

2015 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 090003
參展科別 醫學與健康科學
作品名稱 口腔清潔－牙周致病菌(*Porphyromonas gingivalis*)對癌細胞生長之探討
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 國立鳳山高級中學
指導教師 吳家進、劉博倫
作者姓名 黃菱齡、曹立綱

關鍵字 *Porphyromonas gingivalis*、GroEL、腫瘤生長

作者簡介



我是黃菱齡，目前就讀國立鳳山高中二年級，個性活潑開朗，喜歡參與活動也喜歡認識新朋友。也許是緣分牽繫，和夥伴意外的討論後參與了科展，一開始沒想太多，而誤打誤撞的報名，進而開啟了這場與科學火花的旅程。

很高興遇到志同道合的夥伴一起並肩完成一起共患難，也很慶幸有老師和長輩在身旁的幫忙和教導，開啟了我對於實驗的興趣與熱忱，從中獲得很多也突破了自我。謝謝這一路陪伴我的人，也謝謝家人在背後的支持，期望未來能開創更廣更豐富的視野，享受並貢獻於科學的道路上。



我是曹立綱，目前就讀鳳山高中二年級，個性比較隨和，不喜歡受拘束，平時喜歡打電玩和看課外書籍，並且喜歡去探討一些生活中的微小事物。也就是因為有這種性格才會想要來做研究，並且也很幸運的遇見了志同道合的朋友以及願意提供協助的教授，進而促成了這次參與國際科展的行程。其中做研究的過程中，我除了向教授以及學長們學習到如何做實驗以外，相關方面的知識也有所長進，甚至還學到了文書處理的技巧，以前我總認為文書處理沒甚麼大不了的，直到現在才了解原來是一門大學問。這一切，都要感謝朋友以及學長姐和教授的指導與建議，要是沒有這些幫助，我就不會學習到這麼多的知識，感謝你們!

摘要

牙周致病菌(*Porphyromonas gingivalis*)普遍分布於大部分人的口腔中，而牙周致病菌的熱休克蛋白 GroEL 在先前研究指出與牙周病和發炎有關；再者，研究證實了牙周病和癌症的相關，但尚未證實 GroEL 是否會增強腫瘤的增生。本研究藉此探討 GroEL 與腫瘤增生的相關性。結果顯示，小鼠被施打 GroEL 後，腫瘤體積明顯增加，死亡率也上升，並且血液中血管內皮前驅細胞的含量也增加，免疫組織染色法的結果也呈現出施打較高量之 GroEL 會使腫瘤內有較多血管的分佈；雞胚蛋的實驗中，更證實了 GroEL 會增加血管的生成。總結上述結果，推論 *P. gingivalis* 的 GroEL 會增加癌細胞的生長速度，而其機制可能來自於增加血管內皮前驅細胞的含量，刺激了血管的新生，提供了癌細胞生長的養分。所以口腔清潔，除了消除異味外，更可以預防癌症的發生。

Abstract

Porphyromonas gingivalis is a bacterial species that causes destruction of periodontal tissues. Additionally, previous evidence indicates that GroEL from *P. gingivalis* may possess biological activities involved in systemic inflammation, especially inflammation involved in the progression of periodontal diseases. The literature has established a relationship between periodontal disease and cancer. However, it is unclear whether *P. gingivalis* GroEL enhances tumor growth. Here, we investigated the effects of *P. gingivalis* GroEL on neovascuogenesis in C26 carcinoma cell-carrying BALB/c mice and chick eggs in vivo as well as its effect on human endothelial progenitor cells (EPC) in vitro. We found that GroEL treatment accelerated tumor growth (tumor volume and weight) and increased the mortality rate in C26 cell-carrying BALB/c mice. GroEL promoted neovascuogenesis in chicken embryonic allantois and increased the circulating EPC level in BALB/c mice. Furthermore, GroEL effectively stimulated EPC migration and tube formation. In conclusion, *P. gingivalis* GroEL may act as a potent virulence factor, contributing to the neovascuogenesis of tumor cells and resulting in accelerated tumor growth.

壹、研究動機

牙周病常發生於三十五歲以上的成年人，統計顯示，台灣成年人約有 90% 患有牙周病。牙周病主要是由堆積在牙菌斑內之細菌所引起，根據分析發現口腔內有多達三百種以上的細菌，然而引起牙周病的細菌主要包括 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*)、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)及 *Bacteroides forsythus* (*B. forsythus*)等三種，其中 *P. gingivalis* 是引起牙周病的主要菌種之一。過去科學家在屍體解剖研究中發現，有些受 *P. gingivalis* 細菌感染引起牙周病的病人，在血管壁上會有 GroEL 的堆積；臨床上的病人血液中也偵測出對抗細菌之 GroEL 的抗體，這現象表示細菌之 GroEL 會經由血液與血管廣泛分布於身體各部位，以及在人體內引起發炎反應。另外，過去相對於公共衛生學的統計資料顯示，牙周致病菌可能不只引起牙齒與牙齦的病變，還可能和身體其他器官的癌症有關，例如：直腸癌、胃癌……等，然而，目前也還缺少科學上直接之證據。

在台灣癌症發生率如此高，而且大部分的成年人又患有牙周病，那麼牙周致病菌 *P. gingivalis* 是否會影響腫瘤的生長呢？這個問題確實引起本研究的興趣，在經過查詢文獻後發現，目前的確沒有直接的證據來說明牙周致病菌與腫瘤生長有關係，因此，本研究乃藉由本研究來探討牙周致病菌對癌細胞生長之影響。

貳、研究目的

本研究欲探討以下問題：

- 一、*P. gingivalis* 是否會加速小鼠體內腫瘤細胞之生長以及對植入腫瘤細胞株之小鼠存活率之影響
- 二、*P. gingivalis* 對動物體內血管內皮前驅細胞含量之影響
- 三、*P. gingivalis* 對腫瘤組織與雞胚蛋中血管新生之影響

