

波文氏病免疫功能低下機轉之研究

吳慶軒¹ 張基隆² 何宜承³ 余幸司⁴

台灣西南沿海烏腳病流行地區有高率之皮膚癌發生，皮膚癌可分為波文氏病 (Bowen's disease)，基底細胞癌 (basal cell carcinoma)，鱗狀細胞癌 (squamous cell carcinoma) 及混合型皮膚癌 (combined form)。波文氏病為表皮內癌而基底細胞癌及鱗狀細胞癌則為侵襲性癌。以細胞激素及可溶性 T 細胞表面抗原為偵測指標，探討波文氏病患者末梢血單核球之免疫功能，發現病人末梢單核球干擾素- γ (interferon- γ)，腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor) 及可溶性細胞激素-2 接受體 (soluble interleukin-2 receptor) 之釋出量較正常控制組減少，而細胞間素-2 (interleukin-2) 卻增加，此結果顯示波文氏病患者免疫功能較正常人為低，其機轉與細胞間素-2 接受體 (interleukin-2 receptor, IL-2R) 之機能有密切關係。經以重組 IL-2 (recombinant IL-2) 刺激單核球，發現病人單核球之氘-胸腺嘧啶吸收 ($[^3\text{H}]$ -thymidine uptake) 值較正常控制組呈有意義之低下，證實病人 T 淋巴細胞膜 IL-2R 之功能低下。以流體細胞儀 (flow cytometry) 測 IL-2R 之 α 及 β chain 之呈現亦顯示病人淋巴球之測定值較正常控制組呈有意義之減少。另 IL-2R β chain 訊息傳遞相關之酪氨酸激化酵素 (tyrosine kinase) 活性降低，證實經活化之 IL-2R 之訊息傳遞有缺陷存在。綜合上述研究結果知 IL-2R 缺失為波文氏病末梢單核球免疫功能低下之主要角色。

關鍵詞：波文氏病，細胞激素，細胞間素-2 接受體，酪氨酸激化酵素

前言

細胞免疫 (cellular immunity) 功能之強弱常被視為人體對腫瘤反應之指標。當抗原或有絲分裂素 (mitogen) 如 phyto-hemagglutinin (PHA) 進入人體後會與抗原呈現細胞 (antigen

presenting cell) 結合，釋放出細胞間素-1 (interleukin-1, IL-1)。而 IL-1 會使得靜止期之輔助性 T 細胞 (T helper cell, Th cell) 活化成為活化狀態之 Th cell，而釋放出細胞間素-2 (interleukin-2, IL-2) 及細胞間素-2 接受體 (interleukin-2 receptor, IL-2R) 之呈現。IL-2 會和 IL-2R 結合而使 Th cell 釋放出干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ)，腫瘤壞死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等細胞激素 (cytokines)。另一方面 IL-2 也會和毒殺性 T 細胞 (cytotoxic T cell, Tc cell) 上之 IL-2R 結合，使 Tc cell 釋放出毒殺因子 (cytotoxins)，殺死腫瘤細胞 [1]。因此 IL-2 與 IL-2R 之結合會引發一連串之免疫反應包括：T 細胞之增生及各種 cytokines 之釋出

¹ 高雄醫學院醫學技術學系

² 高雄醫學院生化學科

³ 高雄長庚紀念醫院皮膚科

⁴ 高雄醫學院皮膚科

聯絡人：余幸司

聯絡地址：高雄市三民區十全一路 100 號

收稿日期：85 年 3 月

接受日期：85 年 6 月

[2]。在細胞免疫反應上 cytokines 一直是扮演主要之調控角色, T 細胞之活化及細胞毒殺反應之進行均是由 cytokines 來調控。T 細胞之活化須要細胞間素-1 及 IL-2 之參與, 而細胞毒殺反應會被 IFN- γ , IL-2 及 TNF- α 等所引發 [3]。以往之文獻也明白顯示出由活化之 T 細胞釋出之可溶性抗原分子如: sIL-2R, soluble CD4 (sCD4) 及 soluble CD8 (sCD8) 也都是免疫調節之重要因子[4,5,6]。

