

# 中華民國第 61 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

高級中等學校組 動物與醫學科

第一名

052015

SeC 輔助抗癌藥物對肝癌療效與其機制探討

學校名稱：桃園市私立復旦高級中學

作者： 高二 陳芯儀	指導老師： 莊桂琴
---------------	--------------

關鍵詞：L-硒代胱氨酸(L-Selenocystine; SeC)、  
Cisplatin、同源重組活性

# 得獎感言

## 認識另一個自己

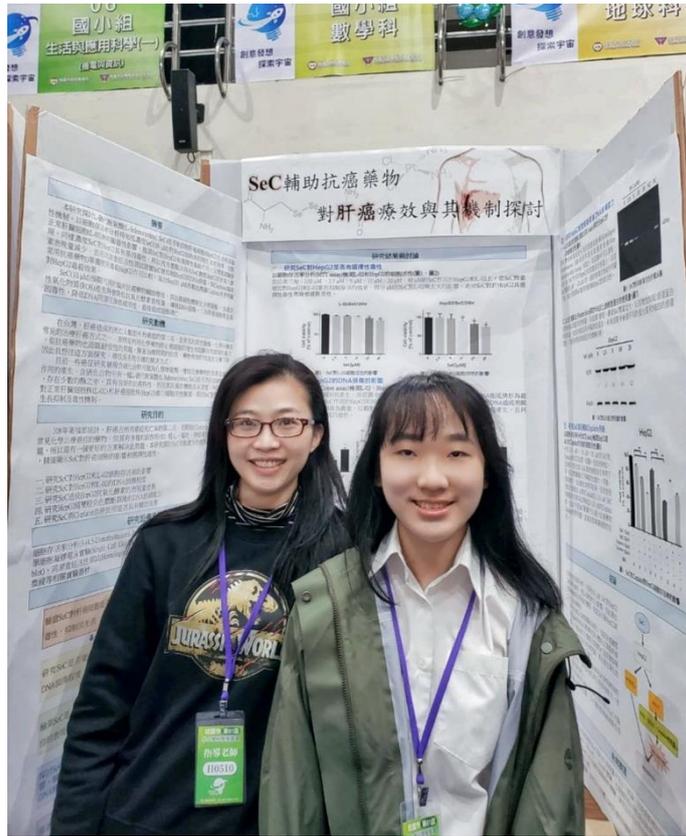
很感謝今年科展能在科教館努力下順利舉行，但因疫情影響沒有往年的盛大，卻也是全新的體驗，以線上的方式發表實驗內容，並在直播頒獎後畫下完美的句點，不留下任何遺憾。

回想起剛開始接觸實驗時，實驗一再的失敗並重做儼然成為常態，卻間接鍛鍊我細心處事的態度。而在比賽初期，為了趕作品說明書、海報，必須時常向學校請假至實驗室趕工，也因此經常熬夜到清晨，甚至比段考前還要晚睡，而讓我支撐下去的動力就是對實驗的「熱情」，使我有更大的精力一邊應付課程一邊進行科展，路程雖然辛苦且漫長，但從中得到的絕對是獨有且珍貴。

在桃園市賽前，透過不斷的練習克服對口頭報告的排斥、改善口齒不清的缺點，最後才能在評審前侃侃而談，展現我對研究的自信，並得到評審的肯定後拿到桃園代表權前進全國。在競賽中看到許多年齡相仿同學的作品，除了讓我認知到自己的渺小，也更願意放手去闖，與其結果我更喜歡和其他學生交流的感覺，嘗試理解對方的研究內容，學習他們的優點並精進自身能力，這也是科展舉辦的最大意義吧！

繼桃園市賽結束後，能再進入到複審的階段已經心滿意足，從未想過能在眾多縣市作品中脫穎而出，拿到全國第一的殊榮。憶起當時看直播的心情，既緊張又激動，直到最後一刻赫然看到我的名字時，內心的感動及感謝不言而喻。我覺得能獲獎不是因為我比其他同學優秀，而是我比其他人幸運一點點，有帶我走入科展的莊桂琴老師、提供我比賽經驗的姊姊、以及背後給予最大支持的父母，讓我在競賽道路上逐漸蛻變、不斷成長，從最初的害怕到自信、茫然到堅信，創造我高中生活最精彩的回憶。

謝謝一路上評審教授的青睞及教導，讓我在每個階段的結束看到另一個自己，看到那勇敢、無畏的自己，同時也謝謝曾經幫助過我的人，不論是朋友或師長，有你們的陪伴才有現在的我。對我來說，全國科展的旅途不是結束，而是下一個開始，期許未來的自己不再畏懼，持續往科學研究的道路前進，發現更多可能，展開人生下一段旅程！



與指導老師的合照



桃園市科展



複審前的準備

## 摘要

本研究探討 L-硒代胱氨酸(L-Selenocystine; SeC)是否能抑制肝癌細胞(HepG2)生長與毒性機制。以細胞存活率分析得知 10  $\mu$ M SeC 可抑制 HepG2 細胞生長，但對正常肝臟細胞(L-02)無明顯毒性影響。以彗星試驗發現，同樣濃度 SeC 對 HepG2 具基因毒性，會造成 DNA 損傷。再以西方墨點法得知 SeC 會使 HepG2 的抗氧化酵素表現量減少。透過同源重組活性測試證實 SeC 會抑制 HepG2 的 DNA 修復。與單獨使用臨床常用抗癌藥物 Cisplatin 比較，混合 10  $\mu$ M SeC 與較低劑量的 10  $\mu$ M Cisplatin 對 HepG2 有更明顯的毒殺效果。

10  $\mu$ M SeC 預期可用於輔助臨床抗癌藥物的療效，其抗癌細胞機制至少有兩種：一為降低抗氧化酵素表現量，導致活性氧化物質(ROS)累積，造成 DNA 損傷；二為降低 DNA 同源互換修補活性，最後造成細胞凋亡。

## 壹、研究動機

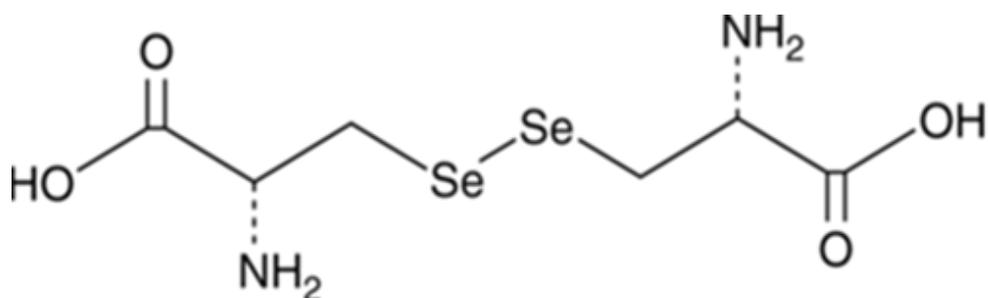
在台灣，肝癌造成的死亡人數是所有癌症的第二名，是常見的惡性腫瘤。化學治療是常見的治療肝癌方式之一，原理是利用化學藥物停止癌細胞的增生和阻斷自我修復的能力，但抗癌藥物也面臨抗藥性的問題，隨著治療時間的拉長，藥物有效的程度也日漸下降，因此我想往這方面探究，尋找是否有合適的解決方式。

目前一些癌症研究發現含硒化合物可做為化學增敏劑，增加化療藥物的效果並減少副作用的產生。含硒化合物中有一種 L-硒代胱氨酸(L-Selenocystine; SeC)是天然的含硒胺基酸，存在少數的酶之中，具有良好的抗癌特性，然而其抗癌的機制尚未清楚，所以我以 SeC 對正常肝臟細胞株(L-02)和肝癌細胞株(HepG2)進行細胞活性檢測，探討 SeC 對肝癌細胞的抑制生長效果及毒性機制。

## 貳、研究目的

### 一、研究背景

L-硒代胱氨酸(L-selenocystine; SeC)是第 21 種胺基酸—硒代半胱氨酸(selenocysteine)的一種衍生物，而硒代半胱氨酸多存在於含硒蛋白質(如穀胱甘肽過氧化物酶、四碘 5'脫碘酶、硫氧還蛋白還原酶、甲酸脫氫酶、甘氨酸還原酶)之中，其為半胱氨酸類似物。



圖一. SeC 的結構

硒(Se)是一種人體不可缺少的微量礦物質營養素，和人類及動物的代謝途徑相關，如甲狀腺激素代謝、抗氧化防禦系統和免疫功能[1]，有研究指出，一些有機硒化合物，如硒氨基酸、硒蛋白和合成有機硒化合物具有癌症的化學預防性質[2]，也有研究顯示，細胞凋亡(Apoptosis)可以作為含硒化合物抗癌作用的主要機制，抑制癌細胞的生長[3]，而且含硒化合物對人體正常細胞的細胞毒性遠低於癌細胞，因此顯示出含硒化合物在合適濃度下可以選擇性抑制或殺死癌細胞[4]。

表一. SeC 對不同細胞的毒性[4]

Growth inhibition of various selenocompounds against human cancer and normal cell lines <sup>a</sup>					
Cell lines	IC <sub>50</sub> (μM)				
	Selenocystine	SeMCys	SeMet	Selenite	Selenate
A375	3.6 ± 1.3	54.0 ± 13.2	100.8 ± 18.9	4.1 ± 1.9	109.1 ± 20.7
CNE2	5.6 ± 2.0	138.7 ± 31.4	139.6 ± 37.4	5.6 ± 2.3	539.5 ± 131.9
SW620	7.3 ± 0.8	632.8 ± 82.7	>1000	3.1 ± 0.6	>3000
MCF7	16.2 ± 5.2	193.0 ± 27.3	312.9 ± 59.7	24.8 ± 6.1	1700.9 ± 322.1
<b>HepG2</b>	<b>17.5 ± 3.3</b>	539.5 ± 61.9	140.5 ± 32.8	28.3 ± 5.7	1321.9 ± 108.6
Colo201	27.8 ± 5.6	1577.9 ± 288.4	162.8 ± 29.9	494.5 ± 80.2	1423.1 ± 211.7
HL60	34.5 ± 4.1	459.0 ± 78.5	291.5 ± 61.7	51.5 ± 9.3	2583.9 ± 478.9
MDA-MB-231	37.0 ± 7.7	255.8 ± 54.8	312.9 ± 60.3	17.9 ± 3.0	539.5 ± 119.6
<b>Hs68<sup>b</sup></b>	<b>&gt;400</b>	693.6 ± 112.4	703.4 ± 187.1	22.3 ± 6.5	>3000

<sup>a</sup> Cells were treated with different concentrations of selenocompounds for 72 h. Cell viability was determined by MTT assay and IC<sub>50</sub> values were calculated as described in Section 2. Each value represents the mean ± SD of three independent experiments.

<sup>b</sup> Human normal cells.

