

# 科技部補助

## 大專學生研究計畫研究成果報告

\* \*\*\*\*\* \*  
\* 計畫 : 探討副乾酪乳桿菌(Lactobacillus paracasei strain \*  
\* 名稱 346)抑制口腔癌細胞增生的分子機制 \*  
\* \*\*\*\*\* \*

執行計畫學生： 洪毓傑  
學生計畫編號： MOST 106-2813-C-040-021-B  
研究期間： 106年07月01日至107年02月28日止，計8個月  
指導教授： 張文瑋

處理方式： 本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

執行單位： 中山醫學大學生物醫學科學學系（所）

中華民國 107年03月28日

題目 :探討副乾酪乳桿菌(*Lactobacillus paracasei* strain 346)抑制口腔癌細胞增生的分子機制

### (一) 摘要

副乾酪乳桿菌 *Lactobacillus paracasei* 具有調節過敏反應的能力。除了免疫調節功能，近年來益生菌也被發現具有抗癌活性，但對於副乾酪乳桿菌是否具有抗癌能力則仍不清楚。本研究發現副乾酪乳桿菌 346 菌株(LP346)之熱殺(heat-killed)菌液具有抑制口腔癌細胞增生的功效。我們使用 WST-1 測試發現 LP346 菌株之熱殺菌液能有效抑制 SAS 口腔癌細胞的增生，但並未造成顯著的細胞死亡；利用 caspase 抑制劑處理，也未能有效改善 LP346 熱殺菌液造成的 SAS 細胞生長抑制，顯示 LP346 的增生抑制作用並非透過誘導細胞凋亡；經細胞週期分析，LP346 熱殺菌液能造成 SAS 細胞停滯在 G0/G1 期。癌幹細胞為癌症組織內一群具有腫瘤起始與轉移能力的特殊癌細胞，對於癌症的復發與轉移扮演重要角色，因此我們也探討 LP346 熱殺菌液是否有抑制 SAS 癌幹細胞的能力。利用癌症球體培養，發現 LP346 熱殺菌液具有抑制 SAS 細胞內癌幹細胞的自我更新形成的功效。我們也嘗試利用固態酵素管柱分別分解 LP346 菌液中的蛋白質或 RNA，試圖分析 LP346 熱殺菌液內有效抑制 SAS 細胞增生的成分，結果顯示，分解蛋白質與 RNA 的 LP346 菌液依然有抑制 SAS 細胞的效果。在免疫缺陷小鼠腫瘤模式中，餵食 LP346 熱殺菌液具有抑制腫瘤生長的效果。透過本研究，我們初步證實副乾酪乳桿菌 346 菌株之熱殺菌液具有抗口腔癌的功效，其作用機轉與抑制細胞週期有關，此益生菌熱殺菌液或能作為開發成預防口腔癌之保健食品。

### (二) 研究動機與問題

本研究動機起源於，近年研究發現益生菌特定菌株存在於腸道中，有抑癌的能力，但是機轉向不清楚。在癌症免疫療法中，每個癌症病患對免疫療法的反應並不一致。在老鼠實驗中發現，當腸道有特定菌群時，可以提升老鼠使用 Programmed cell death 1 ligand 1(PD-L1)單株抗體對抗黑色素瘤的功效[1]。在腸道中有某些特殊菌種時，可誘發一些特殊的免疫反應，使免疫細胞分泌細胞激素(cytokine)促使免疫細胞做出不同的調整來對抗癌細胞，並可以合併抗癌藥物使用，使藥物有較好的效果 [2]。也有研究表明從羊奶製品中，也有找到一些可誘導人類結腸癌走細胞凋亡的益生菌株[3]。於是從景岳公司提供的益生菌中，挑選出副乾酪乳桿菌 *Lactobacillus paracasei* strain 346(LP346)菌株之熱殺(heat-killed)死菌菌液，探討對 SAS 口腔癌細胞株是否具有抑制生長的活性，透過 WST1 分析發現 LP346 熱殺菌液對於 SAS 細胞有明顯的生長抑制(圖一)，並且對於正常口腔角質細胞株 SG 細胞並沒有影響(圖二)。因此我們認為 LP346 具有發展成為預防口腔癌保健品的潛力。本研究計畫希望利用分析細胞週期及其相關分子蛋白，探討 LP346 熱殺菌液抑制 SAS 細胞生長的分子機制，並進一步探討 LP346 是否能抑制口腔癌症幹細胞的自我更新。

本研究的目標為：

- (1) 測試 LP346 菌株之熱殺菌液是否抑制 SAS 口腔癌細胞的增生；
- (2) 分析 LP346 熱殺菌液抑制 SAS 口腔癌細胞生長的機制是否與細胞週期及調控細胞週期之分子蛋白有關；
- (3) LP346 熱殺菌液對於口腔癌幹細胞自我更新的影響
- (4) LP346 熱殺菌液有效成分之初步分析