Wabebo 等人之研究發現惡性黑色素瘤 (melanoma) 及腸癌 (colorectal cancer) 之病人其末梢血液單核球 (mononuclear cell, MNC) 的 IL-2 釋出減少 [7]。Ursula 等人也發現惡性黑色素瘤病人在 IL-1 α , IL-2, TNF- α , IFN- γ 4 種 cytokines 之釋出均明顯比正常人降低, 但基底細胞癌 (basal cell carcinoma) 病人上述之 4 種 cytokines 之釋出則和正常人無明顯差異 [8]。此外, Ursula 等人也發現 gynaecological carcinomas 之病人在 IL-1 α , IL-2, IFN- γ 之釋出也有降低的現象 [9]。Kuo 等人發現鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma) 病人 TNF- α , sCD4, sCD8 之釋出高於正常人, 而 sIL-2R, IFN- γ 之釋出和正常人沒有差別 [10]。另, Fierro 等人研究發現 melanoma 病人血清中 sIL-2R, sCD4, sCD8 之含量均比正常人明顯升高[11]。上述結果顯示癌症病人在免疫功能上呈現某種程度之異常或缺失。因此偵測 cytokines 及可溶性表面抗原 (soluble surface antigens) 之表現, 可以評估癌症病人之細胞性免疫功能。位於台灣西南部沿海地區的烏腳病患區居民之皮膚癌有很高之盛行率 [12,13], 這種癌症乃屬地區性之癌。皮膚癌具多發性及多樣性之特性, 同一病人可發現不同病期的癌, 包括波文氏病、基底細胞癌、鱗狀細胞癌和混合型癌等。其中波文氏病是一種表皮內癌不具轉移性。以往對於表皮內癌之免疫功能研究文獻並不多, 波文氏症病人免疫功能之研究可以成為研究人類化學致癌生體防衛之極佳模式。根據以往之研究, 波文氏症病人在病灶處, 蘭格罕氏細胞 (Langerhan's cell) 數目低於正常人 [14]。而波文氏症病人之 MNC

接受 PHA 刺激後, 細胞增生 (proliferation) 之程度也低於正常人 [15], 均顯示波文氏症病人之細胞性免疫功能低下。本研究探討波文氏症病人 MNC 上清液 cytokines 與 soluble surface antigens 之釋出外, 也以重組細胞間素-2 (recombinant interleukin-2, rIL-2) 刺激 MNC, 視其 MNC 增生之反應, 及測定病人 MNC IL-2R 之表現與細胞內酪氨酸激化酵素 (tyrosine kinase) 活性, 證實波文氏症病人 T 淋巴球 IL-2R 之缺失為其免疫功能低下之重要機制。

材料與方法

研究對象之選擇

研究對象分兩組, 16 位選自非烏腳病流行區 (non-black foot disease endemic area) 之正常人, 而 16 位波文氏症病人則是烏腳病流行區 (black-foot disease endemic area) 之病人, 且均為臨床及病理診斷上確診之病例。

末梢血液中單核球細胞之分離

依 Yu 之方法分離單核球 [16], 步驟如下, 由選擇之二組實驗對象經由靜脈血抽取 20 ml 之末梢血液, 其中 10 ml 放置室溫使其自然凝固 3-5 hrs 後, 離心 2000 rpm 10 分鐘, 取上清液之血清並經 56 °C 30 分鐘去活化後分裝備用。另 10 ml 血液則加入肝素 (heparin) 離心取上清液之血漿分裝後備用。細胞部份再以 HBSS (購自 Gibco) 1:1 稀釋, 取出加入含 5ml Ficoll-Hypaque (購自 Pharmacia) 之離心管, 離心 20 分後, 取中間之單核細胞層, 以 HBSS 洗淨 3 次。再以 culture medium (10% FBS-RPMI, 購自 Gibco) 調成細胞濃度 1×10^6 /ml 待用。

