

# 2022 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 SeC 輔助抗癌藥物對肝癌療效與其機制探討

得獎獎項

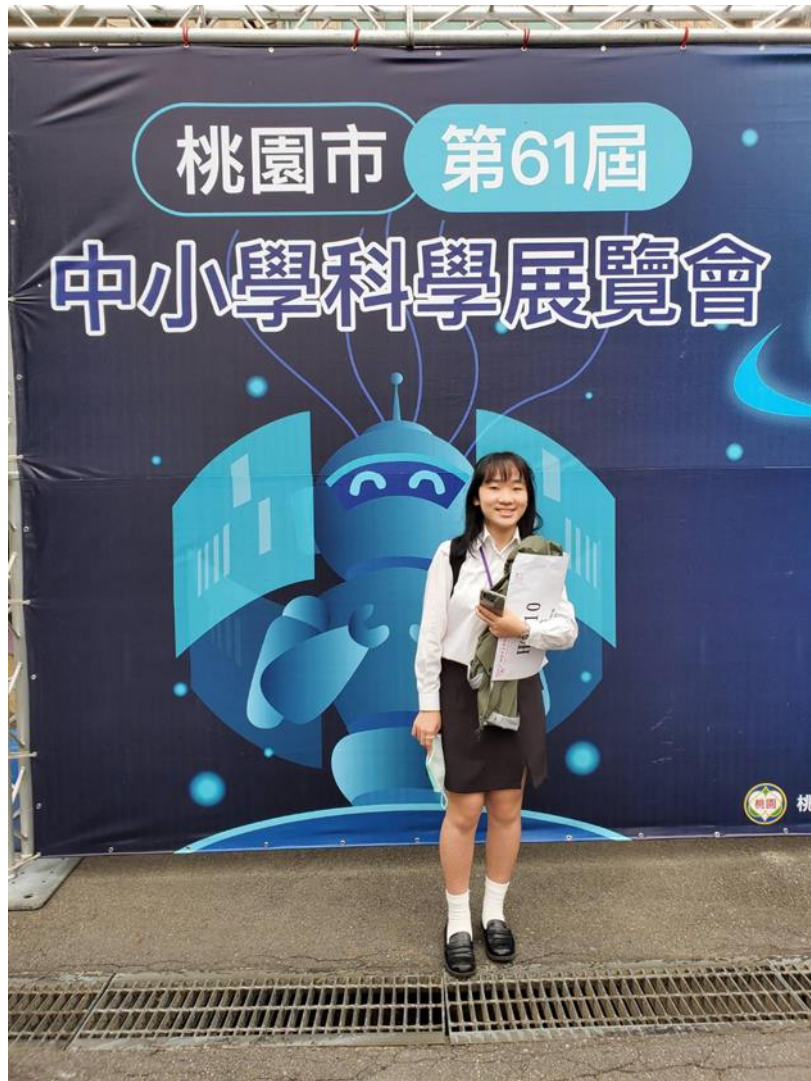
就讀學校 復旦學校財團法人桃園市復旦高級中等學校

指導教師 莊桂琴

作者姓名 陳芯儀

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

## 作者簡介



我是陳芯儀，目前就讀桃園市私立復旦高中。繼全國科展獲獎後決定繼續參賽 2022 的國際科展，比賽過程帶給我絕然不同的經驗，也讓我成長許多，期待能在國際科展遇到其他優秀的參賽同學和作品。我也希望藉由我對肝癌的研究，能進一步用於未來的藥物開發，增進台灣醫療品質。

## 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。

## Abstract

This study investigated whether L-Selenocystine (SeC) can inhibit the growth of liver cancer cell (HepG2) and related toxicity mechanism. According to cell viability analysis, 10  $\mu$ M SeC can inhibit the growth of HepG2 cell, but not normal liver cell (L-02). The Comet assay found that the same concentration of SeC is genotoxic to HepG2 and can cause DNA damage. By the Western blot method, it was known that SeC inhibits the expression of antioxidant enzymes in HepG2 cell. The Homologous recombination activity test further found that SeC blocks the DNA repair in HepG2. Compared with Cisplatin alone, combination of 10  $\mu$ M SeC and a lower dose of 10  $\mu$ M Cisplatin shows stronger cell toxicity to HepG2.

Thus, 10  $\mu$ M SeC may be used in combination with current anti-cancer drugs to provide better efficacy. There are two possible anti-cancer mechanisms: one is to reduce the expression of antioxidant enzymes then lead to the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage; the other is to impede the DNA homologous exchange repair activity and cause cancer cell apoptosis.

# 一、前言

## (一) 文獻探討

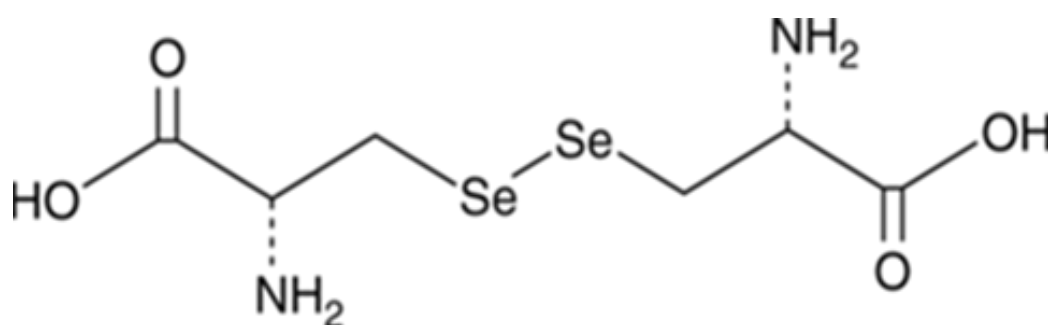
### 1. 含硒化合物與癌症

目前已經有報導硒用於體外及動物生長的抑制和抗腫瘤作用，有研究給患有艾氏腹水腫瘤的小鼠服用硒後，可有效抑制腫瘤的生長[1]，亦有其他研究中，以亞硒酸鹽及配合標準細胞療法可增加非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin Lymphoma)細胞的凋亡，並可達到減少治療患者產生的副作用，而亞硒酸鈉以劑量和持續時間給藥在誘導細胞凋亡方面對化療具有協同作用，因此可以改善臨床結果[2]。