依表一(黃底處)，從 SeC 對人類上皮層纖維母細胞(Hs68)和肝癌細胞(HepG2)產生的毒性比較下，發現 SeC 具有良好選擇性抑制 HepG2 的效果，推測 SeC 有機會用於癌症治療。因此我想探討 SeC 對於肝癌細胞產生的選擇性生長抑制及毒性機制，希望未來可以輔助治療肝癌。

## 二、研究目的

108 年衛福部統計，肝癌占有癌症死亡率的第二名，而順鉑(Cisplatin; CDDP)是現今常見化學治療癌症的藥物，但其有多種的副作用(如: 噁心、嘔吐、神經毒性等)和抗藥性問題，所以需有一個更好的方案解決此問題。本研究在文獻閱讀後，選定 SeC 作為研究對象，探討 SeC 對肝癌細胞可能產生的損傷或死亡機制，希望對癌症研究有些許貢獻。

### (一) 研究 SeC 對 HepG2 和 L-02 細胞存活率的影響

利用細胞存活率分析(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay; MTT assay)實驗探討 SeC 是否可以選擇性抑制癌細胞生長，在正常肝細胞(L-02)無明顯毒性的前提下，找到 SeC 的最低有效濃度。

### (二) 研究 SeC 對 HepG2 和 L-02 DNA 損傷的影響

利用單細胞凝膠電泳實驗(Single Cell Gel Electrophoresis assay; SCGE assay)，以鹼性實驗(檢查 DNA 單股斷裂)和中性實驗(檢查 DNA 雙股斷裂)，檢測細胞受損程度。因 SeC 已被證實可使癌細胞產生 ROS[5]，所以進一步利用 N-Acetylcysteine(NAC)抑制 ROS 產生，再次實驗 DNA 是否斷裂，並比較 SeC 處理前後差異，探討 SeC 是否會對 HepG2 細胞的 DNA 產生氧化性損傷。

### (三) 研究 SeC 對 HepG2 抗氧化酵素表現量的影響

利用西方墨點法(Western blot)檢測 superoxide dismutase 1(SOD1)、superoxide dismutase 2(SOD2)、Catalase 抗氧化酵素的表現量，研究 SeC 是否會抑制 HepG2 抗氧化能力。

### (四) 研究 SeC 對 HepG2 在 DNA 修補能力上的影響

雙股染色體斷裂修補主要分成兩種途徑: 同源重組修補(Homologous Recombination; HR)、非同源末端連接修補(Non-homologous End Joining; NHEJ)。因此利用同源重組活性測試(Homologous Recombination assay; HR assay)檢測 SeC 是否會影響 HepG2 的 DNA 修復活性，再以西方墨點法(Western blot)檢測 NHEJ 主要上游蛋白 Ku70 的表現量，並比較差異。

### (五) 研究 SeC 是否具有輔助 Cisplatin 抗癌的效果

利用細胞存活率分析(MTT assay)實驗，探究 HepG2 經過 SeC 和低劑量 Cisplatin 的協同處理和單獨使用高劑量 Cisplatin 後，對癌細胞存活率的影響。

## 參、研究設備及器材

### 一、實驗材料

名稱	備註
L-硒代胱氨酸(SeC)	購自 ACROS Organics
HepG2(肝癌細胞株)	購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心
Hep3B(肝癌細胞株)	
L-02(正常肝臟細胞株)	
二甲基亞砷(DMSO)	購自 Sigma
低熔點瓊脂膠(LMA)	購自 Life Technologies
正常熔點瓊脂膠(NMA)	
Triton X-100	購自 J.T. baker
甲醇	購自景明化工有限公司
SYBR Green 染劑	購自 QIAGEN
ECL Kit	購自 Norgen
HR Kit	
Western Kit	購自 Bio-Rad Laboratories

名稱	備註
Lysis buffer(pH=8~10)	NaCl+Tris-HCl+EDTA+Triton-X 100+二次水
Alkaline buffer(pH>13)	EDTA+NaOH+二次水
Gold lysis buffer	Tris-HCl(pH=8)+ NaCl+ EDTA+ EGTA+ Na pyrophosphate+Triton X-100+glycerol
Sample loading buffer	Tris-HCl(pH=6.8)+ SDS+bromophenol blue+glycerol+beta-mercaptoethanol
Running buffer	Tris-HCl(pH=8.3)+Glycine+SDS
Transfer buffer	Glycine+Tris-HCl +二次水
Blocking solution	Tris base+NaCl+Tween 20+BSA
TBST	Tris(pH=7.5)+NaCl+Tween 20

名稱	名稱	名稱
磷酸鹽緩衝液(PBS)	胎牛血清	penicillin-streptomycin
DMEM 培養基	Trypsin	MTT
Cisplatin	Tris buffer	Acrylamide
Tris-HCl	Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Ammonium Persulfate(APS)
SDS	protein marker	PVDF membrane
PCRmix	引子(158+159)	DNA 模板
蒸餾水	Trypsin-EDTA	乙醯半胱氨酸(NAC)

## 二、實驗器材

名稱	備註
細胞培養箱	購自 Thermo Fisher Scientific
離心機	
無菌操作台	購自力明儀器有限公司
超音波破碎機	
光學顯微鏡	購自聖川光學儀器公司
螢光顯微鏡	
電泳槽	購自 Bio-Rad Laboratories

名稱	名稱	名稱
pipette	酒精燈	轉漬槽
離心管	培養皿	電磁加熱攪拌器
培養盤	96-well plate	吸水紙
24-well plate	ELISA reader	稱量紙
彗星試驗專用玻片	-80°C 冰箱	載玻片
4°C 冰箱	乾浴器	微波爐
微量天平	量筒	電腦
光密度計	刮杓	照膠系統
濾紙	冰塊	黑盒

## 肆、研究步驟

### 一、實驗架構圖



## 二、研究方法步驟

### (一) SeC 製備

使用 66.8 mg 的 SeC 溶於 500  $\mu$ L 的 1N NaOH 再加入 200  $\mu$ L 的 1N HCl，最後補足 1 mL 水配製成 200 mM 儲備溶液。

### (二) 細胞培養

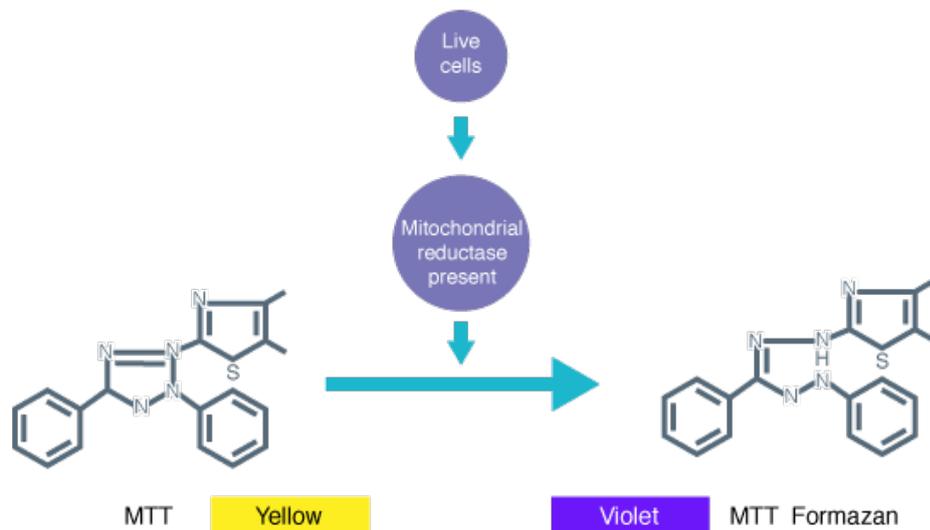
1. 從液態氮取出 L-02 和 HepG2 細胞，放入 37°C 的水浴槽回溫。
2. 將細胞培養於 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum; FBS)及 1% penicillin-streptomycin 的 DMEM 培養基中，並置於 37°C 含有 5% CO<sub>2</sub> 的恆溫培養箱中。
3. 當細胞生長達培養皿中八成滿時，進行繼代培養(subculture)。
4. 吸取培養皿上的培養液。
5. 以 5 ml 的磷酸鹽緩衝液(Phosphate Buffered; PBS)清洗兩次，去除剩餘的培養液。
6. 加入 1 ml 0.25% Trypsin-EDTA，置於 37°C 恆溫培養箱中 2 分鐘。
7. 加入含血清蛋白的培養液，抑制 Trypsin-EDTA 繼續作用。
8. 將細胞收置 15 ml 的離心管中離心 1000 rpm、5 分鐘。
9. 去掉上清液，重新加入 DMEM 培養基並將細胞混合使其均勻分散。
10. 收集細胞並分至新的培養盤，搖晃使其分布均勻，並將培養盤置於 37°C 培養箱。

### (三) 細胞存活率分析(MTT assay)

此方法為細胞活力、增殖和細胞毒性的指標。現今多應用在新藥篩選、細胞毒性試驗、細胞功能測試及篩選、訊號傳遞路徑的研究及分析。

#### 1. 原理

MTT 的全名是 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide，是一種黃色的化合物，也是常見的細胞染料。MTT 與活細胞粒線體中的琥珀酸脫氫酶(Succinate dehydrogenase; SDH)和細胞色素 C 作用，將四氫唑環(tetrazole)開裂後使外源性的 MTT 還原成非水溶性的藍紫色甲臍(Formazan)結晶，並沉積在細胞中。再藉由二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide; DMSO)有機溶劑將紫色結晶溶解，產生紫色液體，藉由 ELISA reader 測定吸光值，而吸光值代表粒線體的活性，對應活細胞數目，因此即可評估細胞活性。因死細胞無法產生琥珀酸脫氫酶，不能使 MTT 發生還原反應，故其吸光值較小。



圖二. MTT 原理圖

## 2. 步驟

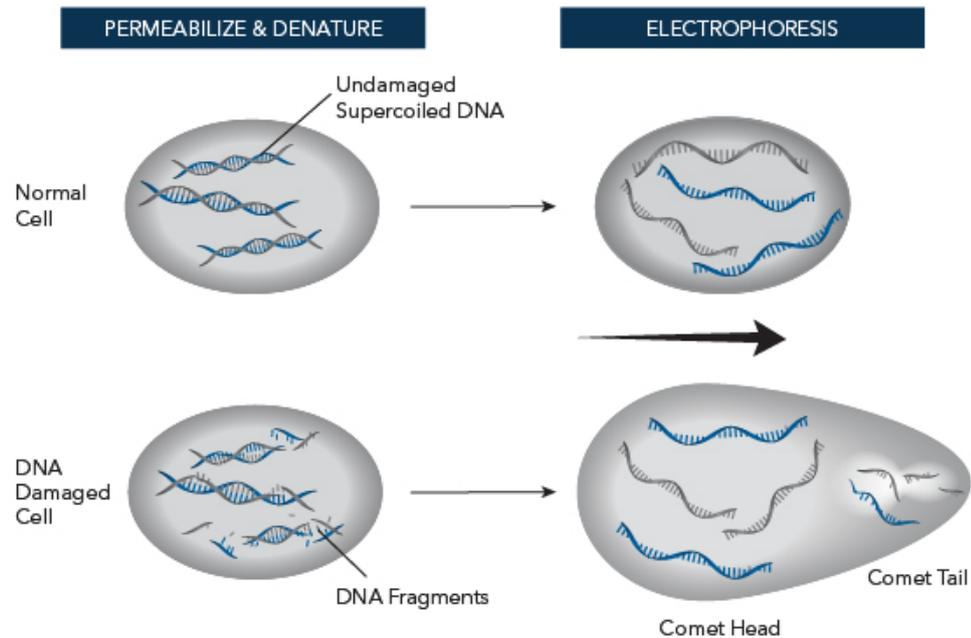
- (1) 將細胞以  $1 \times 10^4$  cells/well 的密度並以 10% 胎牛血清的培養液培養於 96-well plate 細胞培養盤 48 小時。
- (2) 根據實驗設計分別加入 0、2.5、5、10、20、40  $\mu\text{M}$  的 SeC 和 0、10、20  $\mu\text{M}$  的 Cisplatin 和 SeC 交叉比對(共 9 組)，最後加入 DMSO 分別培養 24 小時。
- (3) 以 1000 rpm 離心 10 分鐘，除去上清液並以 PBS 清洗乾淨，加入含 0.2 % MTT 50  $\mu\text{L}$  的 DMEM 培養基，放入培養箱作用約三小時後移除培養液。
- (4) 加入 100 $\mu\text{L}$  的 DMSO 使紫色結晶溶解(避光)，再以 ELISA reader 檢測波長 570 nm 之吸光值，計算細胞存活率。