PHA 對單核球細胞細胞間素與可溶性表面抗原釋出能力之檢測

將 MNC 調成 1×10^6 /ml 取 2ml 加入 PHA (購自 Difco) 10 μ g/ml 刺激 3 天。培養上清液分裝待測, 而細胞則保存備用。

市售之 IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β 之 ELISA test kit (購自 R&D) 所載明之測定法分別測定其釋出量 [17]。另外以市售之 sIL-2R, sCD4, sCD8 之 ELISA test kit (購自 T Cell Sciences) 所載明之測定法分別測定其釋出量 [10]。

Recombinant interleukin-2 對末梢單核球增生影響

將正常人及 Bowen's 症病人之 MNC 濃度調至 2×10^6 /ml 後備用。取 96 well 之 microtitration plate 分別加入兩組之細胞 50 μ l, 再加入 6 unit/ μ l 之 rIL-2, 購自 Biosource 50 μ l, 置於 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 細胞培養箱 (incubator) 7 天後, 加入 0.5 μ Ci 之 [³H]-thymidine (specific activity 6.7 Ci/ mmol, 購自 DuPont), 6 小時後以細胞收集儀 (cell harvester) 收集, 將取得之濾紙片加入 2 ml 螢光測定液 (counting fluid), 以 β -counter 測其 cpm (count per minute) [15]。

以 flow cytometry 測定 IL-2R 之 α chain (P55) 及 β chain (P75) 之表現

將以 PHA (10 μ g/ml) 刺激之細胞加入 FITC-labelled mAb specific for IL-2R P55 抗體或 phycoerythrin-labelled mAb specific for IL-2R P75 抗體 (購自 Becton & Dickinson) 10 μ l, 於 4 $^{\circ}$ C 下 stain 30 分鐘後, 以 PBS 緩衝液清洗 2 次, 再以 flow cytometer (FACScan, Becton & Dickinson) 分析, 以螢光強度 (fluorescence intensity) 為指標, 測定 IL-2R α chain 及 β chain 之表現 [18]。

淋巴球中 tyrosine kinase 活性測定

將正常人及 Bowen's 症病人之 MNC 濃度調至 2×10^6 /ml, 分別以 PHA 10 μ g/ml 刺激三天後, 以超音波振盪器 (HERT System XL 2020) 將細胞震碎, 5000 rpm 離心 10 分鐘後, 取出內含 tyrosine kinase 之上清液, 以市售之 tyrosine kinase kit (購自 Boehringer Mannheim) 以 ELISA 法測定其活性。而 inhibition test 之做法則是加入 EDTA 與

piceatannol 抑制 tyrosine kinase 之活性, 求得 non-tyrosine kinase 之活性 [19]。

資料統計分析

所有實驗之結果均以 Mann-Whitney U test 為統計方法。結果之表示法為 Mean \pm SD, 且統計之 p 值 <0.05 則視為具有統計上之差異。

