

口腔潜在恶性病变唾液生物标记物对口腔鳞癌的癌前预测

段铸辉*, 董国伟, 辛宝琴, 冯小琼, 许艺然, 邵贝贝

郑州大学附属洛阳中心医院口腔科, 河南 洛阳

收稿日期: 2023年1月21日; 录用日期: 2023年2月17日; 发布日期: 2023年2月24日

摘要

目的: 本研究通过比较口腔鳞状细胞癌(OSCC)、口腔潜在恶性病变(OPMD)及对照组的唾液中IL-6、IL-8、MMP-9的浓度差别, 筛选出能够用于预测OSCC发生的特异性的唾液分子标记物。方法: 将60名受试者分为3个研究组, 即OSCC组($n = 20$)、OPMD组($n = 20$)和健康对照组($n = 20$)。所有受试者均提供非刺激性的唾液样本, 使用ELISA试剂盒检测IL-6、IL-8、MMP-9的浓度。结果: OSCC组的唾液IL-6、IL-8、MMP-9浓度显著高于对照组($P < 0.05$), OPMD组的唾液IL-6、IL-8、MMP-9浓度高于对照组, 且IL-8的浓度具有统计学差异($P < 0.05$)。OSCC组的唾液IL-6、IL-8、MMP-9的浓度显著高于OPMD组($P < 0.05$)。结论: 本研究表明OSCC唾液中的IL-6、IL-8、MMP-9的浓度相比对照组显著增高, 且OSCC和OPMD组间唾液IL-6、IL-8、MMP-9的浓度存在统计学差异。唾液IL-6、IL-8、MMP-9在OSCC和OPMD的治疗、癌前预测及随访中是一种有临床参考价值的特异唾液分子标志物。

关键词

口腔潜在恶性病变, 口腔鳞状细胞癌, 唾液生物标记物, 癌前预测

Precancerous Prediction of Oral Squamous Cell Carcinoma by Salivary Biomarkers in Potential Oral Malignant Lesions

Zhuhui Duan*, Guowei Dong, Baoqin Xin, Xiaoqiong Feng, Yiran Xu, Beibei Shao

Department of Stomatology, Luoyang Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Luoyang Henan

Received: Jan. 21st, 2023; accepted: Feb. 17th, 2023; published: Feb. 24th, 2023

*通讯作者 Email: Anndepp@163.com

文章引用: 段铸辉, 董国伟, 辛宝琴, 冯小琼, 许艺然, 邵贝贝. 口腔潜在恶性病变唾液生物标记物对口腔鳞癌的癌前预测[J]. 临床医学进展, 2023, 13(2): 2750-2758. DOI: 10.12677/acm.2023.132388

Abstract

Objective: To screen specific salivary biomarkers that can be used to predict the occurrence of OSCC by comparing the concentrations of IL-6, IL-8 and MMP-9 in saliva of oral squamous cell carcinoma (OSCC), oral potential malignant disease (OPMD) and control group. **Methods:** 60 subjects were divided into three study groups, named OSCC group (n = 20), OPMD group (n = 20) and healthy control group (n = 20). All subjects provided non irritant saliva samples, and detected the concentrations of IL-6, IL-8 and MMP-9 with ELISA kit. **Results:** The salivary concentrations of IL-6, IL-8 and MMP-9 in OSCC group were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$). The salivary concentrations of IL-6, IL-8 and MMP-9 in OPMD group were higher than those in control group, and the concentration of IL-8 was statistically different ($P < 0.05$). The saliva concentration of IL-6, IL-8 and MMP-9 in OSCC group was significantly higher than that of OPMD group ($P < 0.05$). **Conclusions:** This study shows that the saliva concentration of IL-6, IL-8 and MMP-9 in OSCC is significantly higher than that of the control group, and the saliva concentration of IL-6, IL-8 and MMP-9 between OSCC and OPMD groups is statistically different. Salivary IL-6, IL-8 and MMP-9 are specific salivary biomarkers with clinical reference value in the treatment, precancerous prediction and follow-up of OSCC and OPMD.