## (四) 單細胞凝膠電泳實驗(SCGE assay)

又稱為彗星試驗(Comet assay)，是一種快速且高靈敏度檢測單獨細胞 DNA 受損的方法。多應用於 DNA 損傷和細胞凋亡檢測，亦可用於分析藥理毒性。

### 1. 原理

當 DNA 因不同原因產生損傷，DNA 的超螺旋結構就會變得非常鬆散，會使細胞內的 RNA、蛋白質及其它成分進入凝膠，經過電泳後，斷裂的 DNA 片段或者損傷的 DNA 就會遠離細胞核，但核 DNA 仍保持纏繞的環區附着在剩餘的核骨架(nucleoskeleton)上，並留在原位。用 DNA 螢光染料(SYBR Green)染色後，在螢光顯微鏡下就能讀出膠體上頭部和尾部螢光量，亦能看到尾部的長度。而 DNA 偏離彗星頭部的程度和損傷 DNA 的量成正比。如果細胞未受損傷，電泳中核 DNA 因分子量大而會停留在核基質中，經螢光染色後呈現圓形的螢光團，無拖尾現象。



圖三. Comet assay 電泳原理

## 2. 步驟

### (1) 收集細胞

- a 以 Trypsin 將細胞株懸浮。
- b 收下細胞後去除上清液。
- c 用 PBS 沖洗。
- d 再加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 使其分布均勻。

### (2) 製作下膠

- a 取 60  $\mu\text{L}$  (0.5 %LMA+0.5 %NMA) 混合液，放入專用玻片 (comet slide well)。
- b 蓋上蓋玻片後在下方放置冰塊使其凝固。

### (3) 10 $\mu\text{L}$ 細胞分別經 0、2.5、5、7.5、10、20 $\mu\text{M}$ 的 SeC(鹼性實驗)或 0、10、20 $\mu\text{M}$ 的 SeC 和 10 $\mu\text{M}$ NAC(中性實驗)作用後的混和液與 55 $\mu\text{L}$ LMA(上膠)混合，把玻片拿起後滴入混和溶液，等待凝固。

### (4) 將專用玻片放入黑盒後加入 Lysis buffer(淹沒玻片)，並放入 4°C 冰箱中 60 分鐘。

### (5) 將玻片取出，並用無菌二次水沖洗。

### (6) 準備電泳槽在冰盒中，並加入中性(Lysis buffer)或鹼性緩衝液(Alkaline buffer)，再把專用玻片擺放在電泳槽中電泳 30 分鐘(250 mA; 15V)。

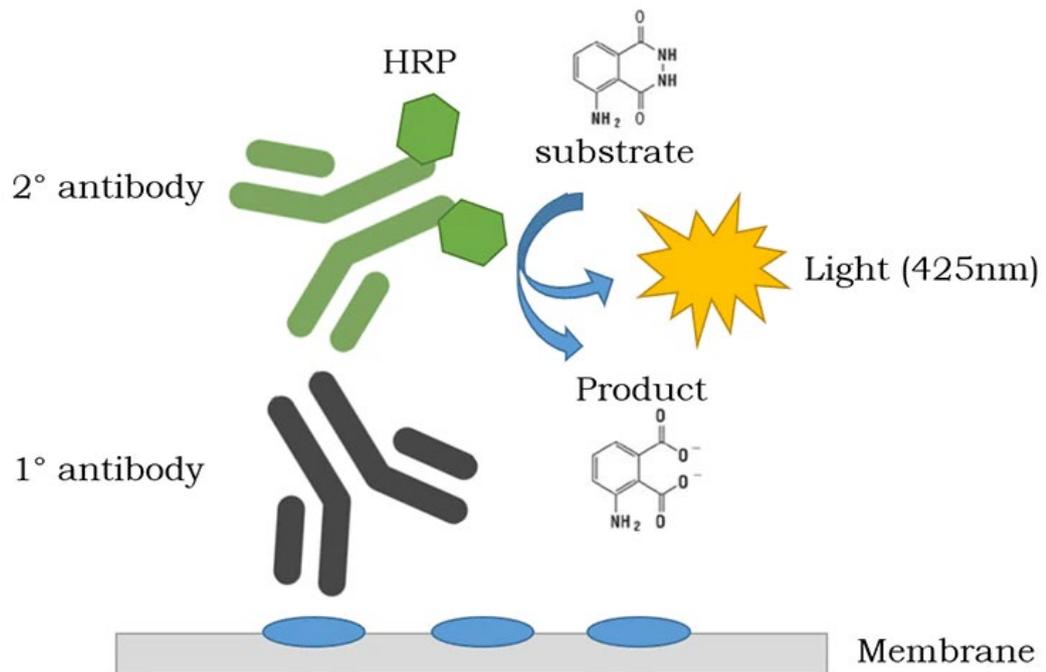
- (7) 電泳結束後要用 1ml 0.4 M Tris buffer 覆蓋住膠 5 分鐘，再用水和 PBS 沖洗，每 5 分鐘 1 次(共需 3 遍)。
- (8) 用甲醇(methanol)溶液滴到專用玻片上再用無菌二次水沖洗 1 次。
- (9) 拿出專用玻片放在吸水紙使其乾燥後，加入 SYBR Green 30  $\mu\text{L}$ ，再蓋上玻片後即可在暗房中利用螢光顯微鏡觀察 DNA 的拖尾現象。
- (10) 以 Comets score 軟體進行分析。

#### (五) 西方墨點法(Western blot)

又稱為蛋白質轉漬法、免疫墨點法(immunoblot)是分子生物學、生物化學和免疫遺傳學中常用以檢測蛋白質表現量的實驗方法。應用於檢測疾病、訊號傳遞路徑研究及分析、生物標記的發現及驗證。

##### 1. 原理

採用十二烷基硫酸鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)，而電泳是利用蛋白質和其他分子中所帶不同的電荷，影響物質在電場中的移動距離(帶電顆粒會往電極相反處移動)，而將經過 SDS-PAGE 分離的蛋白質樣品，轉漬到聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene fluoride; PVDF)膜上，再利用不同宿主所製造出的一級抗體針對特定的蛋白質做專一性結合，而帶有辣根過氧化物酶(Horse-radish peroxidase; HRP)的二級抗體，會針對其不同宿主所製造出的一級抗體再做專一性的結合，最後用化學發光(Enhanced-chemiluminescence; ECL)上的基質與 HRP 結合，會發出冷光訊號並且將其蛋白質訊號放大，再利用顯影劑維持產生的冷光訊號，經由冷光照膠系統偵測顯影，分析該蛋白質在生物體內的相對變化量。



圖四. Western blot 發光原理

## 2. 步驟

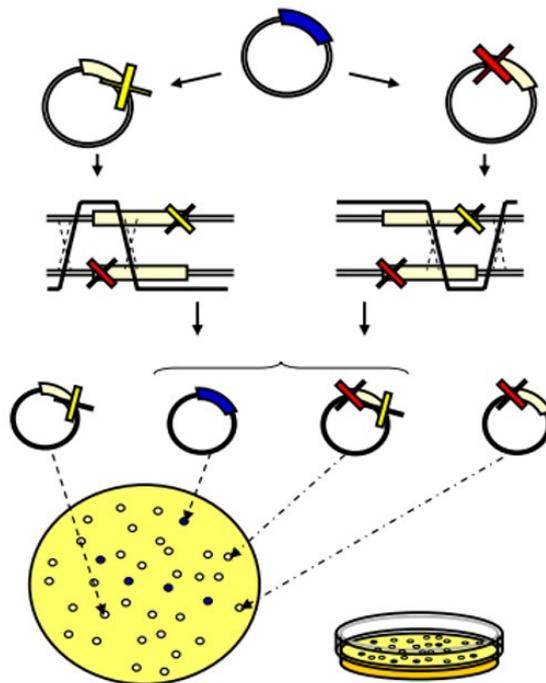
- (1) 使用 Gold lysis buffer 萃取液，加蛋白酶抑制劑和 EDTA，並利用超音波破碎機(Sonicator)(60Hz，每兩秒停一秒)，進行兩分鐘，萃取蛋白質。
- (2) 蛋白質製備
  - a 取出 50  $\mu\text{g}$  蛋白質至 0.5 ml 離心管。
  - b 加 2  $\mu\text{L}$  sample loading buffer 置於乾浴器以 100°C 加熱 10 分鐘，並冷卻。
- (3) 蛋白質電泳
  - a 下膠製備(ResolverA+ResolverB+8  $\mu\text{L}$  TEMED+80  $\mu\text{L}$  10 %APS)。
  - b 上膠製備(StackerA+StackerB+6  $\mu\text{L}$  TEMED+30  $\mu\text{L}$  10 %APS)。
  - c 將配製完成之膠體組裝於電泳槽中。
  - d 將槽內填滿 running buffer，並去除膠片底部的氣泡。
  - e 分別將 protein marker 和蛋白質樣品放至 well 中。
  - f 以 100 V 進行電泳約 2 小時。
- (4) 蛋白質轉漬
  - a 將 PVDF 膜浸泡於甲醇中活化 5 分鐘，再以蒸餾水清洗。
  - b 依序將 3 張濾紙、PVDF 膜、膠片和 3 張濾紙由下往上疊放至轉漬匣中。
  - c 放入 transfer buffer 的轉漬槽中，在 4°C 下以 250mA、80V 作用 3 小時。

- (5) 轉漬完成的 PVDF 膜浸泡在 blocking solution 中振盪 1 小時。
- (6) 去除 blocking solution，以 TBST 洗 3 次(1 次/10 分鐘)。
- (7) 去除 TBST，換成個別的一級抗體稀釋液，在 4°C 冰箱中放置 12-16 小時。
- (8) 去除一級抗體稀釋液，並以 TBST 洗 3 次(1 次/10 分鐘)，去除非特異性結合之一級抗體。
- (9) 再換成與一級抗體相對應之二級抗體稀釋液，在常溫下放置 60 分鐘。
- (10) 去除二級抗體稀釋液，並以 TBST 洗 3 次(1 次/10 分鐘)，去除非特異性結合之二級抗體。
- (11) 最後以 ECL kit 進行冷光顯影反應偵測冷光強度。
- (12) 並利用光密度計(Image J)測定顯影帶條密度，並計算蛋白質的相對表現量。

#### (六) 同源重組活性測試(HR assay)

##### 1. 原理

實驗中提供的正控制組質體(Positive Control plasmid)有完整的半乳糖苷酶序列(LacZ)，而 LacZ 序列中有產生不同位置的突變則是 dl-1 和 dl-2。若有同源雙股修復活性，則會將 dl-1 和 dl-2 進行同源互換產生不同的質體，一是質體上具有兩個突變位，二是質體上帶有完整的 LacZ 序列。而轉染、加藥完畢後，抽出質體 DNA，利用聚合酶連鎖反應(PCR)放大 LacZ 的基因片段，再利用照膠系統觀察。