### 2. L-硒代胱氨酸(L-selenocystine; SeC)

#### (1) 簡介

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[3]，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[4]，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[5]，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[6]。

表一. SeC 對不同細胞的毒性[6]

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。

(2) SeC 與活性氧化物質(Reactive oxygen species, ROS)

ROS 是人體內進行氧化代謝的過程中，所產生的高度活性物質，是指獨立存在並具有一個以上不成對電子的離子、原子或分子，其中包括超氧陰離子，過氧化物和羥基自由基。

已有研究發現 SeC 會誘導 ROS 和超氧陰離子的大量產生，隨後激活 DNA 損傷引發細胞週期停止和細胞凋亡，可抑制人類絨毛膜癌細胞(JEG-3)生長[7]。另外也有研究證實 SeC 對乳癌細胞(MCF-7)和人類黑色素瘤(A375)的抑制效果，也被證實和 ROS 的產生引發氧化壓力有關[8][9]。

(3) SeC 與抗癌藥物-阿霉素(Doxorubicin, DOX)

研究證實，使用 SeC 可使 HepG2 人肝細胞癌(HCC)細胞對 DOX 敏感，並在體內外實現抗癌協同作用。SeC 通過啟動細胞凋亡和細胞週期停滯降低肝癌細胞的活力，結果顯示聯合使用 SeC 和 DOX 的方法可能是實現針對 HCC 的抗癌協同作用的高效方法，藉由體內誘導細胞凋亡的聯合治療，能使異種移植肝細胞癌的生長得到有效

的抑制[10]。

而本實驗設計以 Cisplatin 這種抗癌藥物作為對照組，測試 SeC 是否與 Cisplatin 有協同抗癌的效果，並從 DNA 修補方面探討 SeC 是否會在 DNA 損傷後也有抑制 HepG2 DNA 修補活性的效果，進而達成細胞凋亡。

## (二) 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)是天然的含硒氨基酸，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。

### (三) 研究目的

108 年衛福部統計，肝癌占所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。

#### 1. 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。

#### 2. 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。

#### 3. 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。

#### 4. 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。

#### 5. 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。

## 二、研究方法或過程

### (一) 研究設備及器材

#### 1. 細胞株

HepG2(肝癌細胞株)、Hep3B(肝癌細胞株)、L-02(正常肝臟細胞株)

#### 2. 藥品及試劑

二甲基亞砒(DMSO)、低熔點瓊脂膠(LMA)、正常熔點瓊脂膠(NMA)、Triton X-100、甲醇、SYBR Green 染劑、ECL Kit、HR Kit、Western Kit、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、Trypsin-EDTA、乙醯半胱氨酸(NAC)

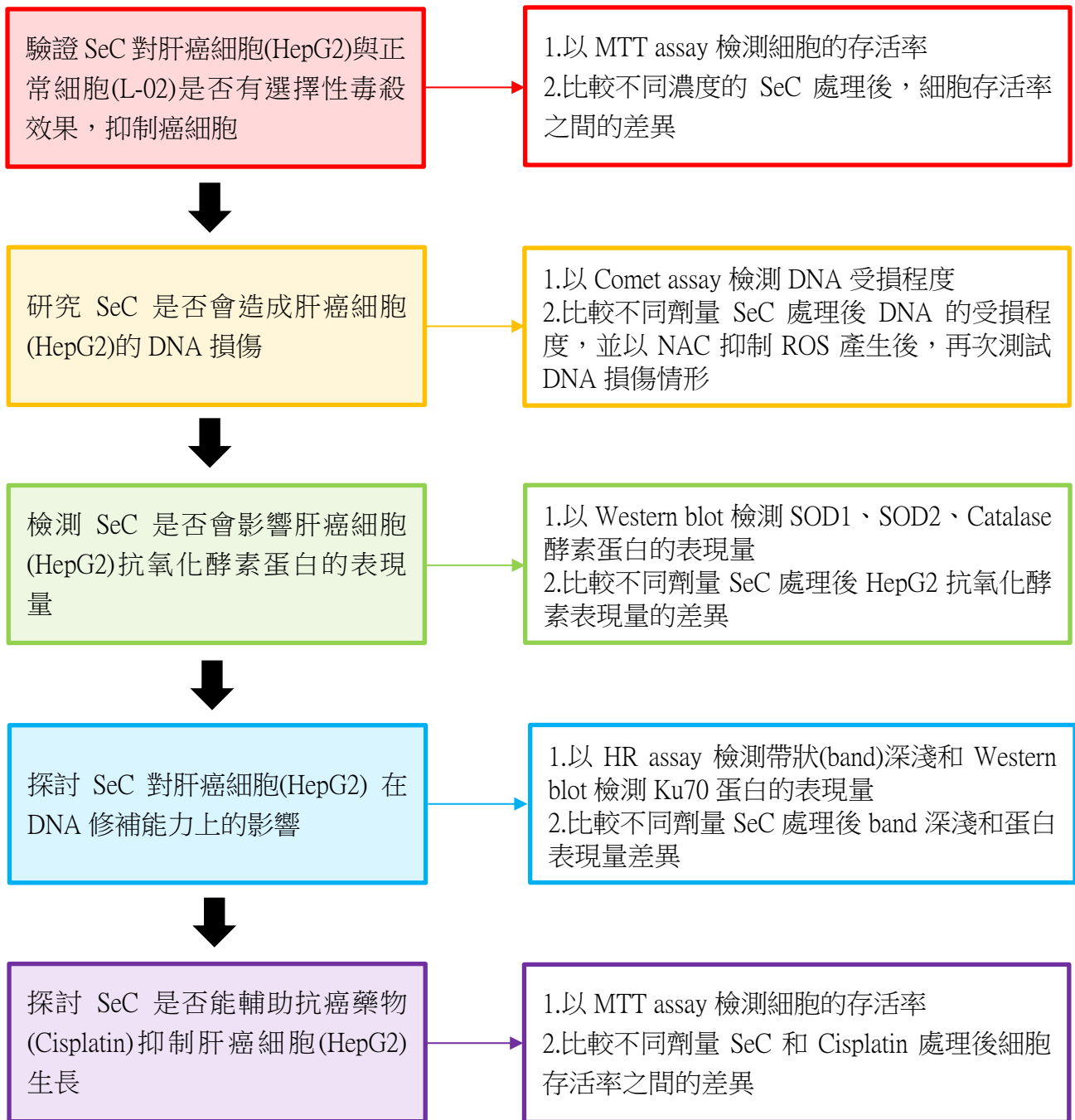
藥品名稱	備註
Lysis buffer(pH=8~10)	NaCl+Tris-HCl+EDTA+Triton-X 100+二次水
Alkaline buffer(pH>13)	EDTA+NaOH+二次水
Gold lysis buffer	Tris-HCl(pH=8)+ NaCl+ EDTA+ EGTA+ Na pyrophosphate+Triton X-100+glycerol
Sample loading buffer	Tris-HCl(pH=6.8)+ SDS+bromophenol blue+glycerol+beta-mercaptoethanol
Running buffer	Tris-HCl(pH=8.3)+Glycine+SDS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