Keywords

Oral Potential Malignant Disease (OPMD), Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), Saliva Biomarker, Precancerous Prediction

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

口腔鳞状细胞癌(Oral squamous carcinoma, OSCC)是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 占口腔恶性肿瘤的 90% [1] [2]。大多数 OSCC 是在晚期临床阶段(即 III 或 IV)被发现[1] [2] [3], 因此, OSCC 诊断的延迟是高发病率和死亡的主要原因之一, 严重影响公共卫生健康[3] [4]。口腔鳞状细胞癌(OSCC)作为一种危及生命的疾病, 大多数是由口腔潜在恶性疾病(Oral potential malignant disorders, OPMD)发展而来[5] [6]。世界卫生组织将白斑(Leukoplakia)、红斑(Erythroplakia)、口腔粘膜下纤维化(Oral submucous fibrosis, OSMF)和口腔扁平苔藓(Oral lichen planus)等存在癌症发展风险的疾病定义为口腔潜在恶性病变(OPMD) [7] [8], 并且此类疾病的癌变往往发生在口腔癌进展的早期[9] [10]。早期诊断的 OSCC 相对于晚期病损的患者具有较好的预后及生存率[11]。

目前, 组织学活检仍是口腔鳞癌诊断的“金标准” [4]。但病理活检采样部位灵活, 采样技术要求高, 因此, 仅依靠病理活检可能会延迟口腔癌的诊断。最近的研究评估了一种非侵入性的方法——“液体活检”, 通过检测体液(包括血浆、唾液、尿液等)中的生物标记物在口腔鳞癌患者诊断和预后中的潜在应用[12] [13] [14]。口腔鳞状细胞癌与口腔微环境密切相关, 直接与唾液接触[15] [16] [17], 因此选择唾液作为检测媒介, 分析其中的生物标志物, 可为 OSCC 的早期诊断和改善预后提供有用的信息[12] [17] [18]。对于口腔科医生来说, 利用唾液采集具有无创性和易于收集的特点进行早期口腔鳞癌的预测, 通过寻找并验证反映 OPMD 癌变风险的标志物对 OSCC 的早期筛查具有重要意义。

有研究发现, 分子标志物白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 对于口腔黏膜内的恶性转化过程非常重要。唾液中 IL-6 的浓度作为 OSCC 早期诊断的生物学标志物具有重要参考价值, 且 IL-6 浓度变化还与 OSCC 早期复发率正相关[19] [20]。已有研究证实慢性炎症可以促进 OPMD 的恶变, 而 IL-8 作为一种炎症状态下的促炎因子与多种恶性肿瘤的侵袭关系密切[21]。除此之外, MMP-9 能够导致基底膜的蛋白水解, 从而促进肿瘤的侵袭和转移[22]。近年来针对口腔鳞癌的非侵入性检测研究中, 缺乏有效的证据用于佐证 IL-6、IL-8 及 MMP-9 在口腔鳞癌早期预测及诊断的特异性及准确性。到目前为止, 还没有合适的生物标记物在临床实践中用于口腔癌的早期诊断[23] [24]。

因此, 本研究旨在通过检测 OPMD 患者中唾液生物标志物 IL-6、IL-8 及 MMP-9 的情况, 比较 OPMD 与 OSCC 唾液生物标志物 IL-6、IL-8 及 MMP-9 含量的差别, 找到并验证唾液生物标志物的特异性, 用于监测 OPMD 及 OSCC 的病情变化, 将可能出现恶性转化的病变发现在早期, 施加干预, 改善患者预后, 期望为医生提供临床诊断的预警指标及一种新的可靠的癌前预测方法。

2. 材料与方法

2.1. 研究分组

本研究将诊断为口腔鳞状细胞癌($n = 20$)的患者, 口腔白斑和口腔扁平苔藓等 OPMD ($n = 20$)的患者以及完全健康($n = 20$)的患者分为三组, 共采集 60 份唾液样本纳入研究。该研究方案得到了郑州大学附属洛阳中心医院伦理委员会的批准, 且该研究是参照 2008 年的《赫尔辛基宣言》进行的。研究开始之前, 所有患者或家属均签署知情同意书。