結 果

MNC 上清液其 cytokines 之釋出量

以酵素免疫法測定 cytokines 之釋出, 在 IFN- γ , TNF- α 之自然釋出 (spontaneous release), 正常人分別為 126.1 ± 28.8 pg/ml 及 107.1 ± 21.5 pg/ml, 波文氏症病人分別為: 7.8 ± 1.5 pg/ml 及 68.7 ± 16.1 pg/ml, 波文氏症病人之釋出低於正常人 ($p < 0.005$)。PHA 刺激後之釋出, 正常人分別為 623.5 ± 94.9 pg/ml 及 239.3 ± 110.0 pg/ml, 波文氏症病人分別為 22.9 ± 3.8 pg/ml 及 84.1 ± 19.3 pg/ml, 波文氏症病人之釋出低於正常人 ($p < 0.005$)。在 IL-2 之自然釋出, 正常人為 5.4 ± 1.1 pg/ml, 波文氏症病人為 14.4 ± 6.9 pg/ml, 波文氏症病人之釋出高於正常人 ($p < 0.005$)。PHA 刺激後之釋出, 正常人為 17.3 ± 4.0 pg/ml, 波文氏症病人為 73.9 ± 34.5 pg/ml, 波文氏症病人之釋出高於正常人 ($p < 0.005$)。在 IL-1 β 之自然釋出, 正常人為 124.3 ± 25.3 pg/ml, 波文氏症病人為 119.9 ± 36.7 pg/ml, 波文氏症病人之釋出與正常人無明顯差異。PHA 刺激後之釋出, 正常人為 165.7 ± 30.8 pg/ml, 波文氏症病人為 151.1 ± 20.3 pg/ml, 波文氏症病人之釋出與正常人無明顯差異 (表一)。(assay range, IFN- γ : 15.6-1000 pg/ml、TNF- α : 15.6-1000 pg/ml、IL-2: 31.2-2000 pg/ml、IL-1 β : 3.9-250 pg/ml)。

MNC 上清液 soluble surface antigens 之釋出量

以酵素免疫法測定 soluble surface antigens 之釋出, 在 sIL-2R 之自然釋出, 正常人為 4.3 ± 2.3 pmol/ml, 波文氏症病人為 3.2 ± 1.0 pmol/ml。

pmol/ml, 波文氏症病人之釋出與正常人無明顯差異。PHA 刺激後之釋出, 正常人為 120.8 ± 17.6 pmol/ml, 波文氏症病人為 8.1 ± 4.3 pmol/ml, 波文氏症病人之釋出遠低於正常人 ($p < 0.005$)。sCD4 之自然釋出, 正常人為 4.5 ± 1.9 U/ml, 波文氏症病人為 19.7 ± 2.3 U/ml, 波文氏症病人之釋出高於正常人 ($p < 0.005$)。但 PHA 刺激後之釋出, 正常人為 22.6 ± 3.4 U/ml, 波文氏症病人為 16.4 ± 4.3 U/ml, 波文氏症病人之釋出卻低於正常人

($p < 0.005$)。在 sCD8 之自然釋出, 正常人為 132.7 ± 46.1 U/ml 波文氏症病人為 265.2 ± 78.1 U/ml, 波文氏症病人之釋出高於正常人 ($p < 0.005$)。PHA 刺激後之釋出, 正常人為 597.3 ± 119.0 U/ml, 波文氏症病人為 340.1 ± 92.8 U/ml, 波文氏症病人之釋出低於正常人 ($p < 0.005$)(表二)。(assay range, sIL-2R: 2.1-150 pmol/ml, sCD4: 4-62 U/ml, sCD8: 125-620 U/ml)。

表一 以 ELISA 測定 MNC 經刺激後培養上清液中 cytokines 之濃度

Group	Cytokine (pg/ml)			
	IFN- γ	TNF- α	IL-2	IL-1 β
NC				
Spont. R. ^a	126.1 \pm 28.8	107.1 \pm 21.5	5.4 \pm 1.1	124.3 \pm 25.3
PHA ^b	623.5 \pm 94.9	239.3 \pm 110.0	17.3 \pm 4.0	165.7 \pm 30.8
Bowen's D				
Spont. R.	7.8 \pm 1.5 ^c	68.7 \pm 16.11 ^c	14.4 \pm 6.9 ^c	119.9 \pm 36.7
PHA	22.9 \pm 3.8 ^d	84.1 \pm 19.3 ^d	73.9 \pm 34.5 ^d	151.1 \pm 20.3