#### 3. 實驗器材

細胞培養箱、離心機、無菌操作台、超音波破碎機、光學顯微鏡、螢光顯微鏡、電泳槽、pipette、轉漬槽、離心管、培養皿、電磁加熱攪拌器、培養盤、96-well plate、24-well plate、ELISA reader、稱量紙、彗星試驗專用玻片、乾浴器、微量天平、量筒、光密度計、刮杓、照膠系統、黑盒



## (二) 研究架構圖



## (三) 實驗方法

### 1. 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。

## 2. 細胞培養和繼代

從液態氮取出 L-02 和 HepG2 細胞，放入 37°C 的水浴槽回溫，並將細胞培養於 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。當細胞生長達培養皿中八成滿時，進行繼代培養(subculture)，首先吸取培養皿上的培養液，再以 5 ml 的磷酸鹽緩衝液(Phosphate Buffered; PBS)清洗兩次，去除剩餘的培養液，之後加入 1 ml 0.25% Trypsin-EDTA，置於 37°C 恆溫培養箱中 2 分鐘。結束後加入含血清蛋白的培養液，抑制 Trypsin-EDTA 繼續作用，並將細胞收置 15 ml 的離心管中離心 1000 rpm、5 分鐘之後，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，最後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。

## 3. 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。

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。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，再以 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，最後加入 100  $\mu\text{L}$  的 DMSO 使紫色結晶溶解(避光)，即可利用 ELISA reader 檢測波長 570 nm 之吸光值，計算細胞存活率。

## 4. 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。

先收集細胞，以 Trypsin 將細胞株懸浮，收下細胞後去除上清液，並用 PBS 沖洗，再加入 300  $\mu\text{L}$  PBS 使其分布均勻。接著製作下膠，取 60  $\mu\text{L}$  (0.5% LMA+0.5% NMA) 混合液，

放入專用玻片(comet slide well)，蓋上蓋玻片後在下方放置冰塊使其凝固。將 10  $\mu$ L 細胞分別經 0、2.5、5、7.5、10、20  $\mu$ M 的 SeC(鹼性實驗)或 0、10、20  $\mu$ M 的 SeC 和 10  $\mu$ M NAC(中性實驗)作用後的混和液與 55  $\mu$ L LMA(上膠)混合，把玻片拿起後滴入混和溶液，等待凝固，之後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，即可玻片取出，並用無菌二次水沖洗。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)，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)，接著用甲醇(methanol)溶液滴到專用玻片上再用無菌二次水沖洗 1 次，拿出專用玻片放在吸水紙使其乾燥後，加入 SYBR Green 30  $\mu$ 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，並以 Comets score 軟體進行分析。

## 5. 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) 蛋白質電泳

先製備膠體，下膠(ResolverA+ResolverB+8  $\mu$ L TEMED+80  $\mu$ L 10 %APS)、上膠(StackerA+StackerB+6  $\mu$ L TEMED+30  $\mu$ L 10 %APS)。將配製完成之膠體組裝於電泳槽中，並將槽內填滿 running buffer，並去除膠片底部的氣泡，即可將 protein marker 和蛋白質樣品放至 well 中，以 100 V 進行電泳約 2 小時。

### (2) 蛋白質轉漬

將 PVDF 膜浸泡於甲醇中活化 5 分鐘，再以蒸餾水清洗，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，再放入含 transfer buffer 的轉漬槽中，4°C 下以 250mA、80V 作用 3 小時。

轉漬完成的 PVDF 膜浸泡在 blocking solution 中振盪 1 小時後，則去除 blocking solution，並以 TBST 洗 3 次(1 次/10 分鐘)。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。再去除一級抗體稀釋液，以 TBST 洗 3 次(1 次/10 分鐘)，去除非特異性結合之一級抗體。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，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，最後以 ECL kit 進行冷光顯影反應偵測冷光強度，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。