參、研究設備及材料

一、研究設備

1. 無塵抽氣操作台
2. 正立可見光顯微鏡 (OLYMPUS BX43, JAPAN)
3. 正立螢光顯微鏡 (OLYMPUS IX71, JAPAN)
4. 流式細胞儀 (Attune, ABI, USA)
5. 組織臘包埋設備與切片設備 (SHANDON AS325, USA)

二、研究材料

1.C26 小鼠直腸癌細胞株

小鼠之直腸癌細胞株 C26 培養在 RPMI 1640 培養液中(培養液中含有 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 4.5 g/L glucose, 10 mmol/L HEPES, 1.0 mmol/L sodium pyruvate 以及 1% 廣效性抗生素)。細胞培養於每 37°C 含有 5% CO₂ 的培養箱中。

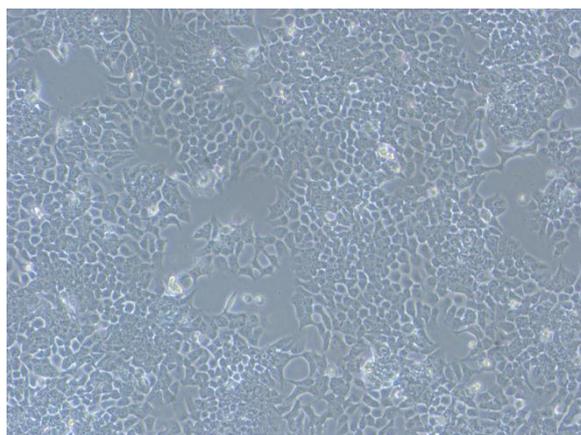


圖 1 直腸癌細胞株 C26

2. BALB/c 小鼠

自樂斯科公司(BioLASCO Taiwan Co., Ltd.)購入 6-8 週齡之 BALB/c 小鼠飼養於研究中心之養殖箱。飼養環境約 22~ 25 °C，定期更換飲水與墊料，提供充足飼料。



圖 2 BALB/c 小鼠

3. 雞胚蛋

雞胚蛋從宜蘭竹林養雞場拿回來後，放置於 37°C 的孵化箱 8 天後，開始進行實驗。

肆、研究過程或方法

一、製備 *P. gingivalis* 之熱休克蛋白 GroEL

以分子生物學之方法將 *P. gingivalis* 之熱休克蛋白 GroEL 以及對照組之 glutathione-s transferase (GST) 蛋白製做出來

二、BALB/c 小鼠移植腫瘤細胞株實驗

1. BALB/c 小鼠移植腫瘤細胞株

進入實驗當天先將 C26 細胞以水解酶取下，並且計數細胞調整細胞濃度為每 0.1mL 含有 10^6 個細胞。將 36 隻小鼠隨機分為九組，各組之處置如下：

第一組: 不做任何處置之負性對照組(naïve control)

第二組: 於背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞

第三組: 於背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞，並且經由尾靜脈施打 GST 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Body weight (BW)，持續五週，每週 2 次

第四組: 於背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞，並且經由尾靜脈施打 GroEL 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$

BW，持續五週，每週 2 次

第五組: 於背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞，並且經由尾靜脈施打 GroEL 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$

BW，持續五週，每週 2 次

第六組: 於背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞，並且經由尾靜脈施打 GroEL 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$

BW，持續五週，每週 2 次

第七組: 經由尾靜脈施打 GST 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Body weight (BW), 持續五週, 每週 2 次

第八組: 經由尾靜脈施打 GroEL 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW, 持續五週, 每週 2 次

第九組: 經由尾靜脈施打 GroEL 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW, 持續五週, 每週 2 次

移植腫瘤細胞完成之後, 放回飼養籠繼續飼養, 並且觀察各組動物背部腫瘤生長之情形與存活率。在實驗滿 4 週之後犧牲小鼠, 並且取出腫瘤組織進行組織包埋, 切片與免疫組織染色法進行觀察。

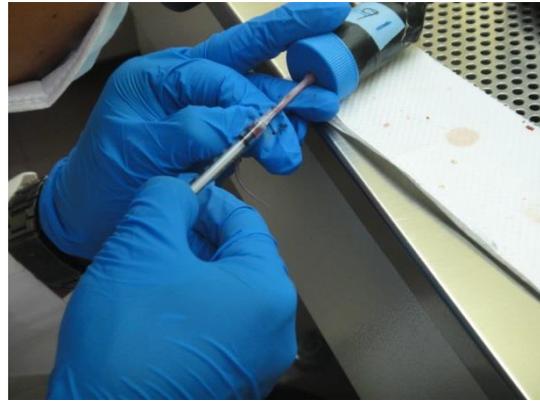
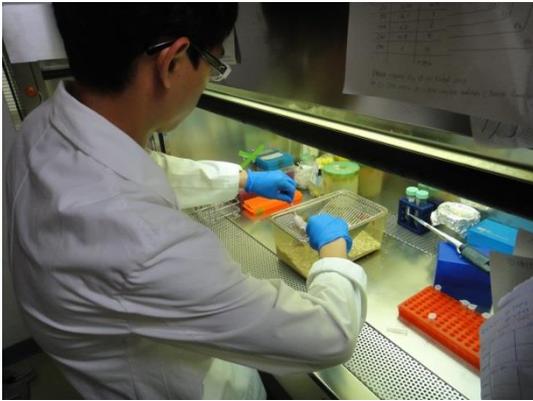


