

新疆家蚕抗菌肽体外抑制人胃癌细胞AGS的增殖

吴艳玲 夏丽洁 张富春*

(新疆生物资源基因工程重点实验室, 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

摘要 新疆家蚕抗菌肽(Cecropin XJ)具有抑制肿瘤细胞生长的能力。为研究不同浓度Cecropin XJ体外对人胃癌细胞AGS生长的影响, 分别采用MTT比色法、软琼脂集落形成实验、流式细胞术、划痕愈合和Transwell实验进行检测。结果表明, 20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Cecropin XJ能够显著抑制AGS细胞的增殖, 并具有剂量和时间依赖性。同时, 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的Cecropin XJ处理后集落形成率分别降低了(35.81 \pm 13.10)%、(48.12 \pm 5.68)%和(81.46 \pm 6.21)%。AGS细胞经不同浓度Cecropin XJ处理24 h后, 凋亡率逐渐上升并且细胞周期阻滞于S期。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cecropin XJ能够显著抑制AGS细胞的迁移和侵袭, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cecropin XJ几乎完全抑制AGS细胞的迁移和侵袭。以上结果说明, Cecropin XJ能够抑制AGS细胞生长、增殖, 有可能成为人胃癌治疗的辅助药物。

关键词 新疆家蚕抗菌肽; 人胃癌细胞AGS; 增殖抑制; 细胞凋亡; 细胞周期; 侵袭和转移

Inhibition of Cecropin XJ on Proliferation of Human Gastric Cancer AGS Cells

Wu Yanling, Xia Lijie, Zhang Fuchun*

(Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract Cecropin XJ, an antimicrobial peptide from Xinjiang silkworm, can inhibit tumor cells growth. To investigate the influence of different concentrations of Cecropin XJ on the growth of human gastric cancer AGS cells, several assays including MTT assay, soft agar colony formation assay, flow cytometry, wound-healing and Transwell assay were conducted. The results showed that 20~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Cecropin XJ could significantly inhibit the AGS cells proliferation in a dose-dependent and time-dependent manner. After treated with 20, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Cecropin XJ, colony forming ability was decreased by (35.81 \pm 13.10)%, (48.12 \pm 5.68)% and (81.46 \pm 6.21)%, respectively. The apoptosis rate of AGS cells increased gradually and the cell cycle was arrested in S phase after treated with different concentrations of Cecropin XJ for 24 h. 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Cecropin XJ could decrease AGS cells migration and invasion, while 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Cecropin XJ almost completely inhibited AGS cells migration and invasion. In conclusion, Cecropin XJ can significantly inhibit the growth and proliferation of AGS cells and might be potential for the treatment of human gastric cancer.

Key words Cecropin XJ; AGS cells; proliferation inhibition; cell apoptosis; cell cycle; invasion and migration

胃癌是世界各地最常见的恶性肿瘤之一, 在日本和中国发病率较高。由于胃癌早期诊断困难、治

疗方法有限以及较高的复发性, 胃癌患者术后生存超过5年的比例很低^[1]。一般而言, 90%的胃癌都是胃腺癌, 它可以分为高分化的腺癌和未分化的腺癌两种组织学类型。超过80%的胃癌患者均有不同程度的腹膜转移或淋巴结转移, 因此, 控制胃癌细胞的转移是治疗胃癌重要的预后因素之一^[2]。针对胃癌临床使用的化疗药物主要为5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、阿霉素、丝裂霉素C和依托泊苷^[3], 接受治疗的

收稿日期: 2014-05-13 接受日期: 2014-07-04
新疆维吾尔自治区高技术研究发展计划项目(批准号: 201110101)资助的课题
*通信作者。Tel: 0991-8583517, E-mail: zfcxju@xju.edu.cn
Received: May 13, 2014 Accepted: July 4, 2014
This work was supported by the Xinjiang High-tech Research and Development Program (Grant No.201110101)
*Corresponding author. Tel: +86-991-8583517, E-mail: zfcxju@xju.edu.cn
网络出版时间: 2014-09-17 15:21
URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.10.0168.html>