圖五. HR assay 實驗套組原理

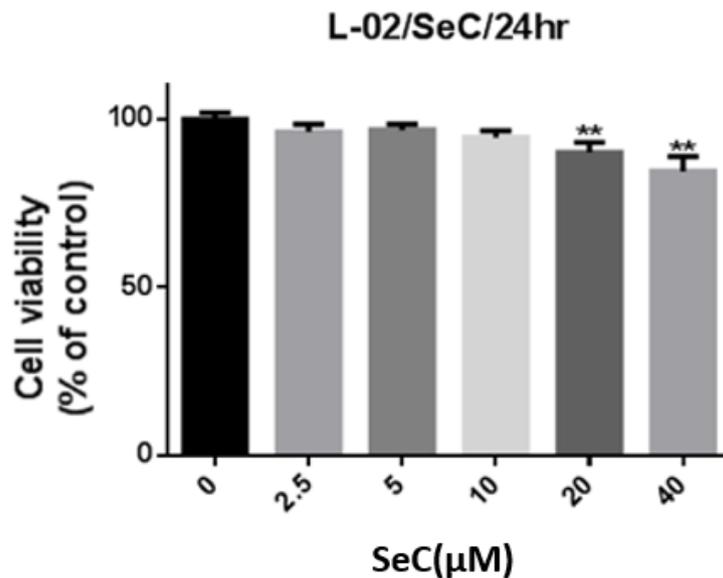
## 2. 步驟

- (1) 將細胞以  $2 \times 10^5$  cells/well，依實驗設計加入 0、2.5、5、10、20  $\mu$ M 的 SeC 並接種於 24 well-plate 後放置細胞培養箱。
- (2) 樣本組  
以 100  $\mu$ L dl-1 和 dl-2 質體以及 50  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。10  $\mu$ L 的轉染試劑和 240  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。兩者混和後再培養 30 分鐘。
- (3) 正控制組(PC)  
以 20  $\mu$ L 正控制組質體以及 30  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。2  $\mu$ L 的轉染試劑和 48  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。兩者混和後再培養 30 分鐘。
- (4) 負控制組(NC)  
以 20  $\mu$ L 的 dl-1 或 dl-2 質體以及 30  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。2  $\mu$ L 的轉染試劑和 48  $\mu$ L 培養基培養 15 分鐘。兩者混和後再培養 30 分鐘。
- (5) 轉染結束後以 PBS 清洗 2 次。
- (6) 每 well 加入 500  $\mu$ L 培養基和不同控制組混和液 50  $\mu$ L，並放置培養箱 24 小時。
- (7) 利用 HR kit 溶出 DNA。
- (8) 加入 7  $\mu$ L 無菌二次水、10  $\mu$ L PCRMix、2  $\mu$ L 引子(158+159)、1  $\mu$ L DNA 模板。
- (9) 聚合酶連鎖反應(PCR)  
95°C(3 分鐘)→ 95°C(15 秒)→ 61°C(30 秒)→ 72°C(1 分鐘)，重複 35 次，最後在 72°C 時延長至 5 分鐘。
- (10) 跑膠結束後用數位照膠系統顯影。

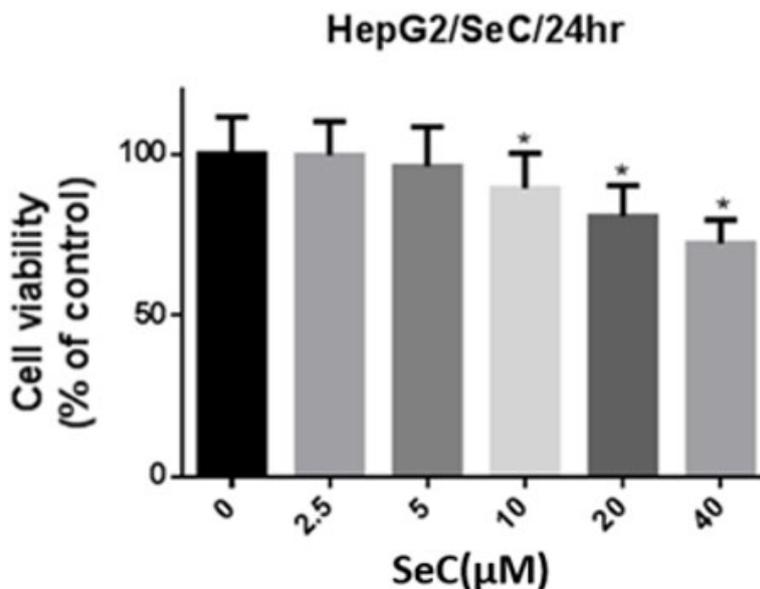
## 伍、研究結果與討論

### 一、研究 SeC 對 HepG2(肝癌細胞株)和 L-02(正常肝細胞株)細胞存活率的影響

利用細胞存活率分析(MTT assay)並分別以 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$ 、40  $\mu\text{M}$  的 SeC 分別加入 L-02 和 HepG2 作用 24 小時。從圖六、圖七可知，隨著 SeC 劑量增加，對 HepG2 和 L-02 有抑制存活的效果，而 10  $\mu\text{M}$  的 SeC 對 L-02 無顯著影響，但可顯著降低 HepG2 的細胞存活率，表示 SeC 對 HepG2 具選擇性毒殺的效果，而導致細胞存活率降低。



圖六. SeC 對 L-02 細胞存活率的影響(\*\* $p \leq 0.0001$ )

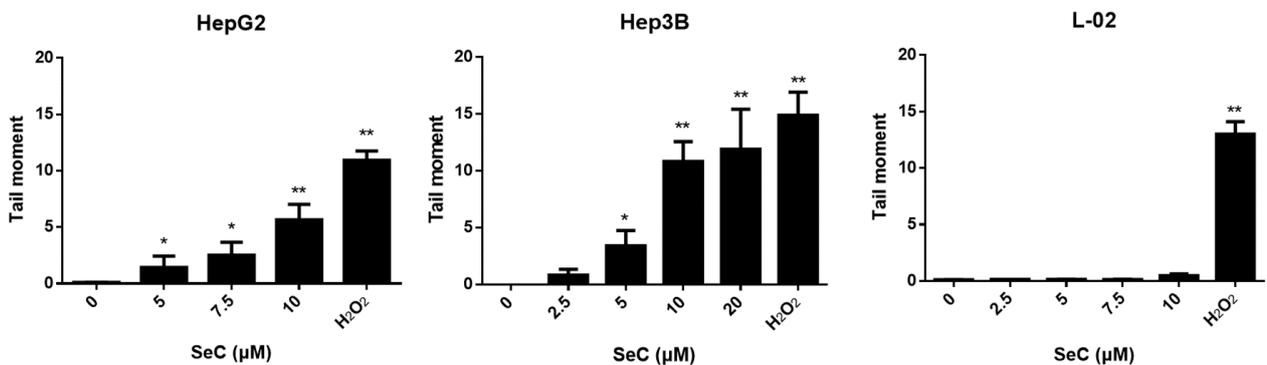


圖七. SeC 對 HepG2 細胞存活率的影響(\* $p < 0.05$ )

## 二、研究 SeC 對 HepG2 和 L-02 DNA 損傷的影響

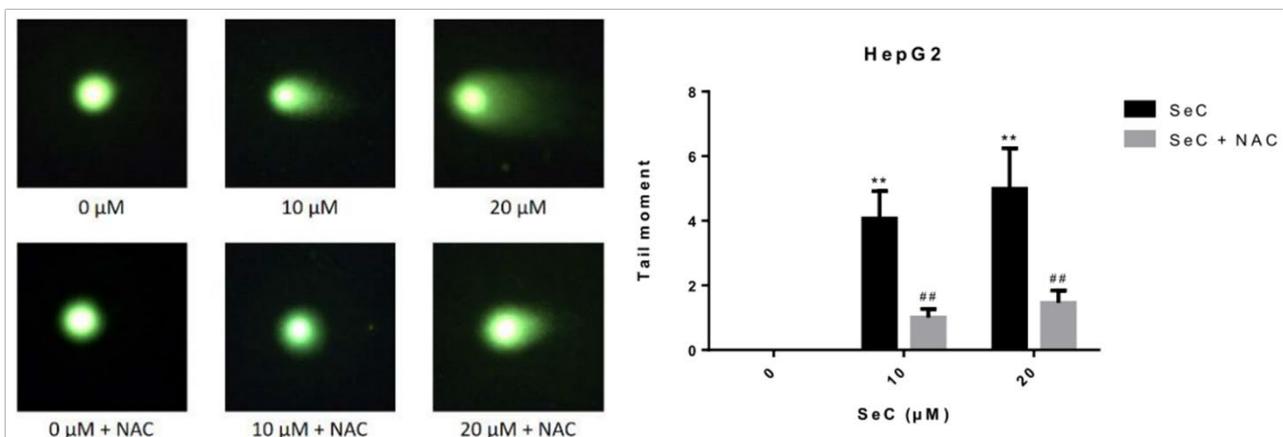
已有研究發現 SeC 會導致 ROS 和超氧陰離子的大量產生，隨後激活 DNA 損傷[5]。另外也有研究證實 ROS 的產生和 DNA 斷裂是受到 SeC 誘導而引發的細胞事件[6][7]，因此我以中性及鹼性的彗星試驗(Comet assay)對 Hep3B(無抑癌基因 p53)、HepG2(具部分抑癌基因 p53)、L-02(具完整抑癌基因 p53)測試 SeC 對 DNA 氧化性損傷程度的影響。

鹼性彗星試驗是分別加入 0 μM (控制組)、2.5 μM、5 μM、7.5 μM、10 μM 或 20 μM 的 SeC 分別作用於 Hep3B、HepG2、L-02 24 小時，並以 tail moment(尾部 DNA 佔總 DNA 的百分比和頭尾部中心間距的乘積)計算拖尾情形的差異，從圖八可看出在 10 μM 濃度以下，當 SeC 劑量增加會使 Hep3B 和 HepG2 有更顯著的 DNA 單股損傷，而 Hep3B DNA 損傷又比 HepG2 明顯，但對 L-02 卻無明顯影響。



圖八. SeC 對 HepG2、Hep3B、L-02 單股 DNA 損傷的影響(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.0001$ )

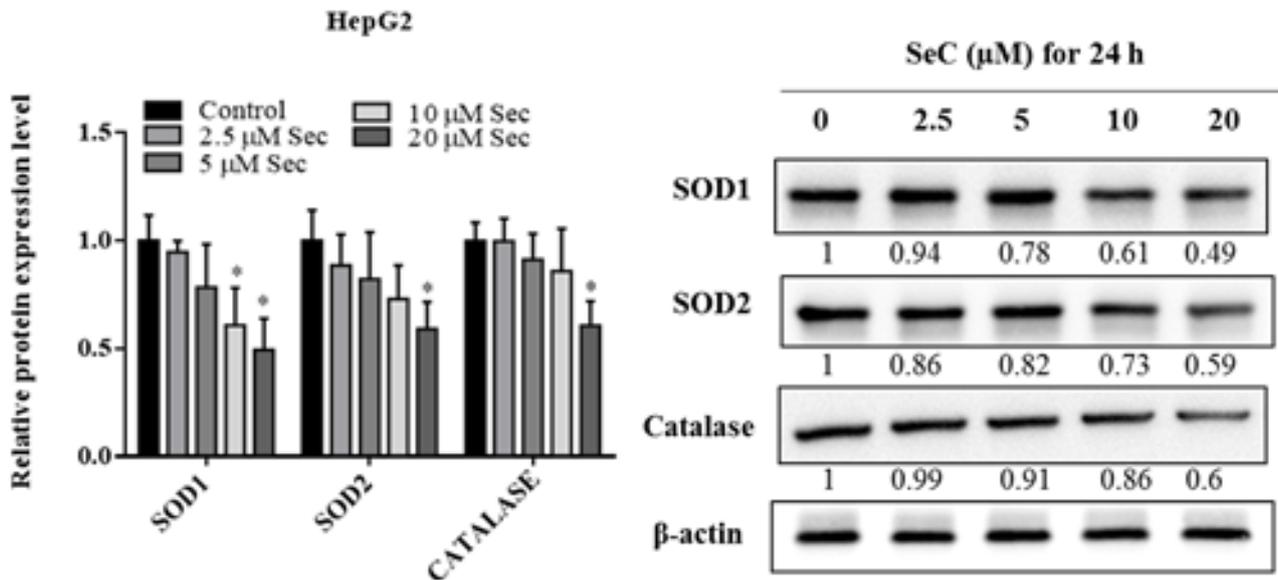
因 Hep3B 缺乏抑癌基因 p53，無 DNA 修補途徑，因此我僅用 HepG2 而不使用 Hep3B 進行中性彗星試驗。中性彗星試驗分別加入 0 μM (控制組)、10 μM、20 μM 的 SeC 作用於 HepG2 24 小時，從圖九可看出 SeC 隨劑量增加會讓 HepG2 有明顯的 DNA 雙股損傷。另外再加入 10 μM NAC 抑制 ROS 產生，發現 SeC 對 HepG2 的 DNA 雙股損傷程度減少，配合文獻與本實驗結果可推論：SeC 會透過 ROS 引發 DNA 損傷。