圖 3 小鼠背部皮下植入 10^6 個 C26 細胞 圖 4 經由尾靜脈施打 GST 或是 GroEL

2. 以流式細胞儀分析各組小鼠血液中血管內皮前驅細胞的含量

血管生成是腫瘤組織生長重要的因素, 而血管內皮前驅細胞在血管之生成過程中扮演重要角色, 也就是說血管內皮前驅細胞越多, 血管生成速度越快。因此, 本研究以流

式細胞儀分析小鼠體內血管內皮前驅細胞的數量。自小鼠下頰動脈採血約 $100\text{-}200\ \mu\text{L}$, 依照比例加入紅血球溶解液。以 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-mouse CXCR4 (eBioscience, San Diego, CA, USA), allophycocyanin (APC)-conjugated anti-mouse Flk-1 (VEGFR-2, eBioscience, San Diego, CA, USA) 以及 phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse Sca-1 antibodies (eBioscience, San Diego, CA, USA) 將細胞進行染色。以流式細胞儀分析同時帶有 CXCR4, Sca-1, and Flk-1 的細胞就是血管內皮前驅細胞。

3. 以免疫組織染色法觀察各組小鼠背部腫瘤內血管生長之情形

動物以頸椎脫臼法犧牲之後，取出皮下之腫瘤組織，量測大小與重量之後放入 4% 之固定液 paraformaldehyde 浸潤 8-10 小時，以蠟塊加以包埋之後，將其切片，厚度為 5 μm ，並且以 goat anti-Von Willebrand factor (vWF; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) antibody 以及 hematoxylin 進行染色。以可見光顯微鏡觀察組織中血管分佈情形。

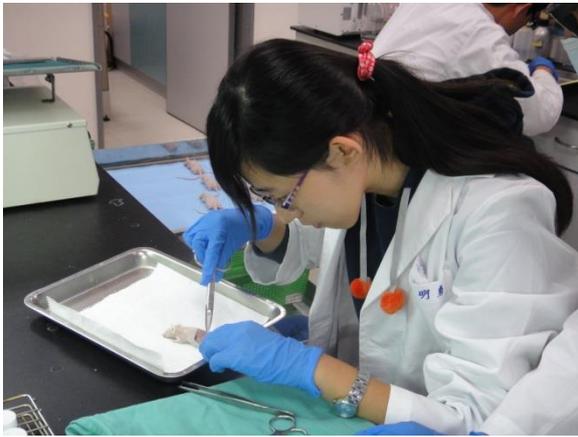


圖 5 取出小鼠皮下之腫瘤組織

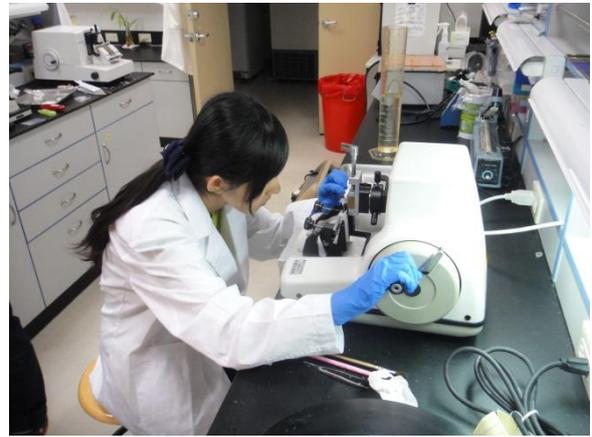


圖 6 將蠟塊包埋之後的組織切片，厚度為 5 μm

三、雞胚蛋尿囊膜血管新生實驗

將孵化第八天完成的雞胚蛋隨機分為五組，在無塵抽氣操作台中以70%的酒精將雞蛋氣室上方的蛋殼加以消毒，並且以小鑷子開啟一個約直徑1.5-2公分的小孔，讓眼睛可以直視蛋黃表面。依照實驗設計將含有GroEL或是GST的溶液滴在以高溫高壓消毒過之0.5公分大小的圓形濾紙(chromatography paper; Whatman, Maidstone, Kent, England)上；等待自然乾燥後，小心將其鋪在雞蛋蛋黃表面。以無菌不透氣膠帶將雞蛋開口完全密封，並置回孵化箱繼續孵化。孵化箱持續維持37°C與80%溼度，再經過3天的孵化(一共孵化了11天)，小心打開密封的膠帶以及剝除多餘之蛋殼，以數位相機拍攝並且觀察蛋黃上血管分部之情形。

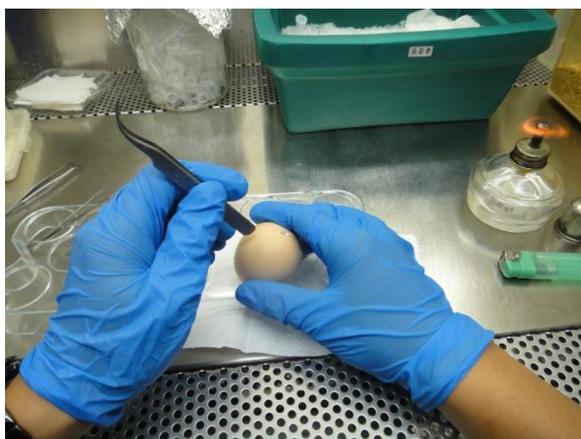


圖 7 將雞胚蛋挖取一個小洞

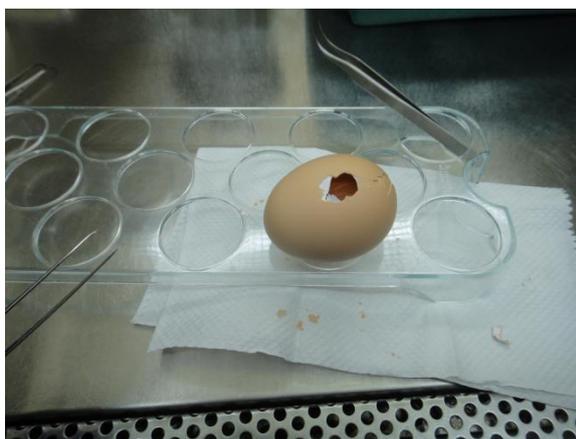


圖 8 雞胚蛋挖取的小洞(1.5-2 公分)