### (三) 文獻回顧與探討

口腔癌為頭頸惡性腫瘤的一種，發源於口腔部位，依發源位置不同，癌症細胞組成也有些微不同。口腔癌為台灣癌症死亡原因的第 5 位，其成因與抽菸、喝酒及嚼食檳榔高度相關，其治療多為外科手術、放射線治療與化學藥物治療，尚無有效的標靶療法[5, 6]。而癌幹細胞為癌細胞中一群細胞擁有腫瘤起始與分化出腫瘤異質性(heterogenous)細胞的能力，並且與癌症轉移有著密切的關係，當癌症幹細胞活性活躍時，將導致腫瘤易於轉移與增生[7]。

益生菌可以從腸道中找到，他們對於人類的健康有著很大的關連性，多攝取益生菌相關的食品可以增加腸內好菌，可以調節腸道內的菌叢、控制飲食的吸收、免疫反應相關的調節[8]。副乾酪乳酸桿菌 *Lactobacillus paracasei* 具有調節過敏反應的能力，其中 LP33 菌株具有免疫調節的功用，被開發成抗過敏之保健食品。除了免疫調節功能，近年來益生菌也被發現具有抗癌活性，但對於副乾酪乳酸桿菌是否具有抗癌能力則仍不清楚。研究發現益生菌對於腫瘤的治療也有一定的影響，在老鼠食物中投予特定益生菌時，可以增強標靶藥物的藥效[1]。也有研究指出，副乾酪乳酸桿菌可藉由抑制誘導發炎的細胞激素分泌來抑制發炎反應[9]。在以前研究中，已經有使用細菌來治療癌症的紀錄，如沙門氏菌等，用此細菌可當作標靶藥物的載體來治療腫瘤[10]。

失去細胞凋亡能力與細胞週期失調為造成細胞癌化的重大因素。癌症對於治療時的細胞死亡反應往往不是經過細胞凋亡，因為癌細胞控制此機轉的功能大部分已喪失。以 p53 為例，此蛋白在細胞裡面扮演著當細胞面臨壓力與 DNA 受損時，使細胞停止生長與修復受損的細胞區域。當細胞遭受不可逆的傷害時，也負責啟動細胞凋亡等相關程序。然而，許多腫瘤內 p53 基因常因突變而失去正常功能，導致抗癌藥物無法藉由活化 p53 進而引發細胞凋亡來抑制癌細胞的生長[11]。即便 p53 突變導致癌細胞之細胞週期持續進行，癌細胞仍舊需要透過控制細胞週期相關的蛋白如 cyclin-dependent kinases (CDKs)，來達到細胞增生的目的，因此標靶調控細胞週期蛋白的策略，仍舊被應用來發展抗癌藥物[12]。

### (四)材料與方法

#### 1. Cell culture:

SAS,SG細胞以含胎牛血清之DMEM(10% FBS, 1mM glutamine, 1mM sodium pyruvate, 1mM P/S/A)進行日常培養，並放在37度C、0.5%之CO<sub>2</sub>培養箱中培養。當細胞長滿時，利用繼代培養方式，使用1%之trypsin-EDTA使細胞脫離培養盤，並計數其細胞量，並取適當之細胞量回去培養盤繼續進行生長。

## **2.IC50;**

利用不同濃度的LP346菌株代謝產物去處理正常口腔口腔角質SG細胞與SAS口腔癌細胞，以觀察在何種濃度底下可以使細胞增生降低一半(IC50)。用WST-1以450nm跟650nm的波長去測細胞的吸光值，將450nm-650nm的數值以GraFit軟體計算IC50。

## **3.cell proliferation assay :**

把細胞取 $1 \times 10^5$ 個分別放入12well，並在每well中加入 $2.5 \times 10^8$ -  $2.5 \times 10^5$  CFU/ml)之LP346熱殺菌液，並以每濃度三重複的方式培養，外加一排三重複的未加菌液(control)組。經過72小時之後，將medium吸起來收到一個小離心管，然後加1mlPBS小心清洗，吸除PBS，加200ul trypsin作用1-2分鐘，在吸取原收集的medium進行中和以及沖下細胞。之後將細胞離心(1600rpm/5分鐘)，吸去1ml上清液後，以tip利用剩餘溶液將細胞打散均勻，再利用trypan blue計數細胞，紀錄死(藍色)、活(亮的)細胞數目。

## **4.生長曲線:**

細胞種在12well中( $1 \times 10^4$  cells/well),全部以相同之熱殺菌液濃度，進行日常培養，培養24hr、48hr、72hr跟92hr後，將medium吸起來收到一個小離心管，然後加1mlPBS小心清洗，吸除PBS後，加200ul trypsin作用1-2分鐘，在吸取原收集的medium進行中和以及沖下細胞。之後將細胞離心(1600rpm/5分鐘)，吸去1ml上清液後，以tip利用剩餘溶液將細胞打散均勻，再利用trypan blue計數細胞，紀錄死(藍色)、活(亮的)細胞數目。結果以ppt中的xy散佈圖把時間跟對應之細胞畫出。

## **5. Apoptosis Test**

測加入LP346之熱殺菌液是否會使SAS口腔癌細胞走細胞凋亡之途徑。利用96well分別混合10uM z-devd-FMK與10uM z-vad-FMK之SAS+ LP346( $2.5 \times 10^8$ (CFU))，放在37度C、0.5%之CO<sub>2</sub>培養箱中培養72hr後，加入WST-1或CCK-8以450nm跟650nm的波長去測細胞的吸光值，結果以扣除背景值的吸光長條圖呈現。