2.2. 口腔唾液样本的采集

采集所有受试者非刺激条件下的唾液样本, 唾液样本采集前 2 小时内不得进食、刷牙或使用漱口水。嘱受试者做吞咽和咀嚼动作 60 秒, 让他们前倾头部, 将 5 毫升唾液吐入无菌容器。临床获取的唾液样本立即置于冰上运送至实验室处理待用。

2.3. 纳入标准

组织病理学确诊的 18 岁以上的 OSCC 和临床诊断为 OPMD 病例以及健康对照组纳入研究。OPMD 组主要包括白斑、红斑和扁平苔藓。对照组为口腔黏膜健康, 无明显牙龈及牙周炎症, 无吸烟习惯的健康人。

2.4. 排除标准

排除自身免疫性疾病、既往恶性肿瘤史、放化疗史、手术或替代药物治疗、免疫缺陷、肝炎、人类免疫缺陷病毒感染、妊娠或哺乳期妇女。

2.5. 口腔鳞癌唾液分子标志物的验证

将上述临床收集到的唾液样本用 PBS 缓冲液按 1:5 的比例稀释, 4°C , 12,000 rpm 离心 10 分钟, 收集上清液, 于 -80°C 保存, 待用。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各实验组上清中的 MMP-9、IL-6、IL-8 等唾液生物标志物水平。在波长 450 nm 处读取所得混合物的强度。一组标准品与样品一起运行, 最终值以 pg/mL , ng/mL 为单位。该实验程序由经过培训的专业实验人员执行。

2.6. 统计分析

所有分析均使用 SPSS 版本 21.0 (IBM, USA)完成。P 值 < 0.05 被认为具有统计学意义。组间比较采

用 Tukey 检验后的单因素方差分析(ANOVA)。

3. 结果

3.1. 三组患者唾液特征及 IL-6、IL-8、MMP-9 的含量数据统计

表 1 总结了三组患者进行生物标志物分析的唾液特征，为减少个体间的差异，我们尽可能的控制性别、年龄及系统性疾病差异。从表 2 中我们可以看出健康组中 IL-6、IL-8、MMP-9 三种生物标志物的含量低于 OPMD 及 OSCC 组，且三组间生物标志物含量存在统计学差异。

Table 1. Characteristics of saliva samples used for biomarker analysis

表 1. 用于生物标志物分析的唾液样本特征

特征	健康组	OPMD 组	OSCC 组
年龄：范围/平均年龄	21~80/51	29~68/49	31~77/54
性别：男性/女性数量	5/15	7/13	4/16
系统性疾病：有/无	8/12	11/9	14/6

Table 2. Salivary biomarker content in three groups

表 2. 三组唾液生物标志物含量

分类	健康组		OPMD 组		OSCC 组		ANOVA P 值
	均值	标准差	均值	标准差	均值	标准差	
IL-6	22.27	2.16	23.18	2.94	27.57	2.43	P < 0.001
IL-8	30.98	2.80	38.61	1.01	42.56	1.88	P < 0.001
MMP-9	20.80	1.37	23.00	1.56	25.87	3.12	P < 0.001

P < 0.05 被认为具有统计学差异，该实验统计方法采用单因素方差分析(ANOVA)，IL-6、IL-8 的含量单位为 pg/mL，MMP-9 的含量单位为 ng/mL。

3.2. OPMD 患者唾液中 IL-6、IL-8、MMP-9 的含量改变

相比健康对照组，OPMD 患者唾液中的 IL-8 含量显著增加(P = 0.003，图 2)，IL-6 (P = 0.725，图 1)，MMP-9 (P = 0.059，图 3)的含量增加，差异虽无统计学意义，但是依然反映出了增加趋势。IL-8 作为炎症状态下产生的促炎因子，差异具有统计学意义，佐证了 OPMD 患者口腔内的炎症状态。