伍、研究結果

一、GroEL 會增加移植腫瘤小鼠之死亡率

在沒有注射或是 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GST 注射及 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GroEL 注射之腫瘤鼠，其在實驗結束時死亡率約為 20%，然而，以 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GroEL 注射會使死亡率達 40%，以 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GroEL 注射會使死亡率達 60%。其中以越高劑量 GroEL 注射之小鼠越早出現死亡現象。其他未移植腫瘤但有施打 GroEL 或是 GST 的小鼠死亡率也是 20% 左右。

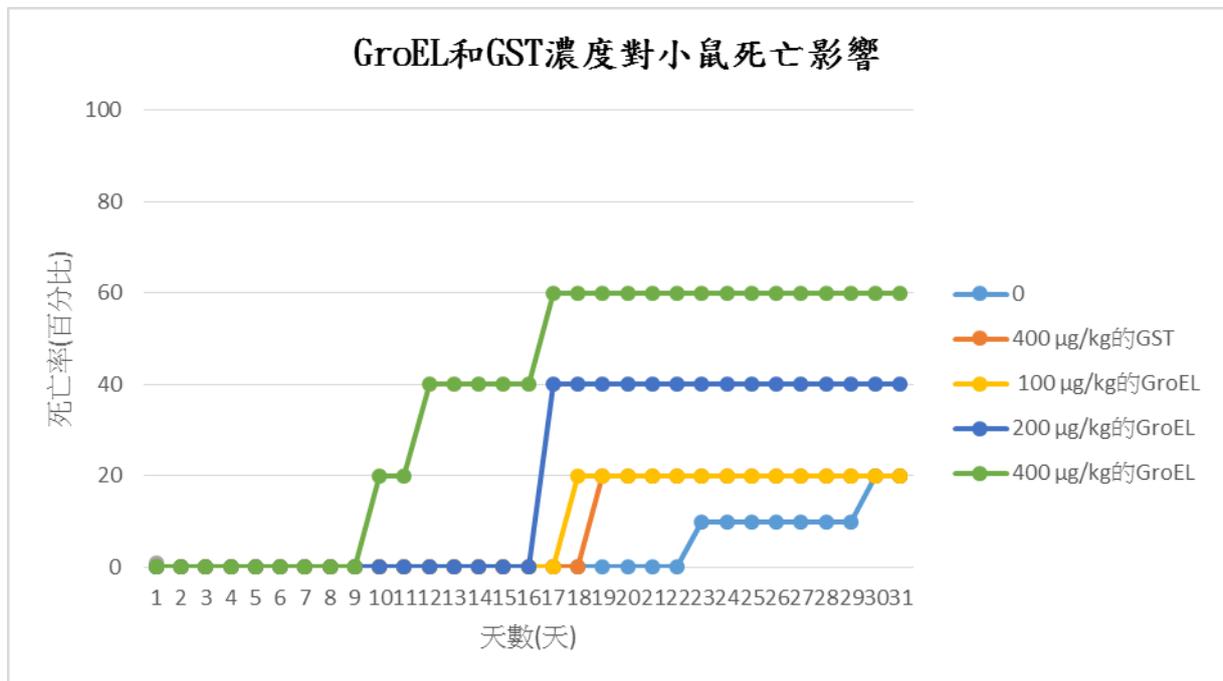
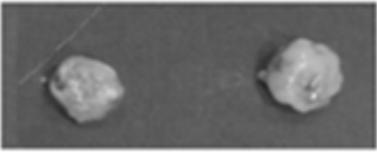
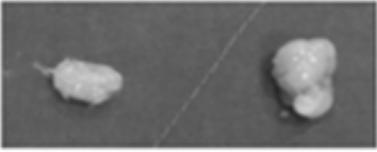
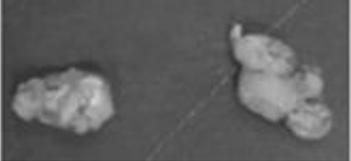


圖 9 不同劑量 GroEL 和 GST 對小鼠死亡影響 (0 代表負性對照組)

二、GroEL 會增加腫瘤在小鼠身上的生長速度

在動物犧牲之後，將背部的腫瘤組織取下，在目視巨觀下，本研究可以明顯分辨以 GroEL 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 或 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 劑量施打小鼠，其腫瘤組織體積較其他個體大，且有。若將組織加以量測大小計算體積與秤重之後，也顯示 GroEL 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 或 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 劑量施打小鼠的確會增加腫瘤組織的生長速度。

表 1 小鼠施打 GroEL 與腫瘤體積外觀變化對照表

施打劑量	腫瘤外觀
無施打 GroEL 無施打 GST	
400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GST	
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL	
200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL	
400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL	