## **6. BrdU incorporation assay**

SAS取 $1.5 \times 10^5$ 細胞種在6-cm dish中，等24hr貼盤後以低血清(0.5% FBS)medium使細胞週期停滯，經過24hr後再換回DMEM(10% FBS)，分別加入LP346  $2.5 \times 10^7$ (CFU)或 $2.5 \times 10^8$ (CFU)培養71hr後以10  $\mu$ M BrdU標定1個小時。之後依照FITC BrdU Flow Kit (BD Catalog No. 559619) protocol之步驟進行細胞固定、打洞、DNA片斷化、加入anti-BrdU-FITC抗體偵測細胞週期變化並使用PI進行DNA含量的染色，最後利用流式細胞儀進行螢光訊號分析。

## 7. 西方點墨法

收取 SAS 細胞，加入含有蛋白酶及磷酸酶抑制劑的細胞裂解液(RIPA buffer, Genetex Inc.)分解細胞，使細胞內含蛋白釋出，溶於溶液中。再使用 BCA 定量方法(Thermo Fisher Scientific)測定蛋白質濃度，各樣品取 40 $\mu$ g 之總蛋白，利用 SDS-PAGE 電泳來分離蛋白，並以 PVDF 膜進行轉漬。再以 5%之脫脂牛奶進行 blocking 1 小時。以特異性一級抗體於 4 $^{\circ}$ C 過夜培養，隔天以含有氧化酶之二級抗體於室溫反應 1 小時，清洗完畢後，加入冷光顯影劑，最後以冷光照相儀(Fusion Solo S, Vilber Lourmat)收取訊號，以 Image J 軟體(version. 1.51j, NIH)分析訊號差異。本研究預計使用一級抗體有: pRB (將購自 BD Phramagen), cyclin A2 (GTX103042), cyclin B1 (GTX100911), cyclin D1 (GTX112874), cyclin E1 (GTX103045) (以上將購自 Genetex Inc.), CDK Antibody Sampler kit (CST#9868, 將購自 Cell Signaling Technology),  $\beta$ -actin (將購自 Sigma Aldrich)。

## 8. 懸浮性球體培養(spheroid culture)

先將培養球體細胞用之生長因子(1 $\times$ B27 supplement, 10ng/ml EGF, 10ng/ml bFGF, 5ug/ml insulin, 1ug/ml Hydrocortisone, 4ug/ml Heparin)均勻混合，再將生長因子與球體細胞培養基(DMEM/F12 containing 0.5% methylcellulose)混合，再加入細胞 (1 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml)混合均勻。最後混合好的培養液以每孔 2ml 加入超低附著依賴性的 6 孔盤中，進行初代球體培養 (Primary Sphere)，養期間每三天加入 1000 $\mu$ l 培養基(含生長因子)。於第八天，收集初代培養的細胞以相同方法，進行二次的球體培養(secondary sphere)。於第八天，使用倒立式顯微鏡觀察並計數球體數目。

## 9. 過 proteinase K 與 RNAase A 之 column

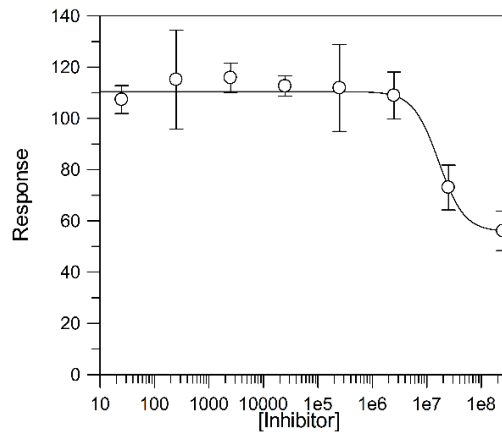
分別使用 column 內含 proteinase K 與 RNAase A，過濾 346 上清液，使 346 上清液內之蛋白與 RNA 被分解，並使用分解過後之 346 上清液測試是否影響 SAS 細胞的活性。此方法為分析 346 上清液中真正抑制細胞生長的有效成份屬於何種化合物，方便未來分析所使用。檢測細胞活性為使用 WST-1 或 CCK-8 以 450nm 跟 650nm 的波長去測細胞的吸光值。

## 10. 動物模式

利用 NOD/SCID 之小鼠，先施打 2 $\times$ 10<sup>5</sup> 之 SAS 細胞後，等體積到達 50mm<sup>3</sup> 就以一個禮拜以管餵方式五天，每次測試組餵食 LP346 死菌液(相當於 10<sup>9</sup>CFU)，控制組則餵食無菌水(100ul)。