3.3. OSCC 患者唾液中 IL-6、IL-8、MMP-9 的含量明显升高

与健康对照组相比，我们发现 OSCC 组患者口腔唾液中的 IL-6、IL-8、MMP-9 的含量均显著增加(图 1~3)，差异具有统计学意义。结果表明与癌症改变相关的 IL-6、IL-8、MMP-9 在口腔鳞状细胞癌人群唾液中的浓度是大大增加的，这对我们进行口腔鳞癌的诊断、检测及预后评价方面是具有重要意义的。

3.4. OSCC 与 OPMD 患者唾液中 IL-6、IL-8、MMP-9 含量存在显著差异

除了与健康组的比较，我们还比较了 OPMD 组与 OSCC 组间三种唾液生物标志物的含量差异。结果发现，OSCC 组的 IL-6、IL-8、MMP-9 的含量显著高于 OPMD 组(图 1~3)，证实了上述三种唾液生物标志物的癌前预测作用。当 OPMD 患者口腔唾液中该类生物标志物含量增高时，要高度警示其癌变可能，这为我们在临床上对 OPMD 患者进行癌前预测及早期无创诊断提供了一种方法。

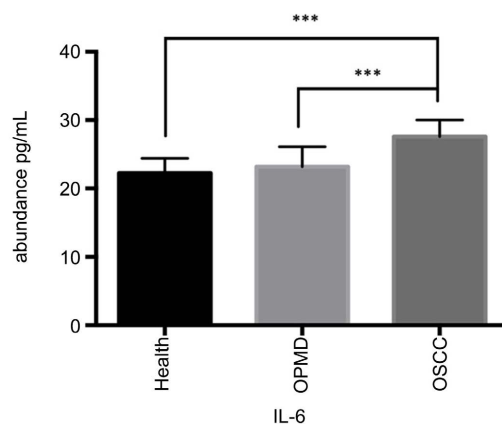


Figure 1. Comparison of IL-6 concentration in saliva among three groups. The saliva concentration of IL-6 in OSCC group was significantly higher than that of healthy control and OPMD group ($P < 0.001$)

图 1. 三组间唾液中 IL-6 含量的比较。OSCC 组唾液中 IL-6 的含量显著高于健康对照和 OPMD 组($P < 0.001$)

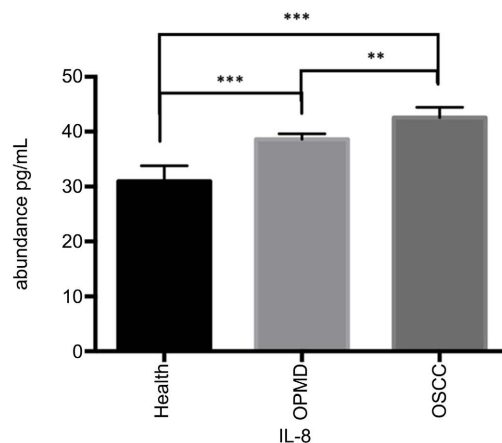


Figure 2. Comparison of IL-8 concentration in saliva among three groups. The saliva concentration of IL-8 in OPMD group was significantly higher than that of healthy control group ($P < 0.001$), and the saliva concentration of IL-8 in OSCC group was significantly higher than that of healthy control group ($P < 0.001$) and OPMD group ($P < 0.01$)

图 2. 三组间唾液中 IL-8 含量的比较。OPMD 组唾液中 IL-8 的含量显著高于健康对照组($P < 0.001$), OSCC 组唾液中 IL-8 的含量显著高于健康对照($P < 0.001$)和 OPMD 组($P < 0.01$)