圖九. SeC 對 HepG2 造成雙股 DNA 損傷(\*\* $p \leq 0.0001$ ; ## $p \leq 0.0001$ )

### 三、研究 SeC 對 HepG2 抗氧化酵素表現量的影響

SeC 會透過 ROS 的累積進而導致 DNA 氧化性損傷，但不知道 SeC 是否同時也會抑制抗氧化酵素，因此我以西方墨點法檢測(Western blot)SeC 對 HepG2 中 SOD1、SOD2、Catalase 酵素蛋白表現量的差異，並以 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  進行實驗，從圖十可看出 10  $\mu\text{M}$  和 20  $\mu\text{M}$  的 SeC 會使 SOD1、SOD2、Catalase 的蛋白表現量下降，而又以 SOD1 表現量下降最為明顯，因此得知 SeC 會抑制相關抗氧化酵素的表現量，造成 ROS 累積而產生 DNA 氧化性傷害。

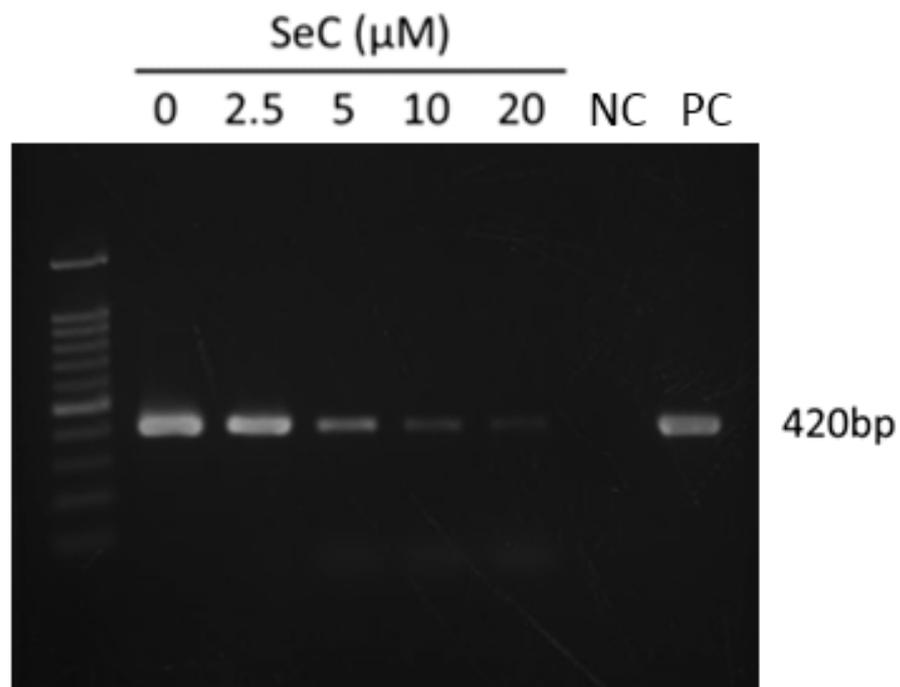


圖十. SeC 對 HepG2 的抗氧化酵素蛋白的表現量(\* $p < 0.05$ )

#### 四、研究 SeC 對 HepG2 在 DNA 修補能力上的影響

##### (一) 研究 SeC 除導致 DNA 雙股損傷，是否也會抑制 HR 修復活性

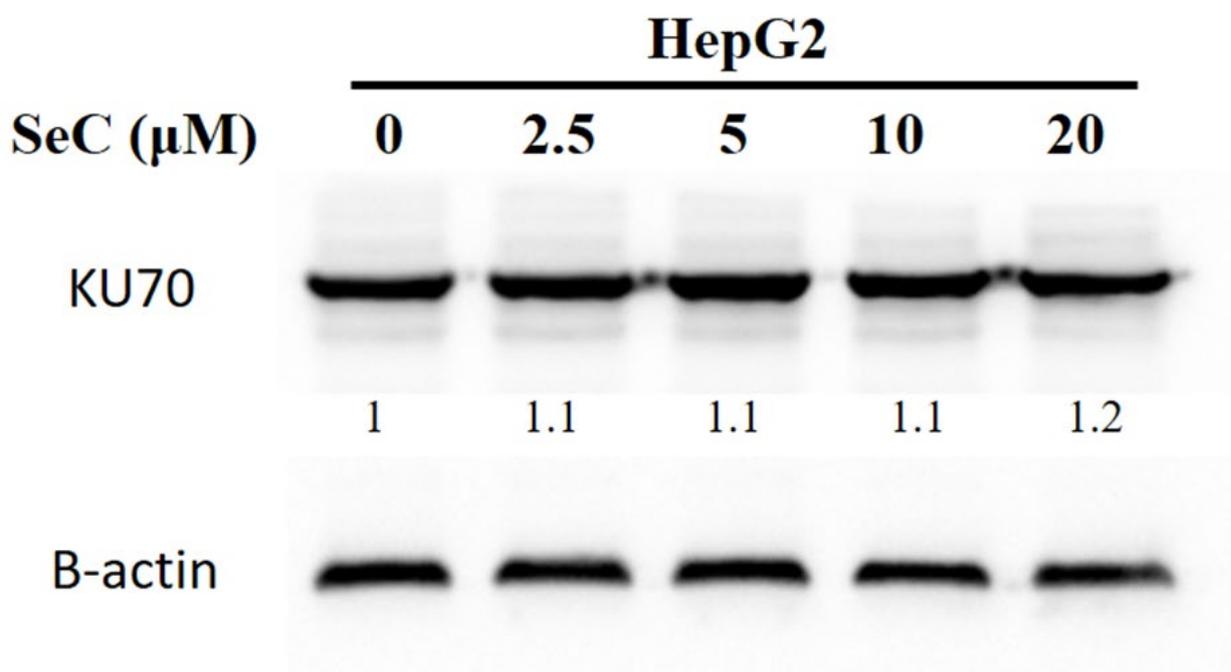
雙股修復途徑分為 HR 和 NHEJ，因此我利用同源活性重組測試(HR assay)，檢測 HepG2 分別加入 0  $\mu\text{M}$ 、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  的 SeC 後，利用照膠系統形成的 band 深淺判斷活性，而 band 越深，代表 HR 修復活性越高。從圖十一可知，隨著 SeC 濃度依序增加到 5  $\mu\text{M}$  以上時，band 呈現愈來愈淺，因此可得知 SeC 隨濃度的增加越能抑制 HepG2 HR 的修復活性。



圖十一. SeC 對 HepG2 HR 修補活性的影響

(二) 研究 SeC 除抑制 HR 修復活性是否也會抑制 NHEJ 修補蛋白的表現量

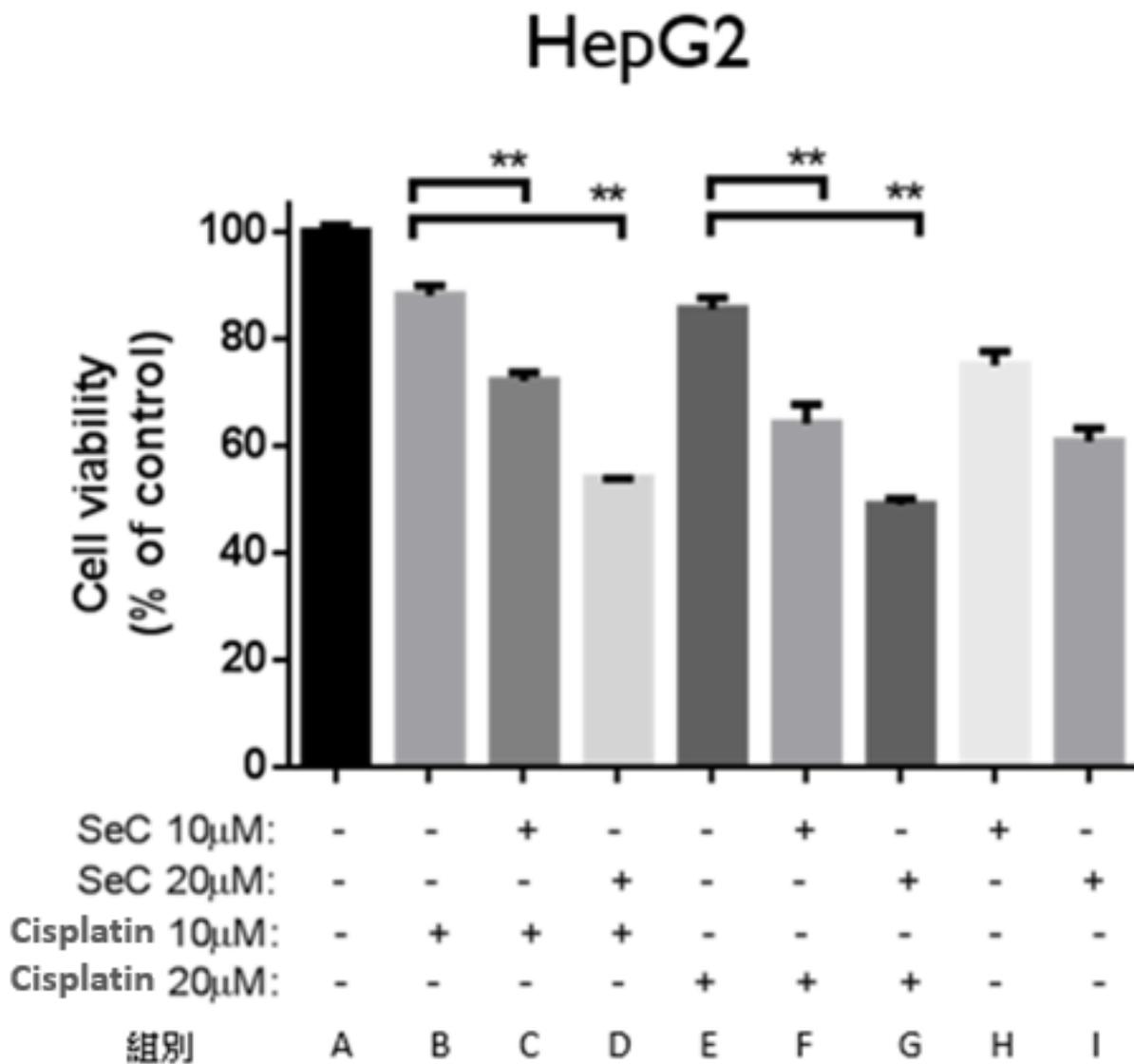
我鎖定 Ku70 蛋白做檢測，因其是 NHEJ 進行修補時最先需要用到的上游蛋白，而且因為檢測 NHEJ 修復活性的方法與 HR assay 不同，須利用病毒感染細胞才能做實驗，因此先以西方墨點法去觀察 Ku70 的表現量。我分別以 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  的 SeC 進行實驗。從圖十二得知 SeC 對 Ku70 蛋白的表現量無抑制的效果，反而蛋白表現量有些微增加。由於 NHEJ 有許多修補蛋白參與，未來我會多測試其它 NHEJ 修補蛋白的表現量，才能看出 SeC 對 NHEJ 的機制的影響。