### (四) 結果與討論

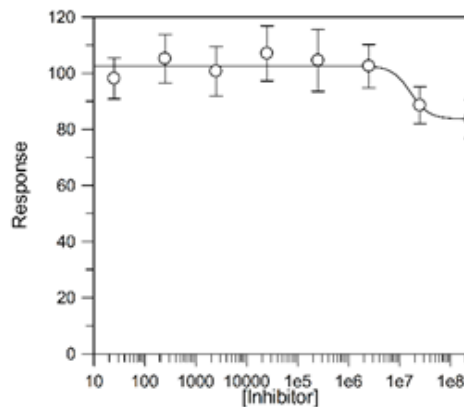
#### (1) LP346 之熱殺菌液對 SAS 口腔癌細胞生長的影響



圖一、LP346 熱殺菌液對 SAS 口腔癌細胞生長的影響。

以含不同菌數(colony forming unit, CFU)之 LP346 熱殺菌液(包含  $2.5 \times 10^8$  至 25 CFU/ml)的培養液於  $37^\circ\text{C}$  培養箱培養 SAS 口腔癌細胞，經過 72hr 後，利用 WST-1 測定細胞活性，以 450nm 波長讀取吸光值，再以 GraFit 軟體計算 IC50 數值。結果顯示，LP346 熱殺菌液具有抑制 SAS 細胞生長的功能，其抑制半數細胞生長的最小濃度(IC50)為  $(1.65 \pm 0.69) \times 10^7$  CFU/ml。

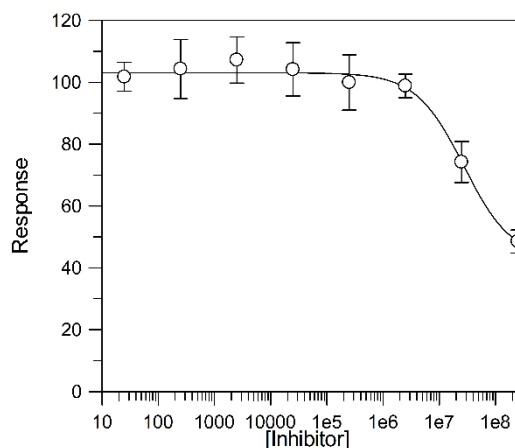
(2) LP346 菌株熱殺菌液對正常口腔角質 SG 細胞株生長的影響



圖二、LP346 熱殺菌液對正常口腔角質細胞 SG 細胞株生長的影響。

為檢驗 LP346 熱殺死菌液是否具有發展成為口腔癌治療藥物或預防保健品的潛力，了解 LP346 菌液對正常口腔細胞是否具有毒性是必要的。利用正常口腔角質細胞 SG 細胞株，同樣加入  $2.5 \times 10^8$  - 25 CFU/ml 之 LP346 菌液進行培養，經過 72 小時後，以 WST1 測試細胞活性，結果發現，即便菌量達  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml，SG 細胞的存活率仍有超過 85%，顯示 LP346 熱殺菌液對正常口腔角質 SG 細胞株沒有顯著的毒性。