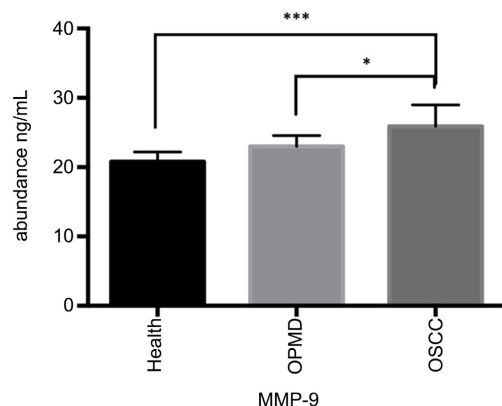


Figure 3. Comparison of MMP-9 concentration in saliva among three groups. The saliva concentration of MMP-9 in OSCC group was significantly higher than that of healthy control group ($P < 0.001$) and OPMD group ($P < 0.05$)

图 3. 三组间唾液中 MMP-9 含量的比较。OSCC 组唾液中 MMP-9 的含量显著高于健康对照($P < 0.001$)和 OPMD 组($P < 0.05$)

4. 讨论

口腔鳞癌是口腔中最常见的恶性肿瘤，它具有侵袭性和高转移率的风险，且发生率在世界范围内呈上升趋势。OSCC 通常存活率较低，原因主要是诊断过晚[25]。OSCC 疾病早期常无自觉症状或症状不明显，发展至中后期才表现出明显的临床症状，因此患者极少在疾病早期阶段寻求诊治，导致大部分患者诊断过晚。组织学活检作为口腔鳞癌诊断的“金标准”，是一种侵入性技术，需要癌变高风险人群的配合，增加了医疗成本负担，对临床医生的采样技术及病理医生的诊断能力都有极高的要求。此外，OSCC 和几种类型的口腔潜在恶性疾病(OPMD)具有相似的外观，导致难以区分 OPMD 和 OSCC [26] [27]。OPMD 的发生往往先于 OSCC 的出现，在病变发展的早期阶段，识别具有较高恶性转化风险的 OPMD 对于预测早期 OSCC 似乎是非常重要的[28] [29]。唾液富含来自口腔的肿瘤 DNA，使其成为检测口腔 OSCC 的有价值的生物标记物。重要的是，在这项原则性研究中，即使是早期口腔癌也与唾液中高度可检测的肿瘤源性 DNA 水平有关。这一发现证明了根据肿瘤的解剖位置检查特定体液的重要性，基于唾液的检测可以纳入口腔肿瘤的诊疗实践，以补充常规检查，以及疾病监测和临床决策[16] [30] [31]。

使用唾液进行 OPMD 监测从而预测 OSCC 的早期发生相比其他标本有许多优点：1) 它被认为是“身体的镜子”，反映身体局部和远处的任何生理和病理变化；2) 它代表了一种更简单、更快和更容易使用的筛查工具；以及 3) 它使我们有机会收集更大数量的样本进行检查，便于重复分析，并随着时间的推移监测 OSCC 的发生发展[14] [32] [33]。

各种研究已经证实，慢性炎症可以影响细胞内环境稳定和多种代谢过程，导致基因组水平的变化，从而促进癌变。此外，一些炎症因子可以促进肿瘤细胞的迁移和侵袭，导致癌症进展。IL-6 是一种具有促生长和抗凋亡活性的多功能细胞因子，其水平的升高与癌症风险的升高有关，并且 IL-6 的水平与 OSCC 的预后也有关。IL-8 作为癌细胞环境中重要的趋化因子，是炎症状态下产生的促炎因子，主要作用于肿瘤相关的巨噬细胞、中性粒细胞和癌细胞上。IL-8 的致癌潜能源于其对中性粒细胞募集、血管生成潜能、增殖能力以及对凋亡的保护能力，能促进 OSCC 的侵袭和迁移[34]。基质金属蛋白酶作为致癌改变的介质可能在调节致癌和侵袭的初始步骤中发挥作用。基质金属蛋白酶-9 (Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9) 能引起基底膜的蛋白水解解体，具有细胞间粘附和细胞外基质间粘附的作用，这是促进肿瘤侵袭和转移的关键步骤[9] [35]。