^aSpont. R. : spontaneous release

^bPHA : phytohemagglutinin

^ccancer group vs NC group (Spont. R.), $p < 0.005$

^dcancer group vs NC group (PHA), $p < 0.005$

N=16

表二 以 ELISA 測定 MNC 經刺激後培養上清液中 soluble T cell surface antigens 之濃度

Surface antigen	sIL-2R(pmol/l)	sCD4(U/ml)	sCD8(U/ml)
NC			
Spont. R. ^a	4.3 \pm 2.3	4.5 \pm 1.9	132.7 \pm 46.1
PHA ^b	120.8 \pm 17.6	22.6 \pm 3.4	597.3 \pm 119.0
Bowen's D			
Spont. R.	3.2 \pm 1.0	19.7 \pm 12.3 ^c	265.2 \pm 78.1 ^c
PHA	8.1 \pm 4.3 ^d	16.4 \pm 4.3 ^d	340.1 \pm 92.8 ^d

^aSpont. R. : spontaneous release

^bPHA : phytohemagglutinin

^ccancer group vs NC group (Spont. R.), $p < 0.005$

^dcancer group vs NC group (PHA), $p < 0.005$

N=16

以 recombinant interleukin-2 刺激周邊血液單核球測細胞之增生

在控制組及實驗組之 [³H]-thymidine uptake 在加入 rIL-2 後均有增強之情形，正常人為 2136 ± 355 cpm，波文氏症病人為 1191 ± 385 cpm，顯示波文氏症病人之表現遠低於正常控制組(P<0.001)(表三)。證實波文氏症病人之 IL-2R 功能確低於正常控制組。

IL-2R 之 α chain (P55)及 β chain (P75)之表現

在 IL-2R 之 α chain 之表現，波文氏症病人及正常控制組加入 PHA 時其表現會增強，正常人為 465.0 ± 37.5 fluorescence intensity (FI)，波文氏症病人為 395.8 ± 30.5 FI，顯示波文氏症病人之表現低於正常控制組

表現，波文氏症病人及正常控制組加入 PHA 時其表現會增強，正常人為 321.1 ± 233.5 FI，波文氏症病人為 211.9 ± 15.7 FI，顯示波文氏症病人之表現也低於正常控制組 (P<0.001)(表五)。

Tyrosine kinase 活性之測定

經 PHA 刺激後，以 total kinase activity 為 100%，正常人之 tyrosine kinase 活性百分比為 51.2%，波文氏症病人之 tyrosine kinase 活性之百分比為 41.9%，顯示其活性低於正常人。而 non-tyrosine kinase 之活性百分比正常人為 43.0，波文氏症病人為 52.9%，卻高於正常人 (表六)。(tyrosine kinase activity 之 assay range 為: 0.1-30 pmol/ml)

表三 以 rIL-2 刺激培養 MNC 後測定 [³H]-TdR

Group	[³ H]-TdR (cpm)	
	RPMI	rIL-2
NC	504±170	2136±355
BOW	626±353	1191±385 ^a
Mean±SD	N=8	^a :p<0.001

NC : Normal control

BOW : Bowen's disease

rIL-2 : recombinant interleukin-2

表四 以 flow cytometry 測定經處理後培養之 MNC IL-2Rα chain 之呈現

Group	IL-2Rα chain (fluorescence intensity)	
	Control	PHA
NC	369.0±80.6	465.0±37.5
BOW	343.1±29.4	395.8±30.5 ^a
Mean±SD	N=12	^a :p<0.005

NC : Normal control

BOW : Bowen's disease

(P<0.005)(表四)。而 IL-2R 之 β chain 之

Taiwan Public Health Association
台灣公共衛生學會

表五 以 flow cytometry 測定經處理後培養之 MNC IL-2R β chain 之呈現

Group	IL-2R β chain (fluorescence intensity)	
	Control	PHA
NC	225.1 \pm 126.7	321.1 \pm 233.5
BOW	204.2 \pm 40.7	211.9 \pm 15.7 ^a