註：照片經過黑白處理

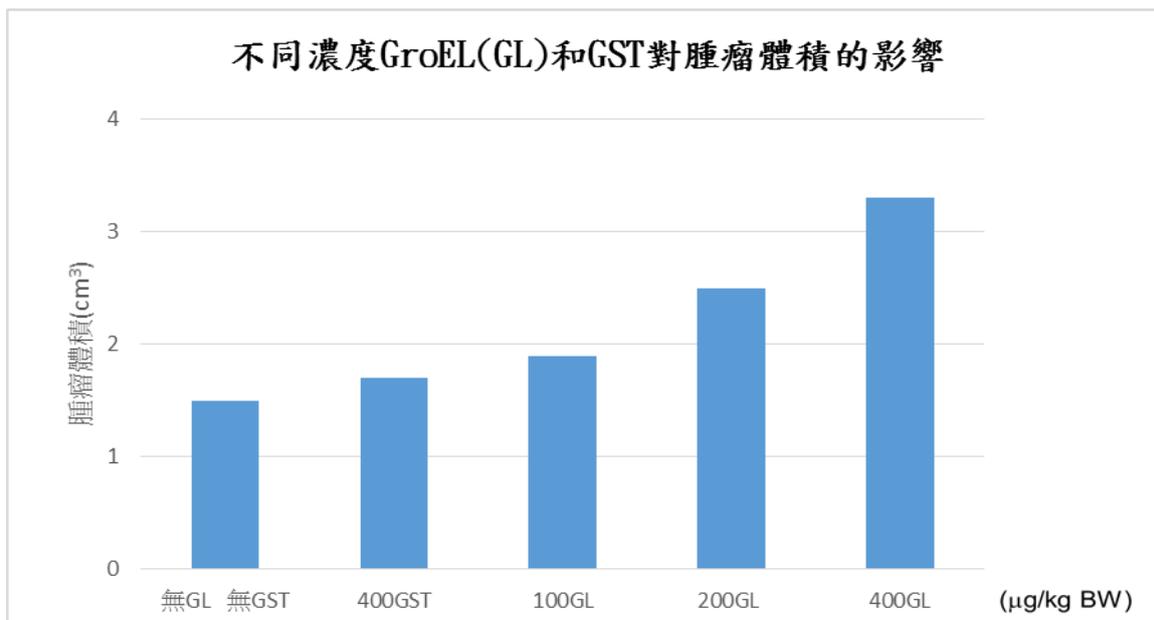


圖 10 不同劑量 GroEL 對腫瘤體積的影響(GroEL 於圖中簡稱 GL)

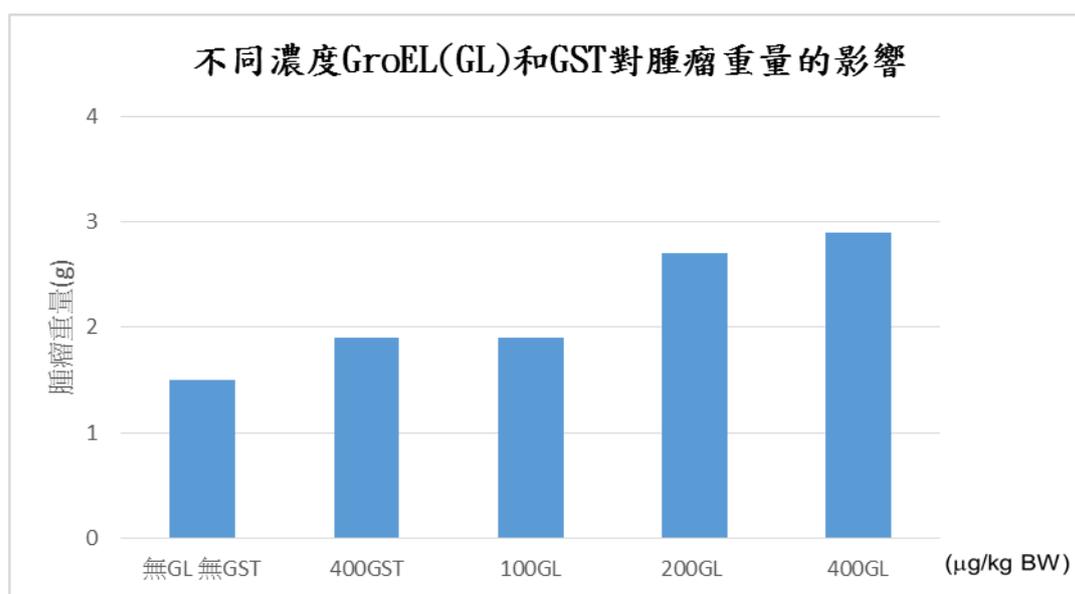


圖 11 不同劑量 GroEL 和 GST 對腫瘤重量的影響 (GroEL 於圖中簡稱 GL)

三、未移植腫瘤之小鼠，在施打 GroEL 後體內血管內皮前驅細胞之數量增加

在進入實驗之前，各組小鼠體內含有之血管內皮前驅細胞數量相近，約每 5000 顆單核球細胞中含有 40-50 顆血管內皮前驅細胞。然而，在施打 200 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 或是 400 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 的 GroEL 之後一週，就可以明顯看到小鼠體內含有之血管內皮前驅細胞數量增加，約可以增加到每 5000 顆單核球細胞中含有 180-200 顆血管內皮前驅細胞，而且這個現象可以因為繼續施打 GroEL 而持續。而施打 400 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 的 GST 對血管內皮前驅細胞之數量並無影響。