唾液作为一种液体活检的媒介，其检测的潜力是深远的，其广泛的临床应用才刚刚开始出现[15] [36]。不仅可用于诊断目的，还可以识别和跟踪疾病过程中的肿瘤特异性改变，并指导治疗决策[32] [37] [38]。然而，只有定义标准化程序并进行大型验证研究，才能实现临床实施。因此，本研究期望通过验证与癌变进程关系密切的唾液分子标志物 IL-6、IL-8、MMP-9 在 OPMD 和 OSCC 患者唾液中的改变，起到对 OSCC 的癌前预测，有效改善患者的预后及生存率。

本研究发现 IL-6、MMP-9 在健康对照组和 OPMD 之间未见明显统计学差异，这两种细胞因子主要与癌变和转移有关，表明了 OPMD 组在未出现癌变时，口腔内仅表现出慢性炎症状态，仅存在 IL-8 等炎症细胞因子的显著增高。而在 OPMD 和 OSCC 组间，我们发现 IL-6、IL-8、MMP-9 三种唾液生物标志物均存在统计学差异，高度印证了以上三种唾液生物标志物能够在疾病癌变时反应出口腔唾液内细胞因子水平的改变，为临床早期诊断 OSCC 起到关键作用，使临床医生能够早期干预，延缓疾病的发展进程，改善患者预后。

本研究在患者签署知情同意书时，会有一些 OPMD 患者在完整阅读知情同意书后产生恐癌心理，少数患者因此拒绝采样，导致样本量没有达到预期。在采样时，患者对非刺激性唾液的理解存在偏差，导致收集样本中存在痰液、血液等污染物。应激状态下唾液分泌减少，因此在规定时间内没有收集到规定

样本量而导致采样时间偏长。且本研究大部分样本采集于春夏, 室外温度高, 尽管使用冰盒进行样本转运, 但结合上述综合原因, 可能还是存在蛋白分子的降解问题, 导致部分实验结果不如预期。目前收集样本仅为 1 家医院口腔科就诊的患者人群, 覆盖面不够广。将来可以考虑多家医院合作, 多中心合作, 覆盖更多人群, 增大样本量, 使实验结果更具代表性。

本研究不够完善的是 OPMD 组未经组织活检进行验证, 且缺乏对同一患者的组织、血液、唾液进行同质性研究, 佐证唾液分子诊断的有效性。未来除了验证唾液中相关诊断唾液生物标志物的有效性, 还需完善采样种类, 并发现一些检测结果稳定且有特异性的诊断分子用于鳞状细胞癌的癌前诊断, 并长期用于疾病的监测。唾液分子诊断是一个快速发展的领域, 因其无创性和低成本的特点, 具有极大的潜力, 可以极大地促进公众健康。

