相關性。

### 三、與「牙周病菌 *P. gingivalis* 對癌細胞生長的探討」的相異處

在 2015 年的臺灣國際科學展覽會，健康與醫學科的優勝作品探討牙周病菌 *P. gingivalis* 對癌細胞生長的探討[11]，發現牙周病菌所分泌的特定蛋白質——熱休克蛋白 GroEL 會增加腫瘤及雞蛋胚胎的血管生成。本作品與其最大的不同點在於，本實驗是用牙周病菌刺激免疫細胞、以及胰臟癌細胞進行實驗，藉以探討受刺激的胰臟癌細胞及白血球之間的交互作用，希望建立適當的實驗模式，能更完整、精確地瞭解體內不同種類細胞之間的互相影響，特別是發炎反應對癌症發展轉趨惡化的機制探討，而不是只有一個面向去討論單一反應。本研究希望找到細菌導致的發炎反應對胰臟癌的重要影響，將可以在疾病的預防與治療上提供全新的策略。

## 柒、結論

實驗結果發現，胰臟癌細胞被 *P. gingivalis* 刺激後，除了會透過分泌 **IL-1 $\beta$** 、**TNF- $\alpha$**  促進發炎反應，也會分泌趨化因子 **CCL-20** 吸引白血球。當白血球受到趨化因子吸引，浸潤到胰臟癌組織以後，也會受到 *P. gingivalis* 刺激而活化，分泌大量 **IL-1 $\beta$** 、**IL-6**、**TNF- $\alpha$** 、**IL-17A** 等細胞激素，使發炎反應更劇烈，而且白血球也有可能分泌趨化因子 **CXCL-12** 吸引更多的白血球來參與發炎反應。根據交互作用的實驗，白血球的分泌物質，會促進癌細胞自身的生長（圖二十一）。推論，*P. gingivalis* 會促進胰臟癌腫瘤微環境的發炎現象，而這個作用很有可能導致癌細胞生長加速，以及加劇癌症的惡化。



圖二十一 實驗結論

## 捌、未來展望

- 一、初步實驗所使用的白血球是已癌化的細胞株，因為這些已癌化的細胞株培養容易，不易死亡。待初步篩檢出特定的細胞激素和趨化因子，後續若要精確的模擬，可再進一步使用取自人體血液的白血球，或可增加白血球的種類。
- 二、利用細菌的菌液刺激人類或是小鼠的細胞，因為哺乳類細胞需要氧氣，但 *P. gingivalis* 是厭氧菌，二者無法共同培養，目前的方法是使用此菌培養的菌液，後續若要更精準的實驗，設法克服這個限制使用共同培養(coculture)。
- 三、本實驗初步分析取樣定量的 cDNA 樣本，未來將測定免疫細胞與胰臟癌細胞受刺激後所產生的反應，及其分泌的物質，再進一步利用 ELISA 確認蛋白質表現。此外，未來也將利用中和性抗體，來確認這些趨化因子和細胞激素的角色。

現在醫治癌症的方法，多半是切除、化學藥物或採放射療法，但近幾年，醫界開始嘗試使用免疫療法。本實驗初步建立研究模式，將可以用來分析細菌刺激細胞的作用，藉以探討癌細胞和免疫系統的交互影響。希望透過本實驗，尋找到特定的病理機制，未來在預防和治療胰臟癌方面，將會提供有價值的訊息。

## 玖、參考資料

1. Cuerra C. et al., Chronic pancreatitis is essential for pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 11(3):291-302, 2007.
2. 科技大觀園，〈牙周病與胰臟癌〉  
<https://scitechvista.most.gov.tw/zh-tw/Feature/C/14/14/10/1/550.htm>，2015/12/10
3. 史提夫.羅森柏 Steven A. Rosenberg,約翰.巴瑞 John M. Barry 著，〈細胞轉型〉（臺北市，時報出版，1993）
4. Hingorani S. R. et al., Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4(6):437-50, 2003.
5. 林怡君、賴玉玲、凌莉珍，〈牙周炎致病機轉之新觀念〉，台北榮民總醫院牙科部網頁，  
<http://homepage.vghtpe.gov.tw/~dent/perio/04.htm>，2015/12/03
6. 維基百科，〈*Porphyromonas gingivalis*〉，  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Porphyromonas\\_gingivalis](https://en.wikipedia.org/wiki/Porphyromonas_gingivalis)，2015/10/18
7. ThermoFisher Scientific Technical Resources 11875 - RPMI 1640
8. Citizendium，〈*Porphyromonas gingivalis*〉，  
[http://en.citizendium.org/wiki/Porphyromonas\\_gingivalis](http://en.citizendium.org/wiki/Porphyromonas_gingivalis)，2016/06/10
9. 《2010 創世紀專刊\_RNA Extraction\_100708》
10. 高宇編著，〈分子生物學（下）〉（臺北市，鼎茂圖書，2011）
11. 2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯，〈口腔清潔－牙周致病菌 (*Porphyromonas gingivalis*)對癌細胞生長之探討〉 <http://science.ntsec.edu.tw/Science-Content.aspx?cat=90&a=6822&fld=&key=&isd=1&icop=10&p=2&sid=12417>，  
2015/10/03
12. The Scientist，〈Mouth Microbes and Pancreatic Cancer〉，<http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/45900/title/Mouth-Microbes-and-Pancreatic-Cancer/>，2016/04/25

## 【評語】 052008

目的：在探討牙周病菌 *P. gingivalis* 對胰臟癌細胞之影響，致病之牙周病並不只有 *P. gingivalis*，並探討主要致病之牙周病群細菌之共同作用，得到之結果比較符合事實，BxPC3 之分泌蛋白影響到細胞激素之表現宜有西方墨點 data。