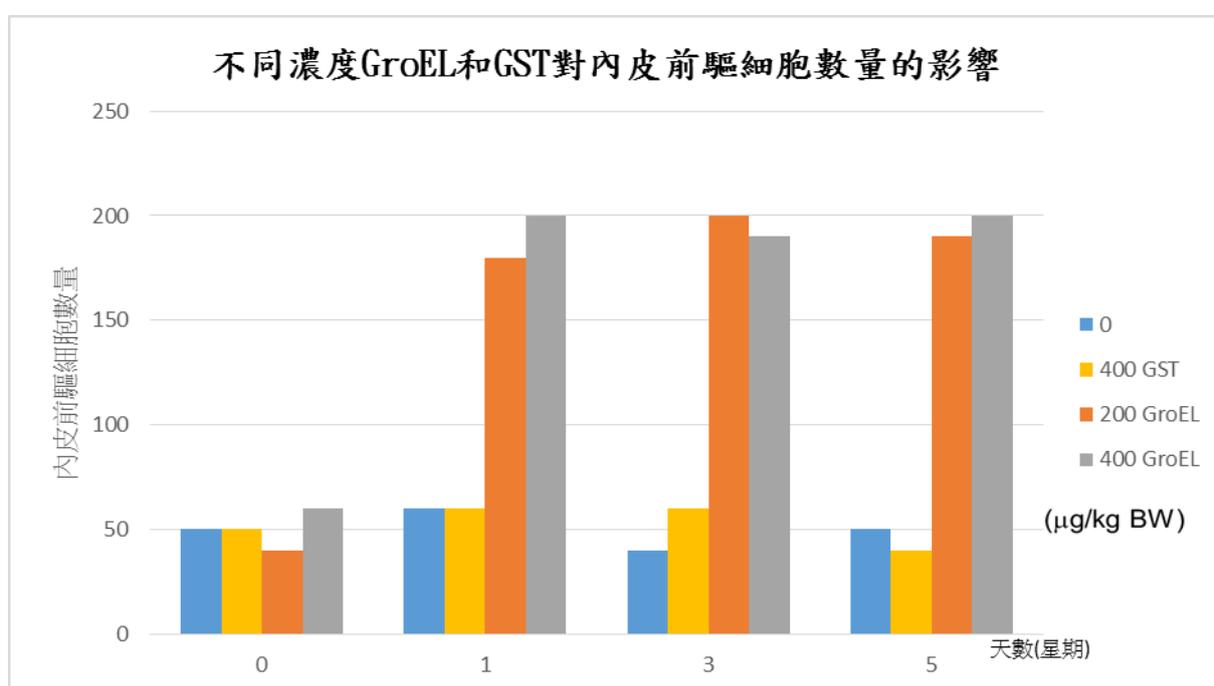


圖 12 不同劑量 GroEL 和 GST 對未移植腫瘤小鼠體內血管內皮前驅細胞數量的影響 (0 代表負性對照組)

四、腫瘤移植小鼠在施打 GroEL 後體內的血管內皮前驅細胞之數量增加

在進入實驗之前，各組小鼠體內含有之血管內皮前驅細胞數量相近，約每 5000 顆單核球細胞中含有 40-50 顆血管內皮前驅細胞。在對照之腫瘤鼠(注射 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GST 的移植腫瘤鼠)體內在實驗進入第三與第五週時，血管內皮前驅細胞之數量有些微之增加。然而，在施打 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 或是 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW 的 GroEL 之後一週，就可以明顯看到移植腫瘤小鼠體內含有之血管內皮前驅細胞數量急遽的增加(第一週約 200 顆血管內皮前驅細胞，第二週約 320-365 顆血管內皮前驅細胞，第五週約 300-330 顆血管內皮前驅細胞)，而且在第三與第五週的血管內皮前驅細胞之數量遠超過沒有移植腫瘤卻有施打 GroEL 的小鼠。

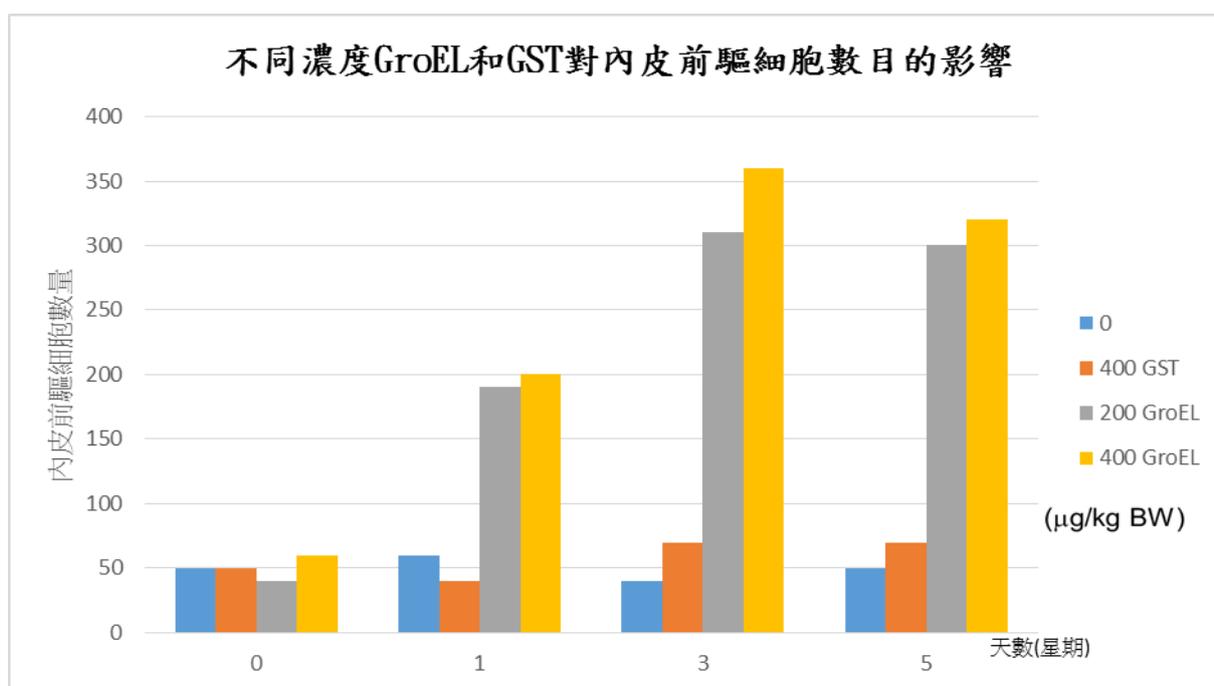
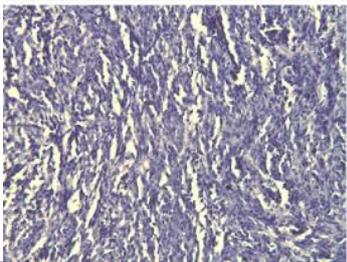
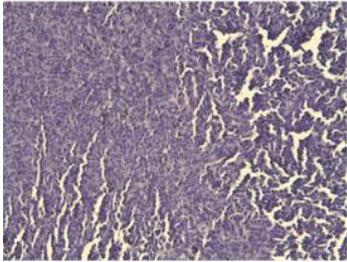
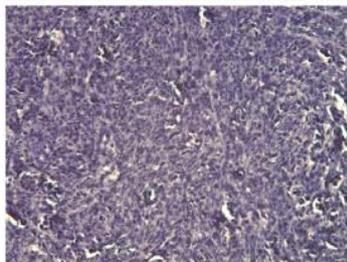
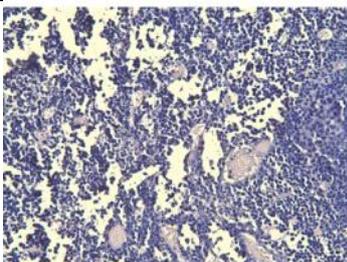
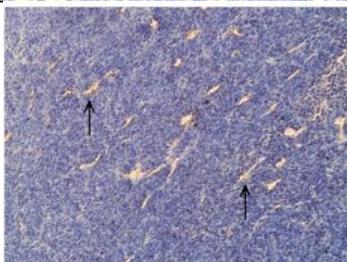