基金项目

本研究得到河南省卫生健康委员会联合共建项目的支持(基金号: LHGJ20200865)。

参考文献

- [1] Rivera, C. (2015) Essentials of Oral Cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, **8**, 11884-11894.
- [2] Panzarella, V., Pizzo, G., Calvino, F., *et al.* (2014) Diagnostic Delay in Oral Squamous Cell Carcinoma: The Role of Cognitive and Psychological Variables. *International Journal of Oral Science*, **6**, 39-45.
<https://doi.org/10.1038/ijos.2013.88>
- [3] Shah, J.P. and Gil, Z. (2009) Current Concepts in Management of Oral Cancer—Surgery. *Oral Oncology*, **45**, 394-401.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.05.017>
- [4] Fuller, C., Camilon, R., Nguyen, S., *et al.* (2015) Adjunctive Diagnostic Techniques for Oral Lesions of Unknown Malignant Potential: Systematic Review with Meta-Analysis. *Head & Neck*, **37**, 755-762.
<https://doi.org/10.1002/hed.23667>
- [5] Liu, D., Zhao, X., Zeng, X., Dan, H. and Chen, Q. (2016) Non-Invasive Techniques for Detection and Diagnosis of Oral Potentially Malignant Disorders. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, **238**, 165-177.
<https://doi.org/10.1620/tjem.238.165>
- [6] Prakash, A.R., Nahar, P., Ashtekar, M., *et al.* (2020) Detection of Salivary Alkaline Phosphatase Levels in Smokers, Diabetic Patients, Potentially Malignant Diseases and Oral Malignant Tumours. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, **12**, S430-S435. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_129_20
- [7] Kaur, J., Jacobs, R., Huang, Y., Salvo, N. and Politis, C. (2018) Salivary Biomarkers for Oral Cancer and Pre-Cancer Screening: A Review. *Clinical Oral Investigations*, **22**, 633-640. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2337-x>
- [8] Amagasa, T. (2015) Oral Potentially Malignant Disorders. In: Kirita, T. and Omura, K., Eds., *Oral Cancer*, Springer, Tokyo, 83-98. https://doi.org/10.1007/978-4-431-54938-3_4
- [9] Villa, A., Celentano, A., Glurich, I., *et al.* (2019) World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic Biomarkers in Oral Leukoplakia: A Systematic Review of Longitudinal Studies. *Oral Diseases*, **25**, 64-78.
<https://doi.org/10.1111/odi.13087>
- [10] Sabarathinam, J., Dharman, S. and Selvaraj, J. (2020) Combination Assay for Tumor Markers in Saliva of Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Pharmaceutical Research International*, **32**, 36-45. <https://doi.org/10.9734/jpri/2020/v32i1830687>
- [11] 于雪迪, 孙红英. 代谢组学在口腔癌及口腔癌前病变标志物研究中的应用[J]. *口腔医学*, 2017, 37(4): 369-372.
- [12] Siravegna, G., Marsoni, S., Siena, S. and Bardelli, A. (2017) Integrating Liquid Biopsies into the Management of Cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, **14**, 531-548. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.14>
- [13] Proctor, G.B. (2016) The Physiology of Salivary Secretion. *Periodontology* 2000, **70**, 11-25.
<https://doi.org/10.1111/prd.12116>
- [14] Gai, C., Camussi, F., Brocchetto, R., *et al.* (2018) Salivary Extracellular Vesicle-Associated miRNAs as Potential Biomarkers in Oral Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer*, **18**, Article No. 439.
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4364-z>