#### 6. 同源重組活性測試(HR assay)

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。

##### (1) 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。

##### (2) 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。

##### (3) 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。

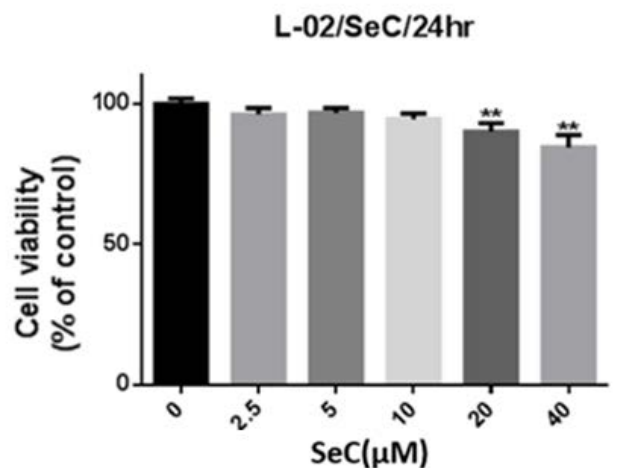
轉染結束後以 PBS 清洗 2 次，在每 well 加入 500  $\mu$ L 培養基和不同控制組混和液 50  $\mu$ L，並放置培養箱 24 小時，再利用 HR kit 溶出 DNA 後進行聚合酶連鎖反應(PCR)，先加入 7  $\mu$ L 無菌二次水、10  $\mu$ L PCRmix、2  $\mu$ L 引子(158+159)、1  $\mu$ L DNA 模板，利用聚合酶連鎖反應儀設定溫度為 95 $^{\circ}$ C(3 分鐘)→ 95 $^{\circ}$ C(15 秒)→ 61 $^{\circ}$ C(30 秒)→ 72 $^{\circ}$ C(1 分鐘)，重複 35 次，最後在 72 $^{\circ}$ C 時延長至 5 分鐘，跑膠結束後用數位照膠系統顯影。

### 三、研究結果與討論

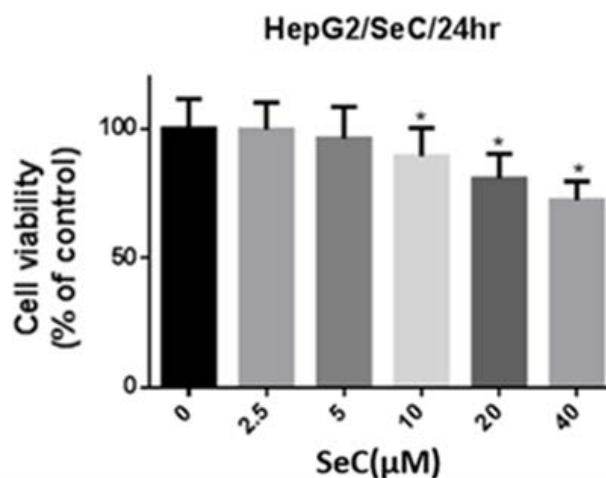
#### (一) 研究結果

##### 1. 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

已有研究證實 SeC 具有良好選擇性抑制 HepG2 的效果[1]，所以我利用細胞存活率分析(MTT assay)再次驗證 SeC 對 HepG2 的抑制效果，並目標找出相對於 L-02 的抑制濃度。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。從圖二、圖三可知，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，因此後續實驗主要設定在 10  $\mu\text{M}$  左右的濃度進行研究。



圖二. SeC 對 L-02 細胞存活率的影響(\*\* $p \leq 0.0001$ )

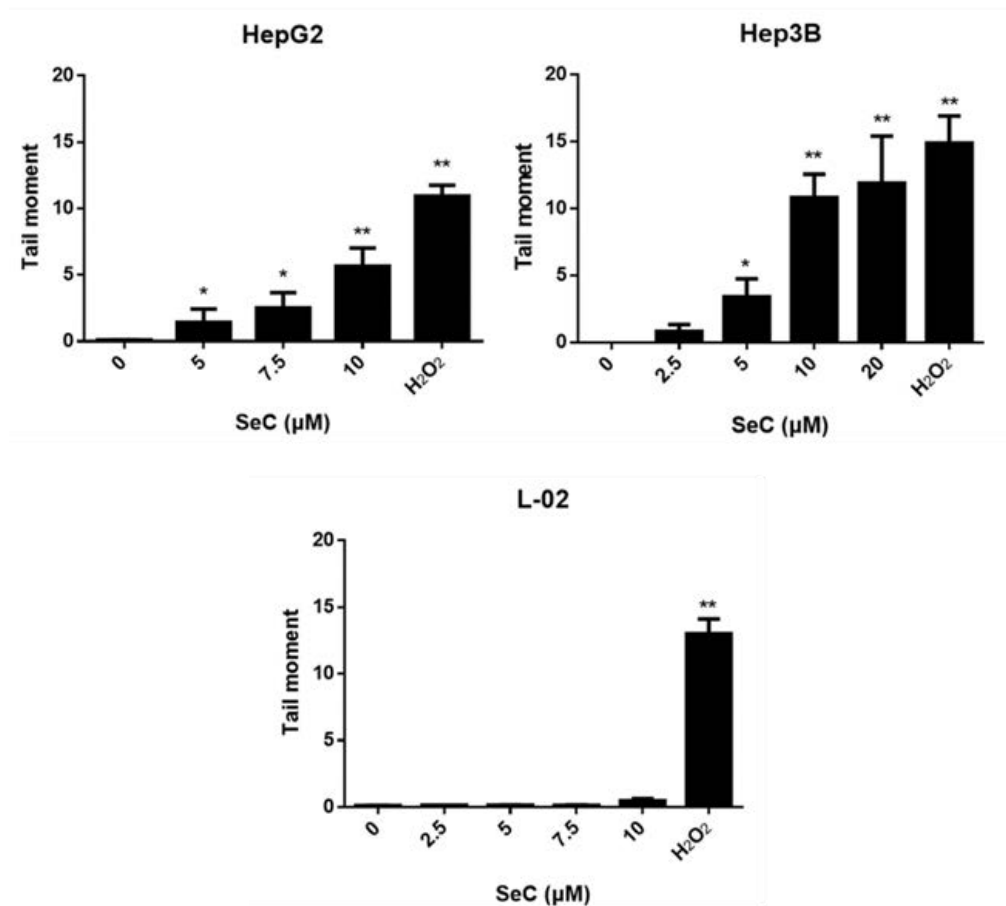


圖三. SeC 對 HepG2 細胞存活率的影響(\* $p < 0.05$ )