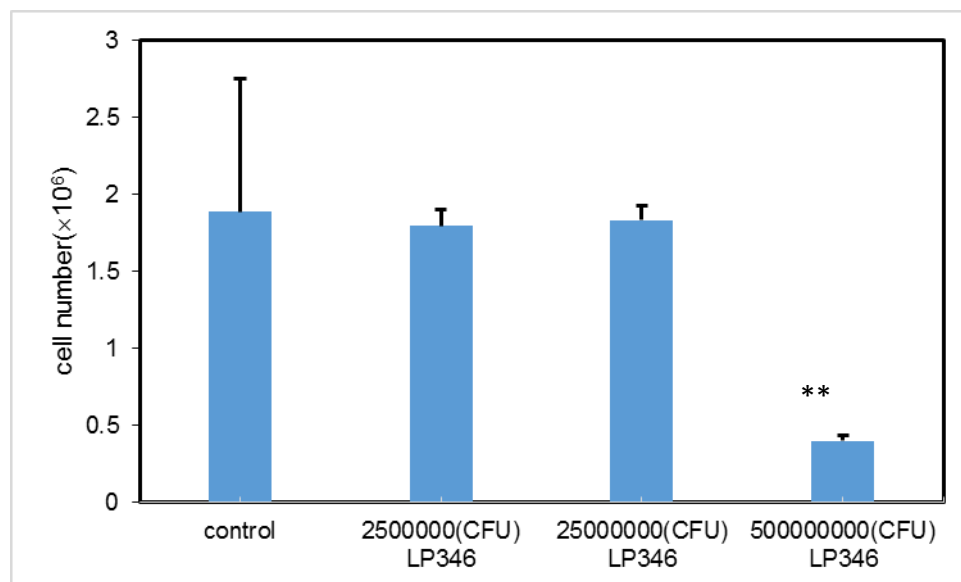
### (3) 不同批號之 LP346 熱殺菌液對 SAS 細胞生長的影響



圖三、不同批號之 LP346 熱殺菌液對於 SAS 口腔癌細胞生長的影響。

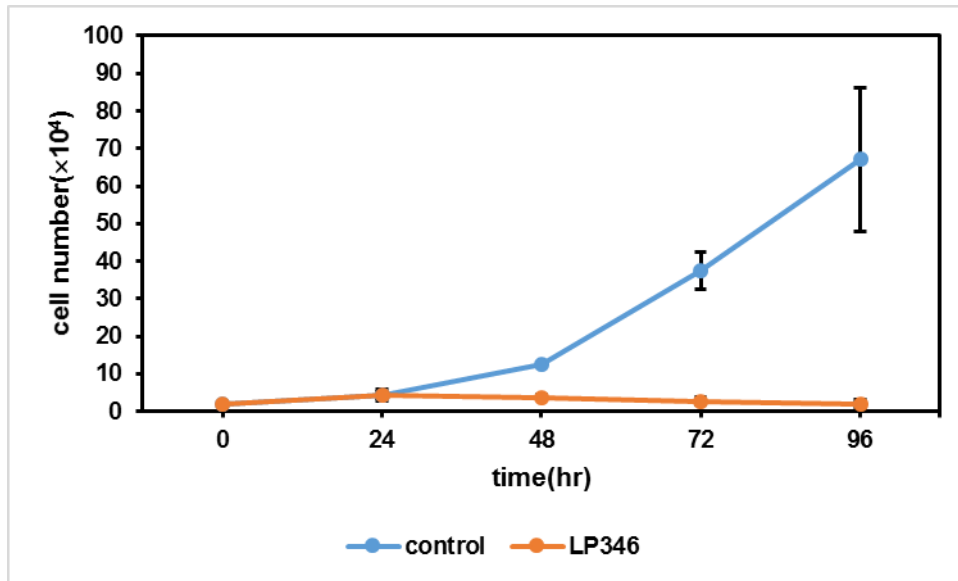
我們以景岳公司另一批生產之 LP346 菌液重複進行對 SAS 細胞生長的影響，結果發現不同批的 LP346 菌液具有穩定抑制 SAS 細胞生長的效果。具有穩定性及商業化潛力。IC50 為  $(2.73 \pm 0.99) \times 10^7$  CFU/ml。

### (4) LP346 熱殺菌液可以濃度依靠性(dose dependent)抑制 SAS 口腔癌細胞的生長



圖四、LP346 熱殺菌液對 SAS 細胞生長的影響。

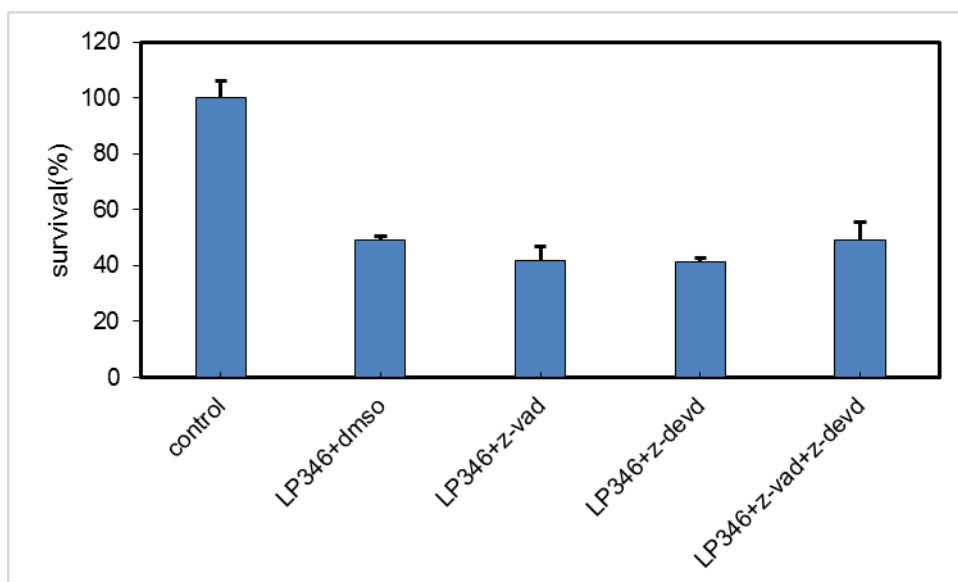
我們進一步利用 trypan blue exclusion assay 確認 WST1 的結果，發現在  $5 \times 10^8$  CFU/ml 菌量下，LP346 菌液可抑制約 75% 的細胞生長。\*\*,  $p < 0.01$ .



圖五、LP346 熱殺菌液對 SAS 生長曲線的影響。

我們發現在  $2.5 \times 10^8$  CFU/ml 菌量下，LP346 菌液可導致 SAS 細胞隨培養時間都沒有辦法進行增生。這些結果顯示，LP346 熱殺菌液確實具有抑制 SAS 口腔癌細胞生長的功效。此實驗結果也使我們可以發現 LP346 菌液影響 SAS 細胞最明顯的時間點為 72hr 後，因此後續的細胞實驗皆收取 SAS 細胞處理 LP346 菌液 72hr 後進行實驗。\*\*,  $p < 0.01$ .