圖 13 不同劑量 GroEL 和 GST 對腫瘤移植小鼠體內的血管內皮前驅細胞數目的影響 (0 代表負性對照組)

五、施打 GroEL 會增加腫瘤組織中血管的生長

在犧牲小鼠將腫瘤組織取出，進行免疫組織染色法後以可見光顯微鏡觀察，結果顯示，施打 200 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 或是 400 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$ 的 GroEL 可明顯使腫瘤組織內的血管增加。黑色箭頭所指管腔狀結構處為血管。

表二 不同劑量 GroEL 和 GST 對腫瘤組織內血管生長的影響

處理方式	血管生長情況
對照組	
GST- 400 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$	
GroEL- 100 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$	
GroEL- 200 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$	
GroEL- 400 $\mu\text{g}/\text{kg BW}$	

七、GroEL 會加速雞胚蛋尿囊膜上血管的生長

將帶有 20 μg GST 或是 5-20 μg GroEL 濾紙片植入雞胚蛋後三天，本研究可以觀察到雞蛋蛋黃表面的血管分佈情形。植入 20 μg GST 濾紙並不影響血管生長(與 control 組沒有差異)，植入 10 μg 或是 20 μg GroEL 濾紙片的雞蛋血管網分佈密度明顯較高。

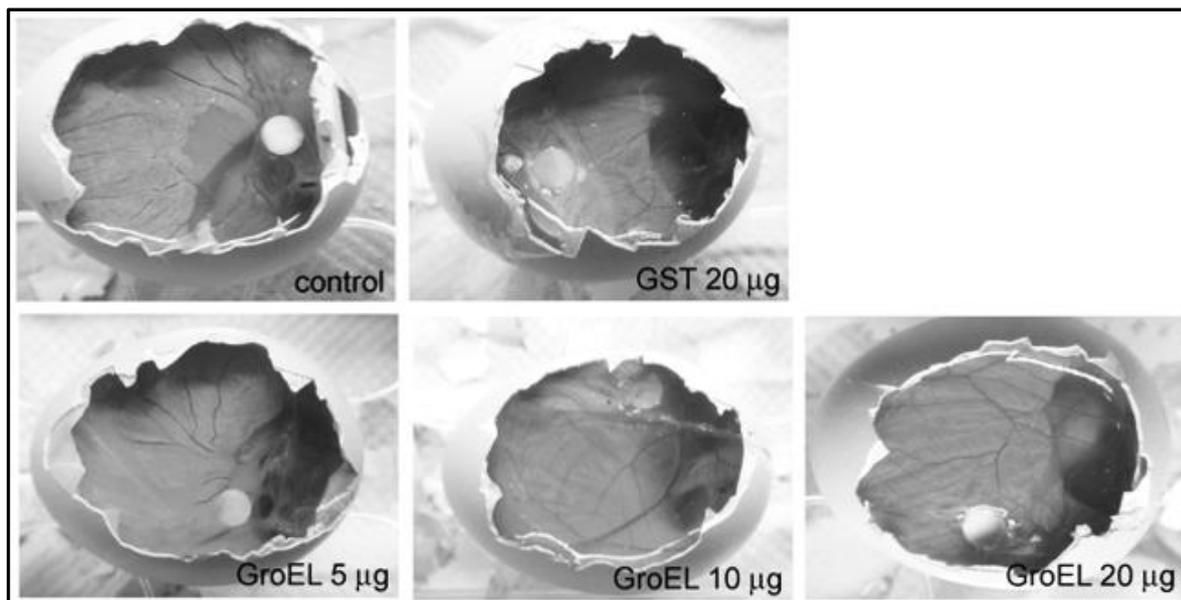


圖 14 不同劑量 GroEL 和 GST 對雞胚蛋中血管生成之影響 (照片經過黑白處理)

陸、討論

一、口腔癌與牙周致病菌的關聯性

實驗中，本研究將牙周致病菌之 GroEL 打入已患有直腸癌的小鼠，得到的結果證實牙周致病菌之 GroEL 會使直腸癌之腫瘤長的更大並且有血管新生之情形。本研究在做此實驗之前，曾用過人類口腔癌細胞(SAS)來做實驗，但實驗後的結果不明顯，所以並沒有採用，本研究認為可能的原因是人類的口腔癌細胞受到小鼠免疫細胞的排斥，所以腫瘤細胞無法在小鼠體內順利的生長，但本研究認為若是有小鼠口腔癌細胞的話，將能得出更明顯的結果，因為以相對位置來說，直腸距離口腔比較遠，而口腔癌與牙周病皆在口腔內發生，所以口腔癌與牙周病之間的影響應該大於對直腸癌的影響。