Mean \pm SD

N=9

^a:p<0.001

NC : Normal control

BOW : Bowen's disease

表六 以 ELISA 法測定培養 MNC tyrosine kinase 活性百分比

Group	Kinase activity (%)		
	Total kinase	Tyrosine kinase	Non-tyrosine kinase
NC	100	51.2	43.0
BOW	100	41.9	52.9

NC : Normal control

N=6

BOW : Bowen's disease

討 論

癌症之發生和免疫功能有關，免疫功能包括了細胞性免疫 (cellular immunity) 和體液性免疫 (humoral immunity)，而其中細胞免疫功能更是人體對腫瘤對抗能力的指標。cytokines 之釋出可以調控細胞性免疫反應。而 cytokines 在 T 細胞之活化及細胞毒殺功能的促進更份有重要角色。T 細胞之活化可以 IL-1, IL-2 等 cytokines，或細胞表面接受體 sIL-2R 及細胞表面抗原 sCD4, sCD8 之釋出為指標，而 IFN- γ , IL-2 與 TNF- α 之釋出則是代表了細胞毒殺功能。因此測定其周邊血液單核球培養上清液中 cytokines 及表面抗原釋出量的變化，可評估免疫反應能力是否正常，因此本研究測定了 IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-1 β , sIL-2R, sCD4, sCD8 的釋出

。結果發現 IFN- γ , TNF- α , sIL-2R, sCD4, sCD8 之釋出均較正常人減少，但 IL-2 之釋出卻比正常人增加。而 IL-2 釋出量與 sIL-2R 表現均和 T cell 之活化能力有關，據此推測波文氏症病人可能因 IL-2R 有缺失使得 IL-2 釋出後無法和 IL-2R 有效結合造成免疫功能失調，由 MNC 增殖實驗中，以 rIL-2 刺激波文氏症病人之 MNC，其 [³H]-thymidine uptake 值較正常控制組低 (P<0.001) 得到證實。

IL-2R 至少由三個 subunits 所組成，包括 55 KD 之 α chain，75 KD 之 β chain 及 64 KD 之 γ chain。IL-2R 與 IL-2 結合之親合力可分為三類： α chain 本身具低度親和性之 IL-2 結合能力，由 β , γ chain 形成之 heterodimer 具中度親和性， β chain 或 γ chain 本身不具 IL-2 結合能力，而高度親和性之 IL-2R 是由 α , β , γ chain 形成之

heterotrimer 所組成 [20]。α chain 與 IL-2 之結合有關，但與細胞訊息之傳遞無關。β chain 則在 IL-2 引發之訊息傳遞功能上扮演決定性之角色。γ chain 在與 IL-2 結合及細胞內訊息傳遞都是不可或缺的。若人體缺乏 γ chain 則會造成 X-linked severe combined immunodeficiency 的發生 [21]。因此偵測 IL-2R α 及 β subunits 之表現，可以評估 IL-2 與 IL-2R 間結合之能力。當我們將波文氏症病人與正常人周邊血液之 MNC 分離出後，以 PHA 刺激後，再加入單株抗體作用，以 flow cytometry 來測定 IL-2R α 與 β 之表現。結果發現在 IL-2R α chain 和 β chain 呈現方面，波文氏症病人其呈現均較正常人低。顯示波文氏病人之 IL-2R 功能低下。由以上結果推論：波文氏症病人其 T 細胞上 IL-2R 之表現異於正常人，因而造成 T cell 上 IL-2R 無法和 IL-2 正常結合而造成免疫功能低下。

Cytokines receptor 之 subunit 和增殖因子之 receptor 不同，其不具 tyrosine kinase 之領域 (domain)，但是經由 cytokines 之刺激也可立即引發細胞內蛋白之酪胺酸磷酸化 (tyrosine phosphorylation) [21]。Fung 等發現 tyrosine kinase 與人類 T 細胞 IL-2R β chain 之間有非共價 (noncovalent) 結合存在 [22]，當 IL-2 與 IL-2R 結合後，IL-2R 上 β chain 與活化之 p56^{lck} 以及其它 effector 分子經由 tyrosine phosphorylation 後，引發 T 細胞增殖有關之訊息傳遞 [23]。因此測定細胞內 tyrosine kinase 之活性可做為細胞 tyrosine phosphorylation 程度之指標。經由測定波文氏症病人之 tyrosine kinase 之活性發現波文氏症病人活性百分比有降低之情形，此意謂患者 MNC 之訊息傳遞已受阻礙。