## 2. 研究 SeC 對 HepG2 和 L-02 DNA 損傷的影響

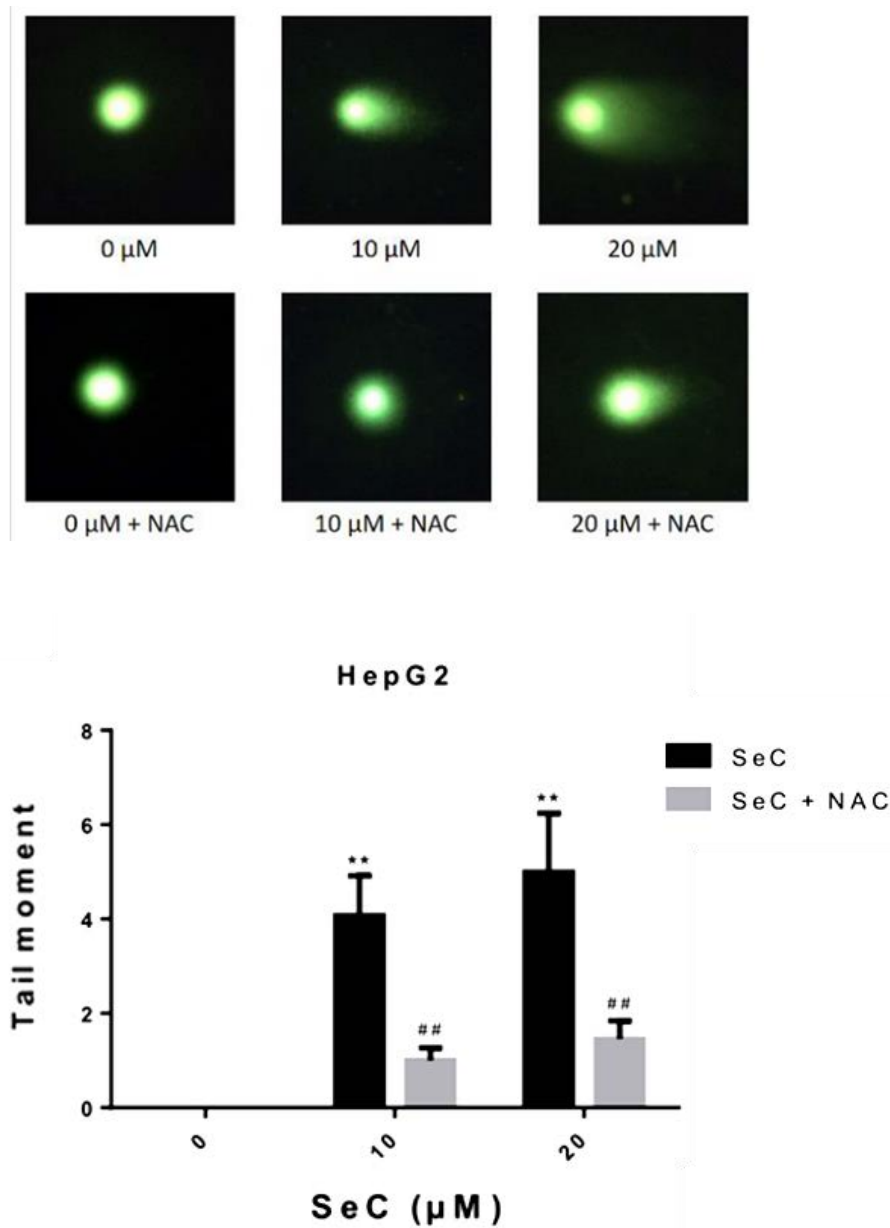
我以中性及鹼性的彗星試驗(Comet assay)對 Hep3B(無抑癌基因 p53)、HepG2(具部分抑癌基因 p53)、L-02(具完整抑癌基因 p53)測試 SeC 對 DNA 氧化性損傷程度的影響。

因 DNA 單股損傷較輕微，因此我先以鹼性彗星試驗進行實驗，分別加入 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、7.5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$  或 20  $\mu\text{M}$  的 SeC 分別作用於 Hep3B、HepG2、L-02 24 小時，再額外利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用於細胞，使其短時間內造成氧化性傷害，即可利用數值對照 SeC 對細胞損傷的影響，實驗數據以 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，從圖四可看出在 10  $\mu\text{M}$  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。



圖四. SeC 對 HepG2、Hep3B、L-02 單股 DNA 損傷的影響(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p \leq 0.0001$ )