二、實驗材料的選用

雞胚蛋是目前研究中最常被用來作與血管新生有關的實驗，因為雞胚蛋方便觀察，因此本研究選用雞胚蛋來探討牙周致病菌(*P. gingivalis*)是否會刺激血管新生。而選用小鼠的原因則是因為小鼠較方便讓本研究把腫瘤移植到牠身上，用來探討牙周致病菌是否會促進腫瘤的成長。

三、GST 在實驗中所扮演的角色

本研究實驗分成九組，分別是 control 組、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GST、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GroEL，其中放入 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GST 的用意也是拿來對照用，因為在製作重組 GroEL 蛋白質的過程中，為了方便觀察與能順利將蛋白質萃取出來，因此在 GroEL 基因序列上加上了一段 GST 基因序列當作標記。相對地，這樣使得實驗又多了一個變因，因此本研究多加了 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW GST 組來證明實驗中所見到的影響來自 GroEL 而非來自於 GST。

四、牙週病與癌症關係

牙周病在早期沒有明顯的自覺症狀，偶而在刷牙的時候，會發現牙齦紅腫或出現流血的現象，但往往被當作是「火氣大」而不以為意，而且牙周病也沒有立即的致命性，所以過去經常受到大家的忽略。經由許多的統計分析顯示牙周病與許多疾病的發生有關係，包括心血管疾病與多種癌症。而本研究透過雞胚以及小鼠的實驗找到了牙周病菌使腫瘤生長增加的直接證據。期待未來醫界能對牙周病刺激腫瘤生長的分子與病理機制有更清楚的認識，進而在腫瘤治療的過程中能有新的思維。

柒、結論

根據我國衛生福利部國民健康局的調查結果顯示，國內四十歲以上成年人，有百分之九十患有嚴重程度不一的牙周病，這也是日後造成掉牙的主因。另外，依據健保局近十年統計，牙周病就醫人數在民國八十八年僅占所有就醫人次之百分之十七，而到民國九十七年時已經達百分之二十五，目前仍然持續增加中，由此顯見牙周病在國人族群中之普及率及罹患率相當高。牙周病除了帶來缺牙與營養攝取不足的問題之外，過去研究也明顯指出，牙周致病菌可能隨血液進入到全身血液循環系統，有可能引發菌血症及導致全身性之發炎性疾病，最明顯的例子就是牙周病之病患罹患心血管疾病的機率，比一般人高出 2.5 倍。除此之外，根據公共衛生相關調查結果，科學家與臨床醫師也推測，牙周病致病菌可能與癌症之發生率有關。

然而，在本研究的研究與觀察中發現，牙周致病菌 *P. gingivalis* 之熱休克蛋白 GroEL 的確會增加移植到小鼠背部之腫瘤細胞之生長；更進一步地本研究發現，GroEL 會增加小鼠血液中血管內皮前驅細胞之含量，進而使腫瘤組織中之血管新生作用旺盛，這也是造成腫瘤生長快速的主因。透過此次的研究，本研究找到牙周病與癌症發生的可能關鍵所在，但願將來能更進一步清楚了解其中之致病機轉以及將其應用於相關疾病之預防與治療。

捌、參考資料

1. Joseph Katz, Mairelys D. Onate, Kaleb M. Pauley, Indraneel Bhattacharyya, Seunghee Cha. 2011. Presence of Porphyromonas gingivalis in gingival squamous cell carcinoma. *Int J Oral Sci* 3:209-215.
2. Kochiro Wada & Yoshinori Kamisaki.2010.Molecular dissection of Porphyromonas gingivalisrelated arteriosclerosis: a novel mechanism of vascular disease. *Periodontology* 2000, Vol. 54, 222-234
3. Manpreet Kalra , Nirmala Rao , Kanwardeep Nanda , Farzan Rehman , KL Girish , Shoaib Tippu , Asit Arora.2011.The Role of Mast Cells on Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. doi:10.4317/medoral.17395
4. Resit Demir & Georgios Peros & Werner Hohenberger.2010. that Allows the Quantification of the Positive and NegativeAngiogenic Active Drugs: A Study Basedon the Chorioallantoic Membrane Model. *Pathol. Oncol. Res.* 17:309-313
5. Raquel B Pereira, Elisardo C Vasquez, Ivanita Stefanon and Silvana S Meyrelles.2011. Oral P. gingivalis infection alters the vascularreactivity in healthy and spontaneouslyatherosclerotic mice. Pereira et al. *Lipids in Health and Disease* , 10:80
6. Shivakumar Madappa Shivamallappa, Narayan Tondikulam Venkatraman, Balasundari Shreedhar, Leeky Mohanty, Sadhana Shenoy. 2011.Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. *Int J Oral Sci* 3:216-224.
7. Sarah G. Fitzpatrick , Joseph Katz.2010. The association between periodontal disease and cancer: A review of the literature. *journal of dentistry* 38:83-95
8. Sung-Woon Chung, Ho-Sung Kang, Hae-Ryoun Park, Sung-Jo Kim, Soo-Jin Kim, Jeom-II Choi.2003. Immune responses to heat shock protein in Porphyromonas gingivalisinfected periodontitis and atherosclerosis patients. *J Periodont Res* 2003; 38; 388-393

【評語】 090003

牙周致病菌之 GROEL 對癌細胞生長之影響。

1. GROEL 對促進腫瘤細胞之影響不明顯。
2. 圖 1、2 之數據沒有統計分析
3. 宜再加強探討分子機制，如促進血管之 VEGF,IL...etc.