(5) LP346 菌液抑制 SAS 生長並非透過細胞凋亡



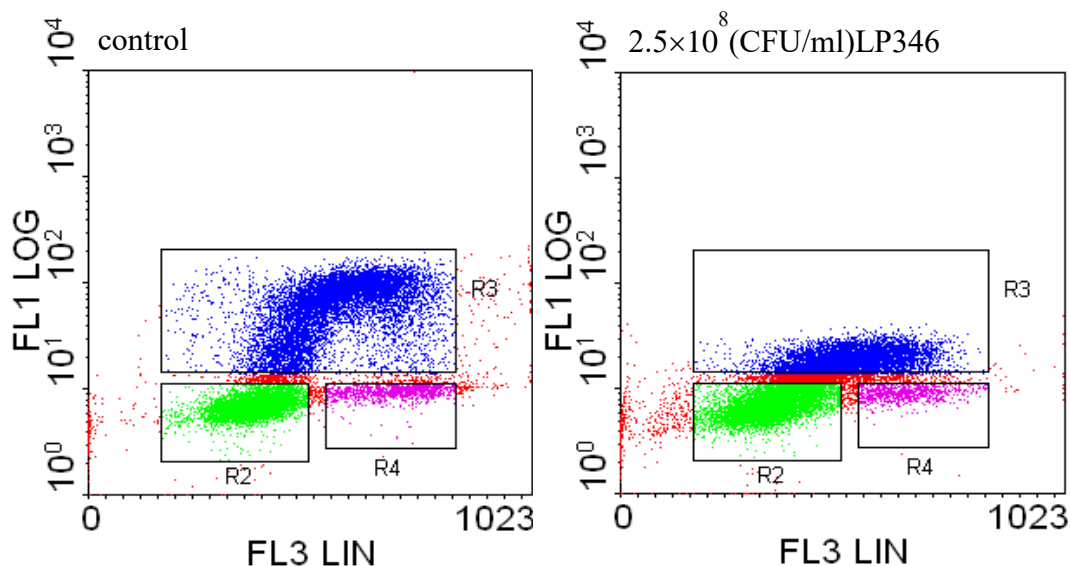
圖六、細胞凋亡抑制劑對於 LP346 抑制 SAS 細胞生長效果的影響。

因對癌細胞生長抑制作用可能透過誘導細胞凋亡，我們接下來用細胞凋亡抑制劑 (caspase inhibitor) 與 LP346 菌液共同處理 SAS 細胞，結果發現，無論以 z-VAD-FMK (pan-caspase inhibitor)、z-DEVD-FMK (caspase-3 inhibitor) 或同時以



z-VAD-FMK 及 z-DEVD-FMK 共同處理，LP346 菌液依舊可以抑制 SAS 細胞的生長(圖六)，顯示 LP346 造成 SAS 細胞生長抑制的效果並非透過誘導細胞凋亡。

(6) **LP346 熱殺菌液對 SAS 細胞之細胞週期的影響**

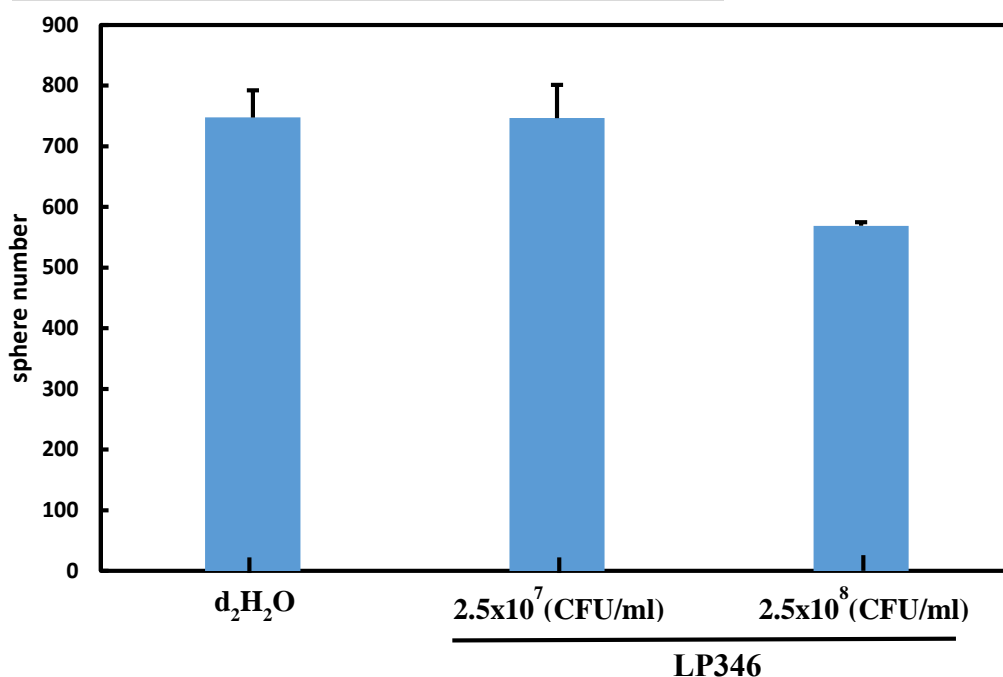


|            | control | $2.5 \times 10^8$ (CFU/ml) |
|------------|---------|----------------------------|
| R2(S 期)    | 51.81%  | 35.3%                      |
| R3(G1 期)   | 35.37%  | 46.14%                     |
| R4(G2/M 期) | 6.02%   | 4.8%                       |

圖七、LP346 熱殺菌液對 SAS 細胞細胞週期的影響。

因 SAS 細胞生長抑制的效果並非透過誘導細胞凋亡，而是細胞增長變慢。所以我們利用流式細胞儀並搭配 BrdU incorporation assay，進行細胞週期分析。結果顯示，加入 LP346 熱殺菌液後，S 期細胞減少而 G1 細胞增加，表示 LP346 熱殺菌液導致 SAS 細胞停滯於 G1 期。R2 為 S 期、R3 為 G1 期、R4 為 G2/M 期。