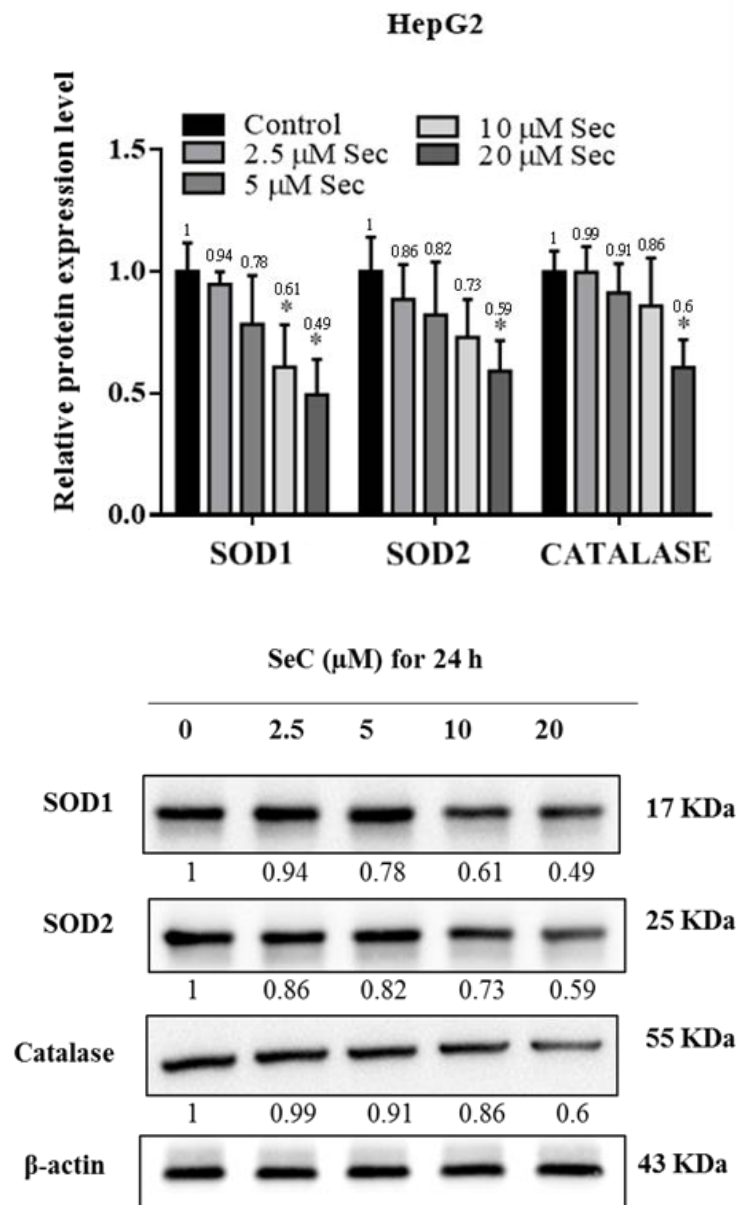
因 Hep3B 缺乏抑癌基因 p53，無 DNA 修補途徑，因此我選擇使用 HepG2 進行中性彗星試驗，進一步檢測 DNA 雙股損傷。中性彗星試驗分別加入 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  的 SeC 作用於 HepG2 24 小時，從圖五可看出 SeC 隨劑量增加，螢光顯微鏡下的細胞拖尾程度愈長，tail moment 的數值也愈大，由此可看出 SeC 會讓 HepG2 有顯著的 DNA 雙股傷害。NAC 可作為自由基的清除劑，預防細胞凋亡和氧化相關基因毒性，因此我另外再加入 10  $\mu\text{M}$  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。



圖五. SeC 對 HepG2 造成雙股 DNA 損傷(\*\* $p \leq 0.0001$ ; ## $p \leq 0.0001$ )

### 3. 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，從圖六可看出 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。



圖六. SeC 對 HepG2 的抗氧化酵素蛋白的表現量(\* $p < 0.05$ )

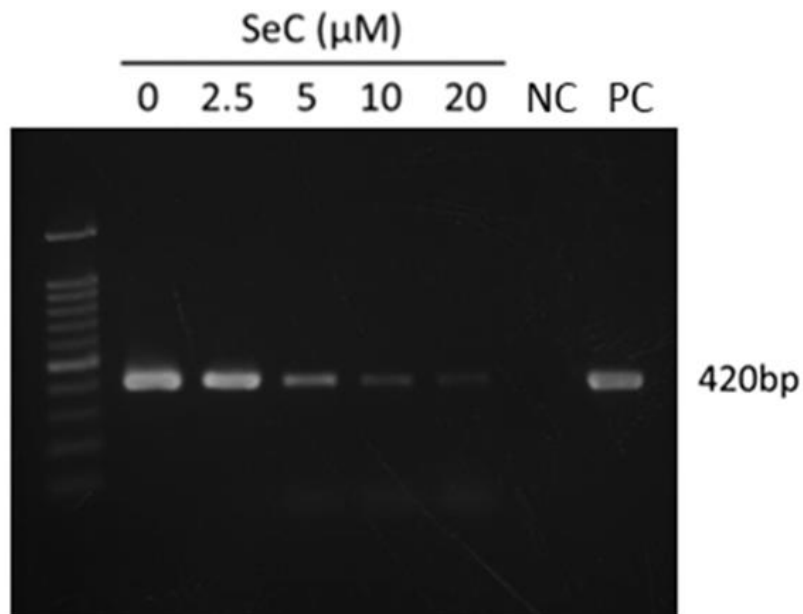


#### 4. 研究 SeC 對 HepG2 在 DNA 修補能力上的影響

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

雙股修復途徑分為同源重組修補(HR)和非同源性末端接合(NHEJ)，同源性重組修復是利用細胞內的染色體兩兩對應的特性，若其中一條染色體上的 DNA 發生雙股斷裂，則另一條染色體上對應的 DNA 序列即可當作修復的模板來回復斷裂前的序列。

因此我先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。從圖七可知，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。

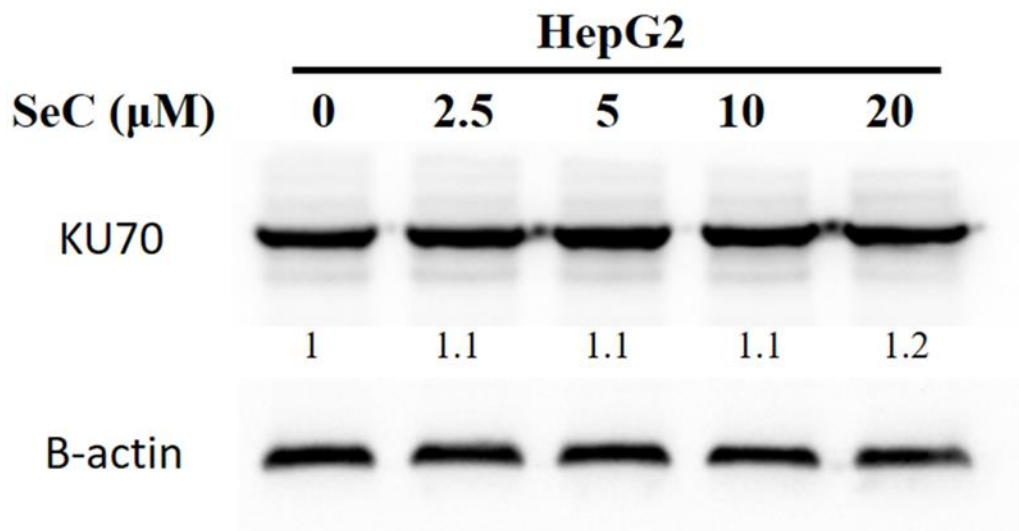


圖七. SeC 對 HepG2 HR 修補活性的影響

(2) 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

NHEJ 的機制是透過修復蛋白可以直接將雙股裂斷的末端彼此拉近，再藉由 DNA 黏合酶 (ligase) 的幫助，將斷裂的兩股重新接合。因為檢測 NHEJ 修復活性的方法與 HR assay 不同，須利用更高等級的實驗室和設備，因此我選擇從修復蛋白探討 SeC 對 NHEJ 的影響。