波文氏症病人之末梢單核球之 T 細胞活化與細胞毒殺作用等免疫功能均呈現低下，且 IL-2R α, β chain 之呈現與 tyrosine kinase 之活性降低，均證實波文氏症病人 IL-2R 之功能低下。另 IL-2 與 IL-2R 之親和力 (binding affinity) 初步之探討結果測知波文氏症病人較正常人低下之趨勢。造成波文氏症病

人 IL-2R 功能缺失之可能原因有下列幾點：(1) 砷對淋巴球之直接作用，砷對淋巴球之增殖作用呈 biphasic effect，高濃度砷對 T 細胞之增殖有抑制作用，低濃度砷則有增強作用 [15]。尿液中之砷濃度常被當作人體砷暴露之指標，過去吾人研究發現皮膚砷癌之病人尿之砷濃度極高，約為正常人濃度之三倍 [24]。波文氏症病人之淋巴球 (lymphocyte) 長期暴露於高濃度砷，可能導致 IL-2R 功能之異常。(2) 人之癌細胞可能釋放出某些因子，壓制了 IL-2R 的功能。(3) 發病前病人細胞之功能即為異常。(4) 其他如病人癌組織可能促使抑制 T 細胞 (suppressor T cells) 釋出抗體或抑制因子 (blocking factor) [15]，導致 IL-2R 功能之低下。但以上之推論均有待進一步之探討。

致 謝

本論文之完成，感謝國科會 NSC 84-2621-B-037-002 Z 在研究經費上之協助。

參考文獻

1. Stites DP, Terr AI: Basic Human Immunology. 1st. Norwalk, CT/San Mateo, CA: Prentice-Hall International Inc. 1991;34-9.
2. Depper JM, Leonard WJ, Kronke M, Noguchi PD, Cunningham RE, Waldmann TA and Greene WC: Regulation of interleukin 2 receptor expression: effects of phorbol diester, phospholipase C, and reexposure to lectin or antigen. J Immunol. 1984; 133: 3054-61.
3. Norris DA, Weston WL: Cellular immune mechanisms of skin disease. Norwalk: Appleton and Lange, 1991; 23-6.
4. Rubin LA, Kurman CC, Fritz ME, Biddison WE, Boutin B, Yarchoan R, Nelson DL: Soluble interleukin-2 receptors are released from activated human lymphoid cells in vitro. J Immunol. 1985; 135: 3172-7.
5. Symons JA, McCulloch JF, Wood MC, Duff GW