(8) LP346 熱殺菌液對於口腔癌幹細胞自我更新的影響

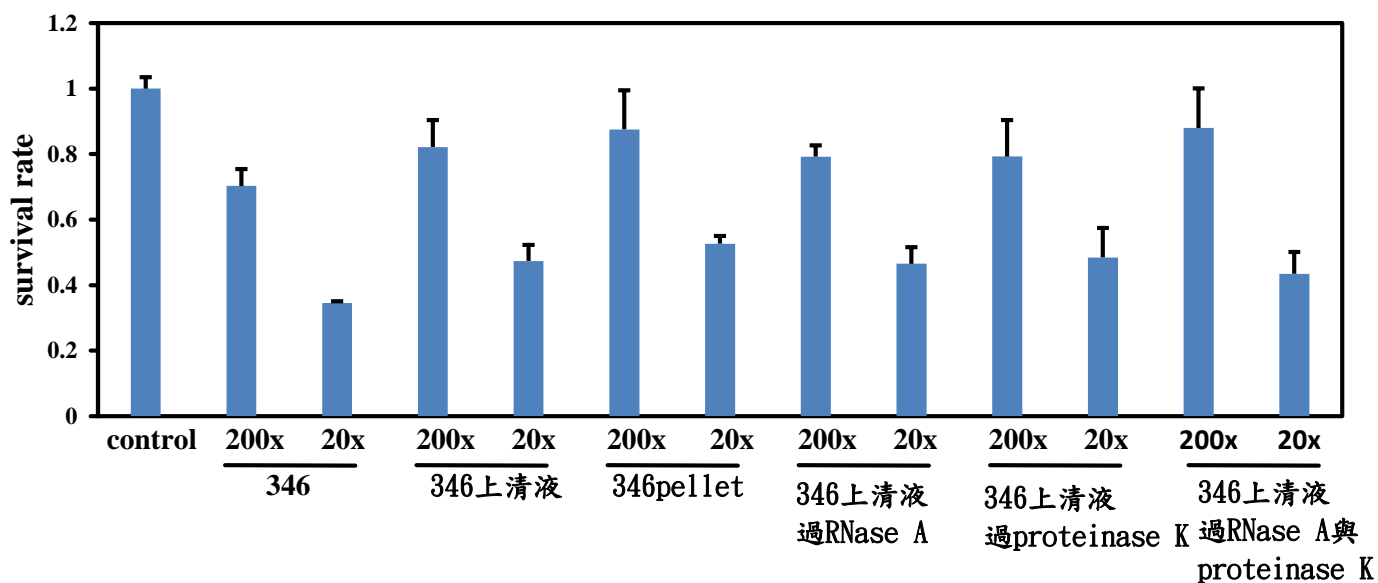


|               | d <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O | LP346(2.5x10 <sup>7</sup> CFU/ml) | LP346(2.5x10 <sup>8</sup> CFU/ml) |
|---------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Sphere number | 747.5                           | 746.5                             | 569                               |

圖八、LP346 熱殺菌液對於口腔癌幹細胞自我更新的影響。

藉由懸浮球體細胞的培養方式來觀察 SAS 細胞加入 LP346 菌液後，是否能有效抑制 SAS 癌幹細胞的增生。結果顯示在加入 2.5x10<sup>8</sup>(CFU/ml)的 LP346 熱殺菌液後，對於口腔癌幹細胞有抑制的趨勢。