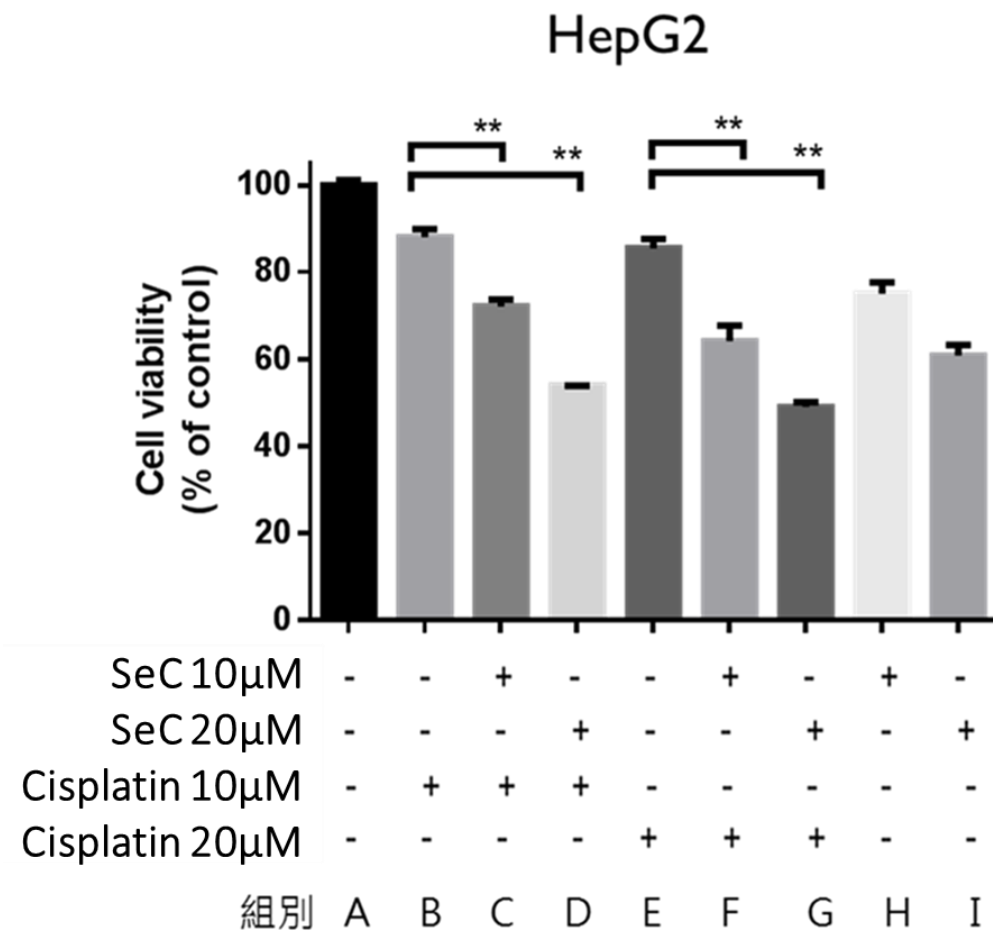
我鎖定 Ku70 蛋白做檢測，因其是 NHEJ 進行修補時最先需要用到的上游蛋白，並以西方墨點法去觀察 Ku70 的表現量。我分別以 0  $\mu\text{M}$  (控制組)、2.5  $\mu\text{M}$ 、5  $\mu\text{M}$ 、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  的 SeC 進行實驗。從圖八得知 SeC 對 Ku70 蛋白的表現量無抑制的效果，反而蛋白表現量有些微增加。由於 NHEJ 有許多修補蛋白參與，未來我會多測試其它 NHEJ 修補蛋白的表現量，才能看出 SeC 對 NHEJ 的機制的影響。



圖八. SeC 對 HepG2 Ku70 蛋白的表現量

5. 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  (控制組)、10  $\mu\text{M}$ 、20  $\mu\text{M}$  的 SeC 和 Cisplatin 做交叉比對，依圖九，從組別 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  $\mu\text{M}$  的 Cisplatin 加 10  $\mu\text{M}$  SeC 的細胞存活率又比單純加入 20  $\mu\text{M}$  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。



圖九. SeC 和 Cisplatin 對 HepG2 細胞存活率的影響(\*\* $p < 0.0001$ )

## (二) 討論

當 DNA 受到損傷後會引發四種路徑:細胞週期檢查點(Cell cycle checkpoint)的啟動、轉錄 DNA 修復相關蛋白、啟動 DNA 修復機制、細胞凋亡。由實驗的圖三和圖四結果可得知 SeC 可以藉由累積大量的 ROS 造成癌細胞的氧化性傷害,並同時可以抑制抗氧化酵素(SOD1、SOD2、Catalase)的表現量(圖六),阻止癌細胞藉由酵素分解 ROS 以減緩細胞損傷。而 SeC 在造成 HepG2 DNA 損傷時,也降低細胞雙股斷裂的同源重組活性,抑制 DNA 損傷的修復機制(圖七),雖本研究尚未看出 SeC 在非同源性末端結合的能力(圖八),但仍然可以推論得知 SeC 不論在導致 DNA 損傷以及事後細胞的同源修補都對 HepG2 具有抑制的效果。最後 SeC 與 Cisplatin 的聯合使用則可發現 SeC 在未來肝癌藥物研發上的潛力。