- Soluble CD4 in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1991; 60: 72-81.
6. Tomkinson BE, Brown MC, Ip SH, Carrabis S, Sullivan JL: Soluble CD8 during T cell activation. *J Immunol.* 1989; 142: 2230-6.
 7. Wanebo HJ, Pace R, Hargett S, Katz D, Sando J: Production of and response to interleukin-2 in peripheral blood lymphocytes of cancer patients. *Cancer* 1986; 57: 656-62.
 8. Ursula EB, Sabin VK, Wilfried S, Carola SF, Jurgen SM, Harald G: Cytokine levels in whole blood cell culture as parameters of the cellular immunological activity in patients with malignant melanoma and basal cell carcinoma. *Cancer* 1993; 71: 231-6.
 9. Ursula EB, Kleist SV, Sauter W, Gallati H, Monting JS: Impaired cytokine production in whole blood cell cultures of patients with gynaecological carcinomas in different clinical stages. *Br J Cancer* 1993; 68: 32-6.
 10. Kuo WR, YU HS, Chang KL, Juan KH, Jan YS, YU CL: Increased production of tumor necrosis factor- α and release of soluble CD4 and CD8 molecules, but decreased responsiveness to phytohemagglutinin in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Formos Med Assoc.* 1994; 93: 569-75.
 11. Fierro MT, Lisa F, Novelli M, Bertero M, Bernengo MG: Soluble interleukin-2 receptor, CD4 and CD8 levels in melanoma: a longitudinal study. *Dermatology* 1992; 184: 182-9.
 12. Tseng WP, Chu MM, How SW, Fong JM, Lin CS, Yeh S: Prevalence of skin cancer in an endemic area of chronic arsenicism in Taiwan. *J Nat Cancer Inst.* 1968; 40: 453-63.
 13. Chen CJ, Chung YC, Lin TM and Wu HY: Malignant neoplasms among residents of a black-foot disease endemic area in Taiwan: High arsenic artesian well water and cancer. *Cancer Res.* 1985; 45: 5895-9.
 14. Yu HS, Chen GS, Sheu HM, Kao JS, Chang KL, Yu CL: Alternation of skin-associated lymphoid tissue in the carcinogenesis of arsenical skin cancer. *Proceedings of the National Science Council, ROC Part B: Life Sciences.* 1992; 16: 17-22.
 15. Yu HS, Chang KL, Wang CL: Alternations of mitogenic response of Dermatol Dear cell by arsenic in arsenical skin cancer. *J Dermatol.* 1992; 19: 710-4.
 16. Yu CL, Chang KL, Chiu CC, Chiang BN, Han SH and Wang SR: Alternation of mitogenic responses of mononuclear cell by anti-ds DNA antibodies resembling immune disorders in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol.* 1989; 18: 265-6.
 17. Yu CL, Chang KL, Chiu CC, Chiang BN, Han SH and Wang SR: Defective phagocytosis, decreased tumor necrosis factor- α production and lymphocyte hyporesponsiveness predispose patient with systemic lupus erythematosus to infection. *Scand J Rheumatol.* 1989; 18: 97-105.
 18. Kierszenbaum F. and Szein MB: Trypanosoma cruzi suppresses the expression of the P75 chain of interleukin 2 receptor on the surface of activated helper and cytotoxic human lymphocyte. *Immunology* 1992; 75: 546-9.
 19. Robert LG and Jerry LM. Piceatannol (3,4,3',5'-tetra-hydroxy-trans-stilbene) is a naturally occurring protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochim Biophys Res comm.* 1989; 165:241-5.
 20. Noguchi M, Nakamura Y, Russell SM, Ziegler SF, Tsang M, Cao X, Leonard WJ: Interleukin-2 receptor γ chain: A functional component of the interleukin-7 receptor. *Science* 1993; 262: 1877-80.
 21. Nakamura M, Sugamura K: Interleukin-2. *J Clin Exp Med. (IGAKU NO AYUMI)* 1995; 14: 1009-13.
 22. Fung MR, Scarse RM, Hoffman JA, Peffer NJ, Hammes SR, Hoskin JB, Schmandt R, Kuziel WA, Haynes BF, Mills GB, Greene WC: A tyrosine kinase physically associates with the β -subunit of the human IL-2 receptor. *J Immunol.* 1991; 147: 1253-60.
 23. Asao H, Takeshita T, Nakamura M, Nagata K, and Sugamura K: Interleukin 2 (IL-2) induced tyrosine phosphorylation of IL-2 receptor p75. *J Exp Med*

- 1990; 171: 637-44.
24. Yu HS, Sheu HM, Ko SS, Chiang LC, Chien CH, Lin SM, Tserng BR, Chen CS: Studies on blackfoot disease and chronic arsenism in southern Taiwan: with special reference to skin lesions and fluorescent substances. *Dermatol.* 1984; 11: 361-70.