- [15] Amerongen, A.N. and Veerman, E. (2002) Saliva—The Defender of the Oral Cavity. *Oral Diseases*, **8**, 12-22. <https://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x>
- [16] Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R. and De Palo, E.F. (2007) Saliva Specimen: A New Laboratory Tool for Diagnostic and Basic Investigation. *Clinica Chimica Acta*, **383**, 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- [17] Wang, J., Chang, S., Li, G. and Sun, Y. (2017) Application of Liquid Biopsy in Precision Medicine: Opportunities and Challenges. *Frontiers of Medicine*, **11**, 522-527. <https://doi.org/10.1007/s11684-017-0526-7>
- [18] 陶谦, 刘鑫. 唾液转录组学与口腔癌标志物[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(4): 211-217.
- [19] Zarogoulidis, P., Yarmus, L., Darwiche, K., et al. (2013) Interleukin-6 Cytokine: A Multifunctional Glycoprotein for Cancer. *Immunome Research*, **9**, Article ID: 1000062. <https://doi.org/10.4172/1745-7580.1000062>
- [20] Wang, D.K. and Liao, G.Q. (2018) Relationship between Interleukins in the Saliva and Oral Cavity Cancer. *West China Journal of Stomatology*, **36**, 325-330.
- [21] Sahibzada, H.A., Khurshid, Z., Sannam Khan, R., et al. (2017) Salivary IL-8, IL-6 and TNF-alpha as Potential Diagnostic Biomarkers for Oral Cancer. *Diagnostics*, **7**, Article No. 21. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7020021>
- [22] Smriti, K., Ray, M., Chatterjee, T., et al. (2020) Salivary MMP-9 as a Biomarker for the Diagnosis of Oral Potentially Malignant Disorders and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, **21**, 233-238. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.1.233>
- [23] Kaczor-Urbanowicz, K.E., Wei, F., Rao, S.L., et al. (2019) Clinical Validity of Saliva and Novel Technology for Cancer Detection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Reviews on Cancer*, **1872**, 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.05.007>
- [24] Cristaldi, M., Mauceri, R., Di Fede, O., et al. (2019) Salivary Biomarkers for Oral Squamous Cell Carcinoma Diagnosis and Follow-up: Current Status and Perspectives. *Frontiers in Physiology*, **10**, Article 1476. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01476>
- [25] Lee, Y.H. and Wong, D.T. (2009) Saliva: An Emerging Biofluid for Early Detection of Diseases. *American Journal of Dentistry*, **22**, 241-248.
- [26] Wu, C.C., Chu, H.W., Hsu, C.W., et al. (2015) Saliva Proteome Profiling Reveals Potential Salivary Biomarkers for Detection of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Proteomics*, **15**, 3394-3404. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500157>
- [27] Gleber-Netto, F.O., Yakob, M., Li, F., et al. (2016) Salivary Biomarkers for Detection of Oral Squamous Cell Carcinoma in a Taiwanese Population. *Clinical Cancer Research*, **22**, 3340-3347. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1761>
- [28] Mascitti, M., Orsini, G., Tosco, V., et al. (2018) An Overview on Current Non-invasive Diagnostic Devices in Oral Oncology. *Frontiers in Physiology*, **9**, Article 1510. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01510>
- [29] Bugshan, A. and Farooq, I. (2020) Oral Squamous Cell Carcinoma: Metastasis, Potentially Associated Malignant Disorders, Etiology and Recent Advancements in Diagnosis. *F1000Research*, **9**, Article No. 229. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22941.1>
- [30] Bellairs, J.A., Hasina, R. and Agrawal, N. (2017) Tumor DNA: An Emerging Biomarker in Head and Neck Cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, **36**, 515-523. <https://doi.org/10.1007/s10555-017-9685-x>
- [31] Chu, H.-W., Chang, K.-P., Hsu, C.-W., et al. (2019) Identification of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection with Untargeted and Targeted Quantitative Proteomics Approaches. *Molecular and Cellular Proteomics*, **18**, 1796-1806. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001530>
- [32] Momen-Heravi, F., Trachtenberg, A. J., Kuo, W. P. and Cheng, Y. S. (2014) Genomewide Study of Salivary Micro-RNAs for Detection of Oral Cancer. *Journal of Dental Research*, **93**, 86S-93S. <https://doi.org/10.1177/0022034514531018>
- [33] Kumar, P., Singh, A., Kumar Kanauija, S. and Pradhan, A. (2018) Human Saliva for Oral Precancer Detection: A Comparison of Fluorescence & Stokes Shift Spectroscopy. *Journal of Fluorescence*, **28**, 419-426. <https://doi.org/10.1007/s10895-017-2203-2>
- [34] Babiuch, K., Kusnierz-Cabala, B., Kesek, B., et al. (2020) Evaluation of Proinflammatory, NF-kappa B Dependent Cytokines: IL-1 α , IL-6, IL-8, and TNF- α in Tissue Specimens and Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and Oral Potentially Malignant Disorders. *Journal of Clinical Medicine*, **9**, Article No. 867. <https://doi.org/10.3390/jcm9030867>
- [35] Feng, Y., Li, Q., Chen, J., et al. (2019) Salivary Protease Spectrum Biomarkers of Oral Cancer. *International Journal of Oral Science*, **11**, Article No. 7. <https://doi.org/10.1038/s41368-018-0032-z>
- [36] Kaczor-Urbanowicz, K.E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., et al. (2017) Saliva Diagnostics—Current Views and Directions. *Experimental Biology and Medicine*, **242**, 459-472. <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>

-
- [37] Wong, D.T. (2015) Salivary Extracellular Noncoding RNA: Emerging Biomarkers for Molecular Diagnostics. *Clinical Therapeutics*, **37**, 540-551. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2015.02.017>
- [38] Li, Q., Ouyang, X., Chen, J., Zhang, P. and Feng, Y. (2020) A Review on Salivary Proteomics for Oral Cancer Screening. *Current Issues in Molecular Biology*, **37**, 47-56. <https://doi.org/10.21775/cimb.037.047>