圖十二 SeC 對 HepG2 Ku70 蛋白的表現量

五、研究 SeC 是否具有輔助 Cisplatin 抗癌的效果

我們從上述實驗發現 10  $\mu$ M SeC 對 HepG2 具有選擇性毒殺效果，此濃度 SeC 可抑制抗氧化酵素的表現量和 HR 修補活性，因此以臨床上常見的化療藥物 Cisplatin 與 SeC 結合，研究是否有輔助效果。分別以 0  $\mu$ M (控制組)、10  $\mu$ M、20  $\mu$ M 的 SeC 和 Cisplatin 做交叉比對，依圖十三，組別 B 和 C、D 比較可看出 SeC 劑量增加能使細胞存活率顯著下降，同理，組別 E 和 F、G 比較也為相同結果。而從組別 C 和 E 可發現 10  $\mu$ M 的 Cisplatin 加 10  $\mu$ M SeC 的細胞存活率又比單純加入 20  $\mu$ M 的 Cisplatin 低，由此可見 SeC 確實可以輔助癌症用藥，可降低用藥劑量，同時達到抑制 HepG2 生長的效果。



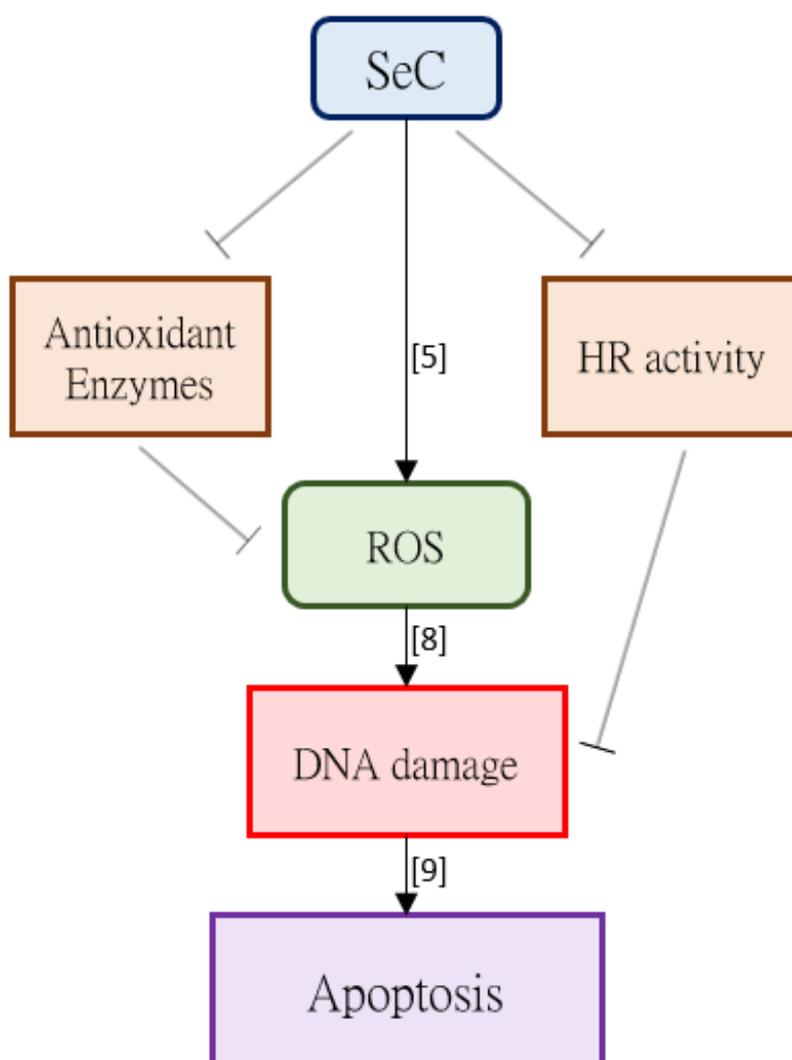
圖十三. SeC 和 Cisplatin 對 HepG2 細胞存活率的影響(\*\* $p < 0.0001$ )

## 陸、結論

由細胞存活率分析，可得知 10  $\mu$ M SeC 對 HepG2 具選擇性毒殺的效果，對 L-02 無顯著影響，因此藉由後續實驗以 10  $\mu$ M SeC 探討抑癌的機制。我認為引發 HepG2 凋亡分為兩個機制：

- 一. 已有研究證實 SeC 會誘導產生 ROS[5]，而我透過彗星試驗發現 SeC 會導致 DNA 雙股及單股的損傷，再透過西方墨點法證實 SeC 是因為會抑制抗氧化酵素蛋白的表現量，造成 ROS 的累積，進而產生氧化性傷害，降低 HepG2 細胞存活率。
- 二. 透過同源重組活性測試發現 SeC 會抑制 HR 的修補活性，降低 HepG2 的 DNA 修復能力，使得 DNA 損傷無法修復，而使細胞存活率下降。

最後，透過和 Cisplatin 的聯合使用得出 SeC 可降低 Cisplatin 的使用量，又可達到抑制癌細胞生長的效果。



圖十四. SeC 影響 HepG2 生長作用機制圖

## 柒、未來展望

- 一. 針對雙股 DNA 修復的 NHEJ 實驗中，Ku70 蛋白的表現情形與預期有落差，往後需要增加 NHEJ 修補蛋白表現量(如:Ku80、DNA-PK、LIG4)的實驗，並進一步探討其他修復因素影響 NHEJ 機制的可能性，也需做 NHEJ 活性測試檢測 NHEJ 的修復活性。
- 二. 研究細胞凋亡的相關基因表現是否會受到 SeC 的影響，驗證 SeC 對癌細胞的毒性是否確實導致細胞凋亡。
- 三. 增加其他癌症細胞株的實驗，研究是否可以得到相同的效果，期許未來可以應用在醫學治療。
- 四. 進行動物實驗，研究在生物體上 SeC 的毒性與機制，是否也可以抑制癌細胞生長。

## 捌、參考文獻資料

1. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr.* 2001 Apr;4(2B):593-9.
2. El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res.* 2004 Jul 13;551(1-2):181-97.
3. Sanmartín C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):9649-72.
4. Chen T, Wong YS. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2009 Feb;63(2):105-13.
5. Zhao M, Hou Y, Fu X, Li D, Sun J, Fu X, Wei Z. Selenocystine inhibits JEG-3 cell growth *in vitro* and *in vivo* by triggering oxidative damage-mediated S-phase arrest and apoptosis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(7):1540-1548.
6. Chen, T., Y.-S.J.T.i.j.o.b. Wong, and c. biology, Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. 2009. 41(3): p. 666-676.
7. Chen T, Wong YS. Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Sep;65(17):2763-75
8. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084.
9. De Zio D, Cianfanelli V, Cecconi F. New insights into the link between DNA damage and apoptosis.

Antioxid Redox Signal. 2013 Aug 20;19(6):559-71.

表一.

Chen T, Wong YS. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. Biomed Pharmacother. 2009 Feb;63(2):105-13.

圖一. <https://www.caymanchem.com/product/17793/l-selenocystine>

圖二. [http://www.seeingbioscience.com/tech\\_1\\_2.html](http://www.seeingbioscience.com/tech_1_2.html)

圖三. <https://www.rndsystems.com/cn/products/cometassay-assay-principle>

圖四.

<https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>

圖五. <https://norgenbiotek.com/product/homologous-recombination-assay-kit>

## 【評語】 052015

1. 此作品探討 SeC 對肝癌細胞可能產生的損傷或死亡機制，希望對癌症研究有些許貢獻。研究目的明確且聚焦。
2. 此研究內容豐富，所使用的方法大致合理可行，多數資料的數據分析有使用統計方法及顯著性檢定，以確定不同組別之間是否具顯著性差異。水準相當高。
3. 已有類似的報告顯示 Selenocystine 對肝癌細胞的影響及作用機轉，與 Cisplatin 的協同作用也有類似的文獻發表，故其新穎性略有不足。應有文獻回顧的段落，並說明此作品探討的方向與過去研究有哪些不同。
4. 建議應增加 SeC 合併 Cisplatin 化療藥物處理後，對肝癌細胞生長的抑制是否具有協同作用或加成作用。此外，作品中討論的內容可以再深入一些。
5. 簡報資料編排合理，但整體內容的字數稍嫌多了些，尤其是結果的說明，有些圖的 X 及 Y 軸字體可以再大一些。參考文獻資料的格式要統一。

## 作品簡報



---

# SeC輔助抗癌藥物 對肝癌療效與其機制探討

---

高級中等學校組  
動物與醫學學科

# 研究動機

1. 108年衛福部統計，肝癌占所有癌症死亡率的第二名
2. 抗癌藥物面臨抗藥性的問題，隨著治療時間的增長，藥物效果漸減
3. 已有研究發現含硒化合物對人體正常細胞的毒性遠低於癌細胞[1]。也有研究顯示，細胞凋亡(Apoptosis)可以作為含硒化合物抗癌作用的主要機制，抑制癌細胞的生長[2]

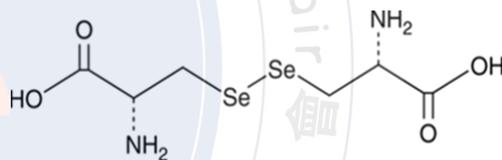


表1、SeC對不同細胞的毒性[1]

Growth inhibition of various selenocompounds against human cancer and normal cell lines <sup>a</sup>					
Cell lines	IC <sub>50</sub> (μM)				
	Selenocystine	SeMCys	SeMet	Selenite	Selenate
A375	3.6 ± 1.3	54.0 ± 13.2	100.8 ± 18.9	4.1 ± 1.9	109.1 ± 20.7
CNE2	5.6 ± 2.0	138.7 ± 31.4	139.6 ± 37.4	5.6 ± 2.3	539.5 ± 131.9
SW620	7.3 ± 0.8	632.8 ± 82.7	>1000	3.1 ± 0.6	>3000
MCF7	16.2 ± 5.2	193.0 ± 27.3	312.9 ± 59.7	24.8 ± 6.1	1700.9 ± 322.1
HepG2	17.5 ± 3.3	539.5 ± 61.9	140.5 ± 32.8	28.3 ± 5.7	1321.9 ± 108.6
Colo201	27.8 ± 5.6	1577.9 ± 288.4	162.8 ± 29.9	494.5 ± 80.2	1423.1 ± 211.7
HL60	34.5 ± 4.1	459.0 ± 78.5	291.5 ± 61.7	51.5 ± 9.3	2583.9 ± 478.9
MDA-MB-231	37.0 ± 7.7	255.8 ± 54.8	312.9 ± 60.3	17.9 ± 3.0	539.5 ± 119.6
Hs68 <sup>b</sup>	>400	693.6 ± 112.4	703.4 ± 187.1	22.3 ± 6.5	>3000

<sup>a</sup> Cells were treated with different concentrations of selenocompounds for 72 h. Cell viability was determined by MTT assay and IC<sub>50</sub> values were calculated as described in Section 2. Each value represents the mean ± SD of three independent experiments.