由於癌細胞相較正常細胞更容易表現出較高的 ROS 水平,而高 ROS 水平通常對細胞有害[11],利用癌細胞這項特性,可透過 SeC 累積 ROS,增加氧化壓力來達成選擇性殺死癌細胞達到治療的效果。因哺乳類基因序列較為複雜,在雙股 DNA 修補多採取 NHEJ 的模式,因此在往後的動物及人體實驗為確保能阻止癌細胞自行 DNA 修復,在 NHEJ 的實驗上仍然需要更多的驗證,除了檢測相關修復蛋白外,亦可檢測 DNA-PKcs,因該蛋白質可透過磷酸化使 Ku70、Ku80 活化,形成 DNA-PK 蛋白激酶(DNA-PK protein kinase),會將已斷裂的 DNA 兩端接合形成聯會,因此我認為本實驗雖無法得出 SeC 可抑制 Ku70 的結論,但 SeC 可能抑制 DNA-PKcs,造成修復蛋白無法活化,而無法進行 NHEJ 的修復路徑,造成細胞凋亡。

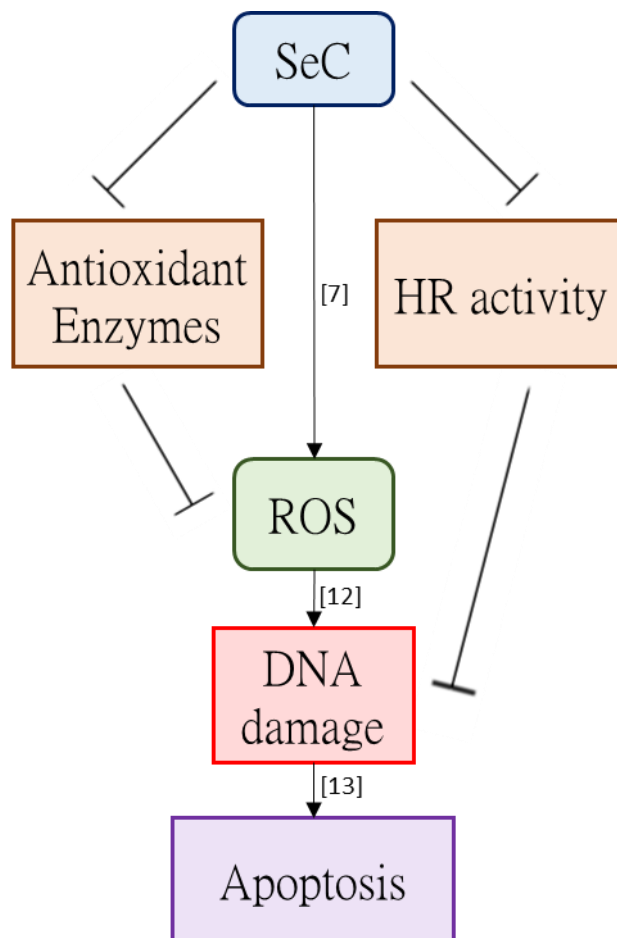
## 四、結論與應用

### (一) 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. SeC 影響 HepG2 生長作用機制圖

## (二) 應用

現今已有多種治療癌症的方法，包含全身性治療和局部治療，而化療就屬於全身性治療的一種，因此化療藥物會作用於全身，因此對身體產生極大的負擔，而藥物會透過血液循環將藥劑作用在除了癌細胞外，也會影響正常的細胞，進而造成眾多的副作用。

我認為本研究可改善抗癌藥物用量和副作用的問題，將 Cisplatin 結合 SeC 使用後，可降低 Cisplatin 的使用量，並提升抑制癌細胞的效果，藉由後續進行動物實驗，研究是否可以成為癌症病患的福音。

## (三) 未來展望

1. 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，也需做 NHEJ 活性測試檢測 NHEJ 的修復活性。
2. 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。
3. 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，並進一步進行動物實驗，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，期許未來可以應用在醫學治療。

## 五、參考文獻

1. Greeder GA, Milner JA. Factors influencing the inhibitory effect of selenium on mice inoculated with Ehrlich ascites tumor cells. *Science*. 1980 Aug 15;209(4458):825-7.
2. Asfour IA, El-Tehewi MM, Ahmed MH, Abdel-Sattar MA, Moustafa NN, Hegab HM, Fathey OM. High-dose sodium selenite can induce apoptosis of lymphoma cells in adult patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Biol Trace Elem Res*. 2009 Mar;127(3):200-10.
3. Brown KM, Arthur JR. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutr*. 2001 Apr;4(2B):593-9.
4. El-Bayoumy K, Sinha R. Mechanisms of mammary cancer chemoprevention by organoselenium compounds. *Mutat Res*. 2004 Jul 13;551(1-2):181-97.

5. 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.
6. Chen T, Wong YS. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed Pharmacother.* 2009 Feb;63(2):105-13.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Fan C, Zheng W, Fu X, Li X, Wong YS, Chen T. Strategy to enhance the therapeutic effect of doxorubicin in human hepatocellular carcinoma by selenocystine, a synergistic agent that regulates the ROS-mediated signaling. *Oncotarget.* 2014 May 15;5(9):2853-63.
11. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Dec;12(12):931-47.
12. Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, Jeyasekharan AD. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol.* 2019 Jul;25:101084.
13. 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.

## 【評語】 090003

1. 該研究主題的目的在於使用新穎藥物作為肝癌的治療功效之探討。

研究背景與目的立論清楚，研究的流程循序漸進且邏輯合理。例如若研究新穎藥物的場合，首先試驗藥物是否針對癌細胞有選擇性毒殺，與過去的藥物的合併處理作用效率也是相當重要的。不過實驗結果對於選擇性毒殺的部分，雖然對於 DNA 損傷有選擇性，不過細胞存活率的部分在較高劑量下兩者皆會顯著性下降。這個部分可以多加探討。

2. 可以再加入另外一個細胞株做為研究比較適合。
3. 圖六的定量數據需要再重做一次。
4. 似乎沒有看到詳細的機制探討可以再加強。