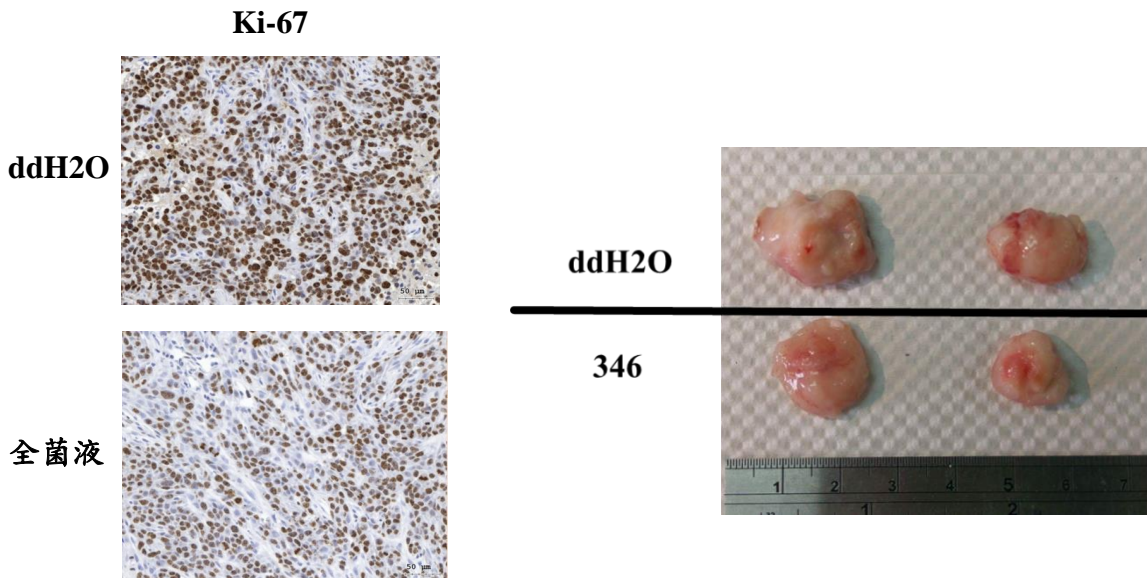
(9) 初步分析 LP346 熱殺菌液中有效成分



### 圖九、分析LP346熱殺菌液中有效成分。

使用20倍稀釋的LP346熱殺菌液通過含proteinase K或RNAase A的管住，使其內含的蛋白質與RNA被分解，可以發現LP346熱殺菌液依然有抑制SAS細胞生長的效果，我們推測影響SAS細胞生長的有效成分，可能並非以蛋白抑或是RNA的形式存在。

### (10) 以NOD/SCID免疫缺陷鼠異體腫瘤動物模式分析LP346熱殺菌液效果



### 圖十、動物模式中 LP346 抑制 SAS 的效果。

將  $1 \times 10^5$  SAS 細胞與 2.5mg/ml matrigel 混和並注射於 NOD/SCID 免疫缺陷小鼠的背部皮下，待腫瘤生長至  $50\text{mm}^3$  開始以餵食管餵食 LP346 熱殺菌液 ( $1 \times 10^9$  CFU/小鼠/天，一周 5 天，共計 1 個月)，發現餵食全菌液的老鼠腫瘤體積較小(右圖)，且免疫組織染色中也發現細胞增生的標記(Ki-67)表現量也有明顯下降(左圖)。可以發現在小鼠模式中，LP346 熱殺菌液具有抑制口腔癌腫瘤生長的效果。

綜合以上的結果，我們發現LP346菌株對於SAS口腔癌細胞會有明顯抑制增生的效果，而同樣濃度下對SG正常口腔角質細胞則無明顯毒性。在Apoptosis inhibitors 測試則發現，細胞凋亡並非LP346熱殺菌液抑制SAS口腔癌細胞生長的主因。利用之BrdU incorporation assay 中發現，LP346熱殺菌液能造成SAS細胞之細胞周期停滯於G1期，推測LP346熱殺菌液可能透過抑制細胞週期的進行導致SAS細胞生長趨緩，而Tumorsphere分析中我們則發現LP346熱殺菌液有抑制SAS的癌幹細胞自我更新的功效。透過使LP346熱殺菌液通過含蛋白酶或RNA分解酶以去除蛋白質或RNA，我們發現LP346熱殺菌液抑制SAS細胞生長的活性物質並非以蛋白質或RNA的形式存在，因此之後分析有效成分時，可以朝如脂類、醣類或核苷

酸的方向篩選。NOD/SCID異體移植小鼠腫瘤模式中，我們發現口服餵食LP346熱殺菌液可能有抑制腫瘤生長的能力，但還需增加動物數量來確認。在未來，我們將透過western blot、qPCR等方式去確認LP346熱殺菌液抑制口腔癌細胞增生的分子機制。本研究初步證實LP346熱殺菌液具有抑制口腔癌的功效，具有開發為抑制口腔癌的試劑，但仍需更多證據證實。

#### (五) 參考文獻

- 1: Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, Benyamin FW, Lei YM, Jabri B, Alegre ML, Chang EB, Gajewski TF. Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*. 2015. 350(6264):1084-9.
- 2: Perez-Chanona E, Trinchieri G. The role of microbiota in cancer therapy. *Curr Opin Immunol*. 2016. 39:75-81.
- 3: Haghshenas B, Nami Y, Haghshenas M, Abdullah N, Rosli R, Radiah D, Khosroushahi AY. Bioactivity characterization of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *Microbiologyopen*. 2015. 4(5):803-13.
- 4: <http://www.canceraway.org.tw/cancerpageshow.asp?IDno=423>
- 5: [http://www.mohw.gov.tw/CHT/DOS/Statistic.aspx?f\\_list\\_no=312&fod\\_list\\_no=6201](http://www.mohw.gov.tw/CHT/DOS/Statistic.aspx?f_list_no=312&fod_list_no=6201)
- 6: Chan KK, Glenny AM, Weldon JC, Furness S, Worthington HV, Wakeford H. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: targeted therapy and immunotherapy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015. (12):CD010341.
- 7: Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003. 3(12):895-902. Review.
- 8: Yu AQ, Li L. The Potential Role of Probiotics in Cancer Prevention and Treatment. *Nutr Cancer*. 2016. 68(4):535-44.
- 9: Sun KY, Xu DH, Xie C, Plummer S, Tang J, Yang XF, Ji XH. Lactobacillus paracasei modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. *Cytokine*. 2017. 92:1-11.
- 10: Zheng JH, Min JJ. Targeted Cancer Therapy Using Engineered Salmonella typhimurium. *Chonnam Med J*. 2016. 52(3):173-84.
- 11: Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005. 5(3):231-7. Review.
- 12: Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017. 17(2):93-115.