<sup>b</sup> Human normal cells.

# 研究方法

\* HepG2: 人類肝癌細胞株

驗證SeC對HepG2的生長是否有選擇性毒殺的效果

MTT assay  
檢測細胞的存活率

研究SeC是否提高HepG2的DNA損傷程度

Comet assay  
檢測DNA受損程度

檢測SeC是否影響抗氧化酶的蛋白質表現量

Western blot  
檢測酵素蛋白的表現量

探討SeC的選擇性毒殺是否和細胞DNA修復機制有關

HR assay和Western blot  
檢測DNA修補能力

探討SeC能否輔助Cisplatin抑制HepG2生長

MTT assay  
檢測細胞的存活率

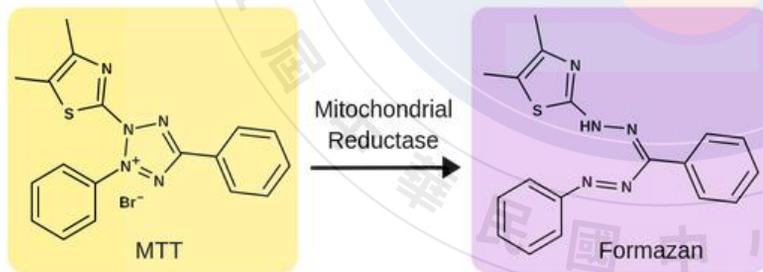
# 研究結果

## 一、研究SeC是否可選擇性抑制HepG2生長

細胞存活率分析(MTT assay)檢測L-02和HepG2的細胞活性

20 $\mu$ M、40 $\mu$ M的SeC對HepG2和L-02都有抑制存活的效果，而10 $\mu$ M的SeC對L-02無顯著影響，而可選擇性毒殺HepG2，降低細胞存活率。

- \* HepG2: 人類肝癌細胞株
- \* L-02: 人類正常肝細胞株



(圖片來源:Labster Theory)

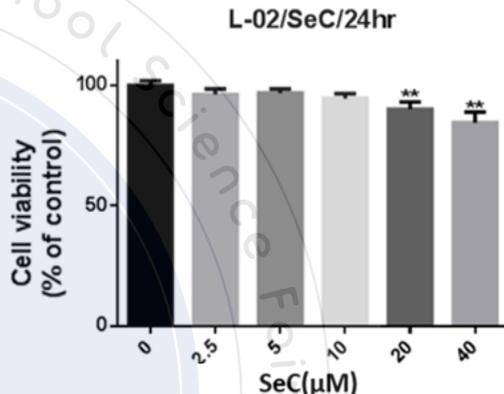


圖1、SeC對L-02細胞活性的影響

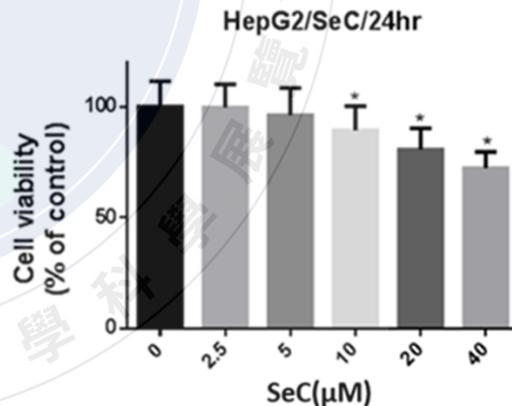


圖2、SeC對HepG2細胞活性的影響

## 二、研究SeC對HepG2 DNA損傷的影響

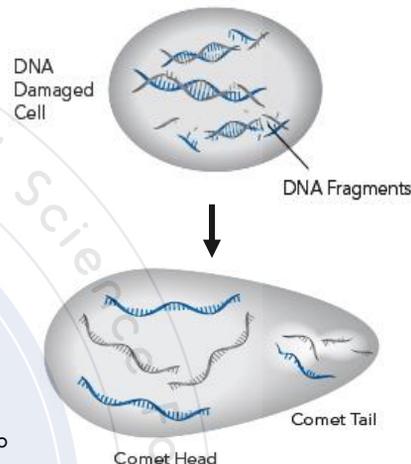
### (一)鹼性彗星試驗(Comet assay)檢測L-02

#### 、HepG2和Hep3B單股DNA損傷程度

研究發現SeC會導致ROS和超氧陰離子產生 [3]。5 $\mu$ M以上的SeC處理HepG2和Hep3B後，就會造成顯著的DNA損傷，其中又以Hep3B最為嚴重，反觀10 $\mu$ M的SeC對L-02無明顯影響。

\* HepG2、Hep3B:人類肝癌細胞株

\* L-02:人類正常肝細胞株



(圖片來源:R&D Systems)

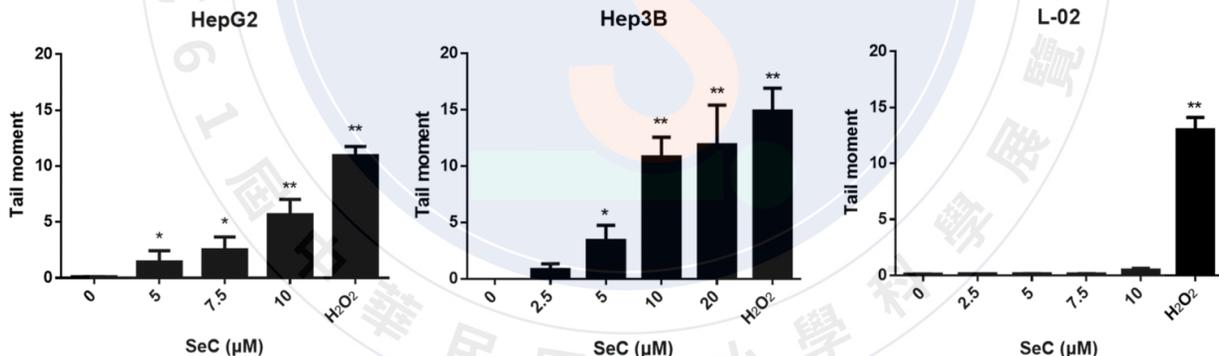


圖3、HepG2、Hep3B和L-02經SeC作用後單股DNA損傷的拖尾程度對HepG2細胞活性的影響

## (二)中性彗星試驗(Comet assay)檢測HepG2雙股DNA損傷程度

在 $10\mu\text{M}$ 和 $20\mu\text{M}$ 的SeC作用下時，會造成HepG2明顯的雙股DNA損傷，產生細胞拖尾情形。證實SeC不但會造成單股DNA損傷，也能引發較為嚴重的雙股DNA斷裂。而進一步加入 $10\mu\text{M}$  NAC抑制ROS產生，則可減輕DNA損傷程度，配合文獻[3]與本實驗結果可推論:SeC藉由誘導ROS，造成DNA氧化性傷害。

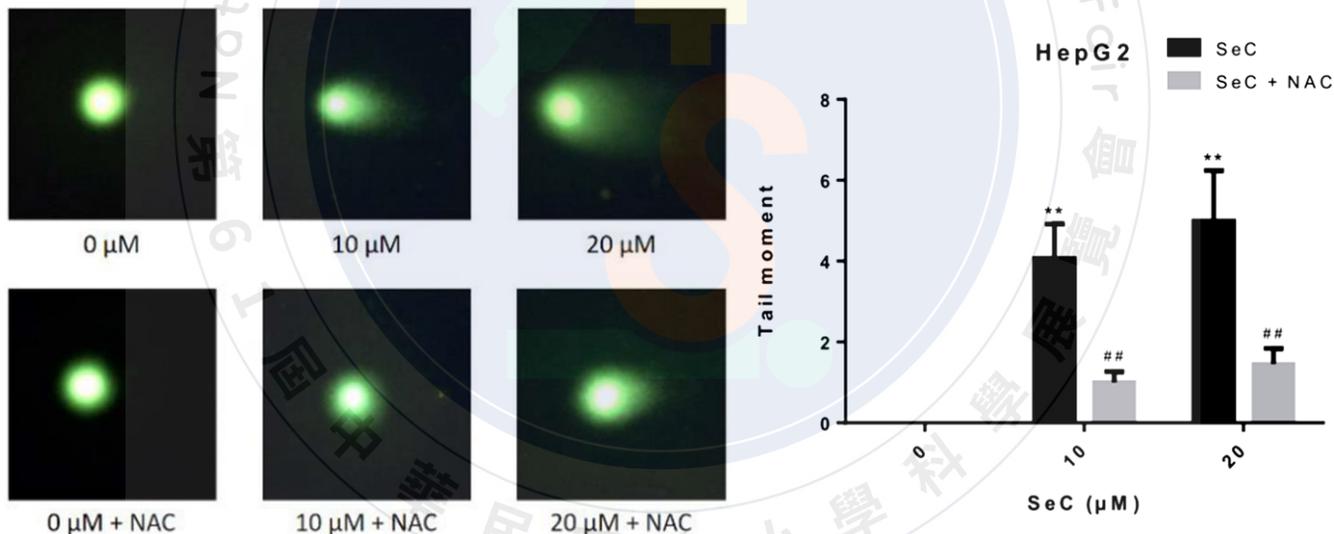


圖4、HepG2經SeC和NAC作用後雙股DNA損傷的拖尾程度

### 三、研究SeC對HepG2抗氧化酵素表現量的影響

西方墨點法(Western blot)檢測SOD1、SOD2和Catalase蛋白質表現量

SeC達 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ ，三種蛋白質的表現量逐漸下降，在 $10\mu\text{M}$ 的SeC作用下，可對SOD1蛋白質造成明顯的影響，推論SeC會利用抑制抗氧化酵素蛋白的表現量，導致ROS累積而產生DNA損傷。

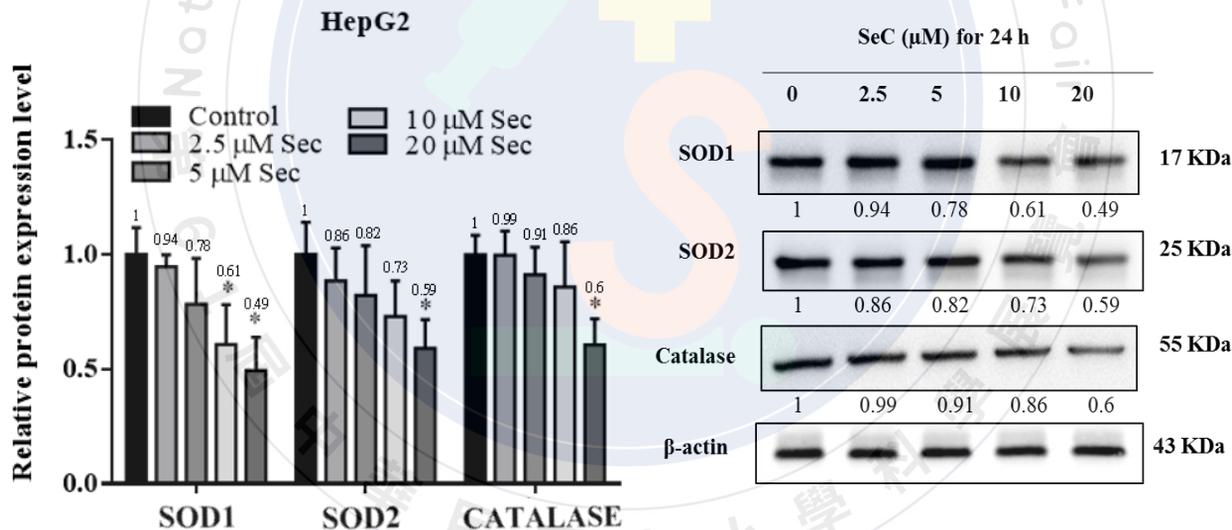
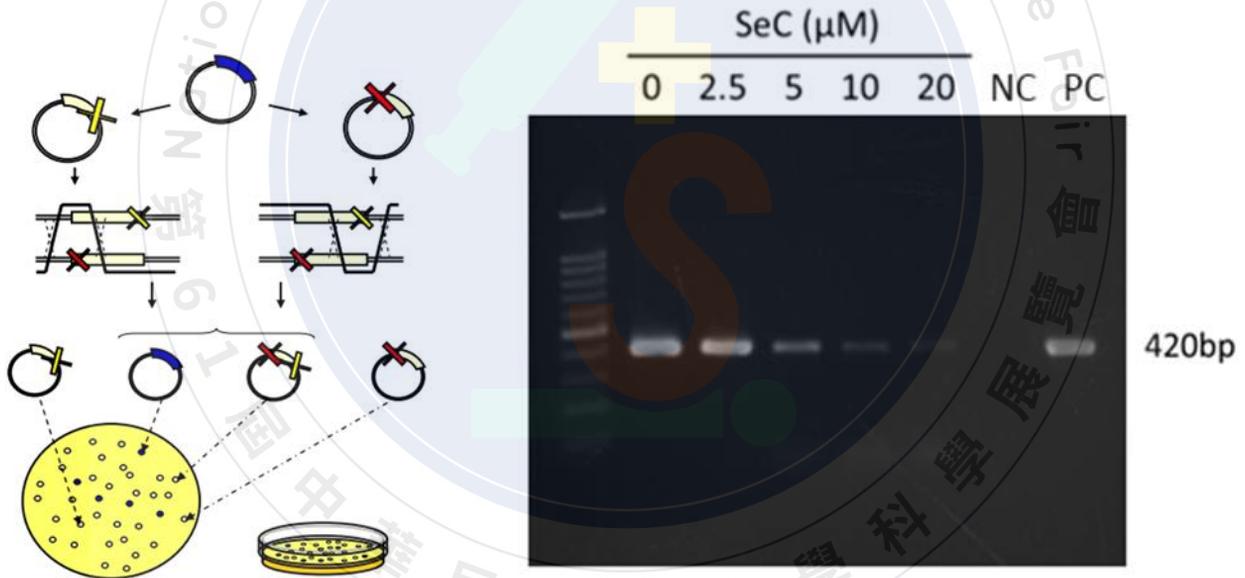


圖5、SOD1、SOD2和Catalase經SeC作用後的蛋白質表現量

## 四、研究HepG2經雙股斷裂後DNA修補能力

### (一)同源活性重組測試(HR assay)探討HepG2的HR修復活性

經 $20\mu\text{M}$  SeC作用的HepG2同源重組活性最小，而當SeC劑量達 $5\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ 時，HR的修復活性就有明顯下降，因此可推測隨SeC濃度增加越能有效抑制HepG2的HR活性。



(圖片來源:Norgen Biotek Crop)

圖6、SeC對HR修復活性的電泳圖

## (二)以西方墨點法(Western blot)探討NHEJ上游修復蛋白的表現量

Ku70是NHEJ其中一種修復蛋白。隨著SeC劑量在 $10\mu\text{M}$ 以上，反而些微增加Ku70的表現量，但由於NHEJ具有多種修復蛋白，未來將檢測不同的蛋白質和NHEJ的修復活性，才能更了解NHEJ與SeC的關聯性。

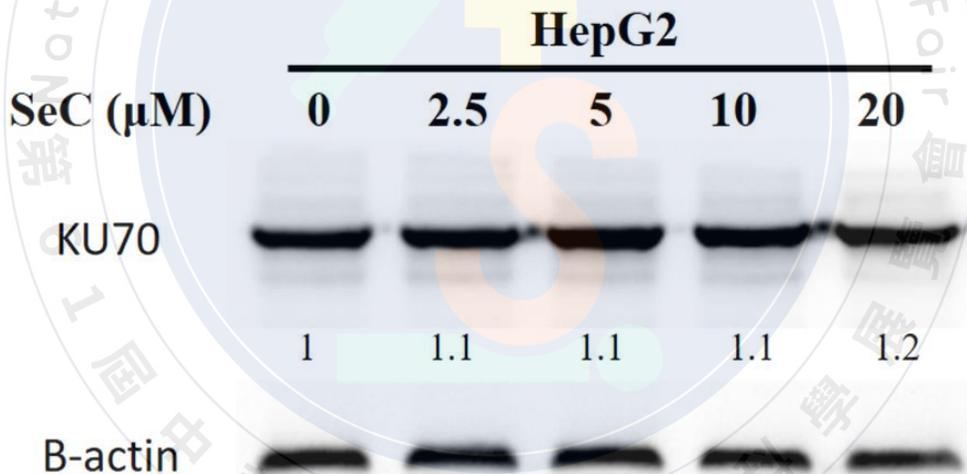


圖7、SeC對Ku70蛋白表現量的影響

## 五、研究SeC能否輔助Cisplatin用藥

細胞存活率分析(MTT assay)檢測HepG2經SeC和Cisplatin作用後的細胞活性

1. 從組別B和C、D比較可看出加入SeC能降低細胞存活率，而且劑量越大下降幅度也越大。

↑(組別E和F、G可得相同結果)

2. 從組別C和E可發現10 $\mu$ M Cisplatin + 10 $\mu$ M SeC的細胞存活率比20 $\mu$ M Cisplatin低。

由此可見SeC確實可以減少抗癌藥物Cisplatin的使用量，達到抑制癌細胞的目的。

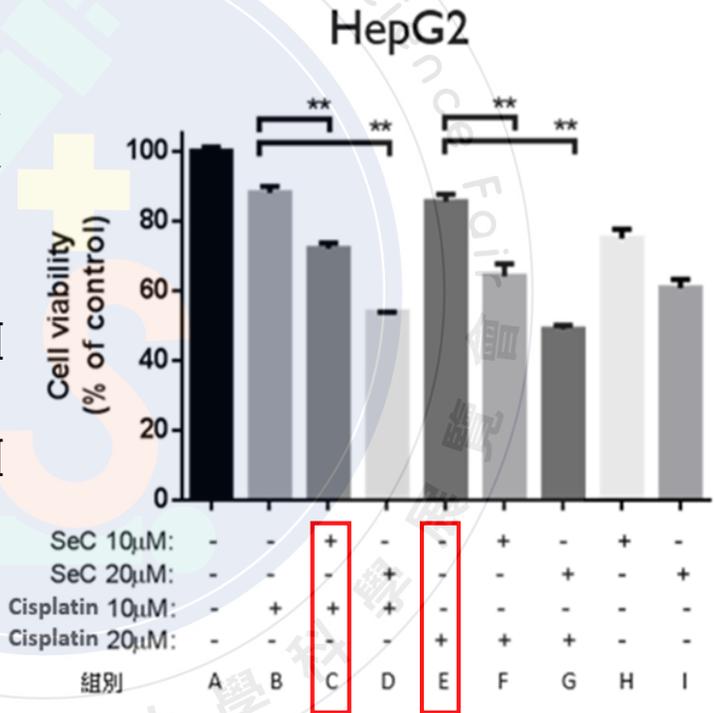


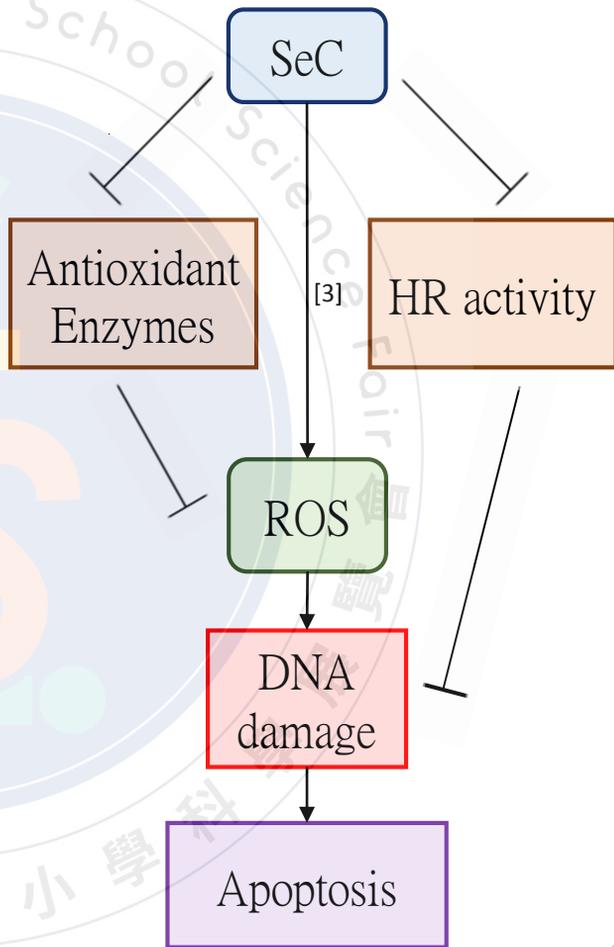
圖8、SeC和Cisplatin對HepG2細胞存活率的影響

# 結論

一. 研究證實 SeC 會誘導 ROS 產生 [3]。透過 Comet assay 發現 SeC 會導致 DNA 雙股及單股的損傷，再透過 Western blot 證實 SeC 會抑制抗氧化酵素的表現量，進而產生氧化性傷害，而使 HepG2 凋亡。

二. 透過 HR assay 發現 SeC 會抑制 HR 的修補活性，降低 HepG2 自我修復的能力，造成 HepG2 凋亡。

透過和 Cisplatin 的聯合使用得出 SeC 可降低 Cisplatin 使用量，並且達到抑制癌細胞生長的效果。



# 未來展望

- 一. 往後需要增加NHEJ修補蛋白表現量(如:Ku80、DNA-PK、LIG4)的實驗，並進一步探討其他修復因素影響NHEJ機制的可能性，也需做NHEJ活性測試檢測NHEJ的修復活性。
- 二. 增加不同癌症細胞株的實驗，研究是否可以得到相同的效果，促使未來可以應用在更多癌症的醫學研究上。
- 三. 進行動物實驗，研究在生物體上SeC的毒性與機制，是否也可以抑制癌細胞生長。

## 參考資料

1. Chen T, Wong YS. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2009 Feb;63(2):105-13.
2. Sanmartin C, Plano D, Sharma AK, Palop JA. Selenium compounds, apoptosis and other types of cell death: an overview for cancer therapy. *Int J Mol Sci.* 2012;13(8):9649-72.
3. Zhao M, Hou Y, Fu X, Li D, Sun J, Fu X, Wei Z. Selenocystine inhibits JEG-3 cell growth in vitro and in vivo by triggering oxidative damage-mediated S-phase arrest and apoptosis. *J Cancer Res Ther.* 2018;14(7):1540-1548.