患者中10%~20%都有不良反应,晚期患者的生存期基本维持在3个月左右^[4],因此迫切需要发现更高效的胃癌治疗药物。

抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)是生物体内经诱导产生的一种具有生物活性的小分子多肽,是天然免疫防御系统的重要组成部分^[5]。AMPs具有强碱性、热稳定性、耐酸碱以及广谱抗菌的特性,通过招募单核细胞或中性粒细胞并诱导人T细胞和未成熟树突状细胞的迁移参与先天免疫和适应性免疫。根据对新疆家蚕抗菌肽(Cecropin XJ)一级结构的测定发现, Cecropin XJ属于Cecropin-B类家族,信号肽有22个氨基酸,成熟肽有37个氨基酸,分子质量为3.9 kDa,等电点为10.37,具有两亲性 α -螺旋区域,热稳定性强,抗菌谱广,并对酸碱盐有一定的耐受性^[6-7]。已有实验表明, Cecropin XJ对多种癌细胞具有抑制增殖的作用^[8],并通过前期研究筛选出对Cecropin XJ比较敏感的人胃癌AGS细胞。本研究目的在于探讨Cecropin XJ在体外对人胃癌细胞AGS的生长抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

抗菌肽Cecropin XJ为本实验室通过基因工程转化到酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中进行诱导表达获得,纯化后保存于-80℃待用^[9]。人胃癌细胞系AGS细胞由北京大学肿瘤医院分子肿瘤实验室提供。

1.2 试剂与仪器

DMEM培养基、胰蛋白酶(trypsin)购自Hyclone公司;胎牛血清购自Gibco公司;软琼脂购自Sigma公司;细胞凋亡检测试剂盒购自贝博公司;细胞周期检测试剂盒购自杭州联科生物技术股份有限公司;Transwell小室购自BD公司;其他试剂均为国产分析纯。

美国Costar 96孔和6孔细胞培养板;德国Heraeus CO₂细胞培养箱;德国Leica倒置显微镜;美国Bio-Rad酶标仪;美国BD流式细胞仪;日本佳能数码相机。

1.3 细胞培养

人胃癌细胞系AGS细胞接种在含有10%胎牛血清及100 μg/mL链霉素和100 μg/mL青霉素的双抗DMEM培养基中,置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。

1.4 MTT法检测细胞增殖

为研究Cecropin XJ对人胃癌AGS细胞增殖的影响,将收集到的含有5 000个细胞的细胞悬液接种

于96孔板中,培养24 h后分别加入浓度为0, 20, 50, 100 μg/mL的Cecropin XJ处理AGS细胞24, 48, 72, 96, 120 h,阳性对照为10 μg/mL阿霉素(Dox)。小心弃去培养液,每孔加入100 μL MTT和200 μL DMEM培养基,37℃共孵育4 h。每孔加入100 μL DMSO,酶标仪检测 $D_{540/655}$ 值,计算细胞增殖抑制率。每个实验重复3次。计算公式:细胞增殖抑制率(%)=[1-($D_{实验组}-D_{空白组}$)/($D_{对照组}-D_{空白组}$)]×100%。

1.5 软琼脂集落形成实验

将1.5 mL 1.4%琼脂加入到1.5 mL 2×DMEM培养基中(含20% FBS和20%双抗),混匀缓慢沿壁加入到60 mm培养皿中,待凝固形成下层胶。然后将含有1 000个细胞和Cecropin XJ终浓度分别为0, 20, 50, 100 μg/mL的培养液2.2 mL及1.8 mL 0.7%琼脂(1.4%琼脂和2×DMEM培养基等体积混合)混匀,铺于凝固的下层胶上形成上层胶。阳性对照为10 μg/mL阿霉素,室温放置30 min,于37℃、5% CO₂的培养箱中培养。为了维持细胞的存活,每周需补加1~2 mL的上层胶。至第3周,每皿加入300 μL 5%碘硝基四唑紫(indonitro-tetrazolium chloride, INT)染液,37℃孵育过夜,用甲醇:冰乙酸=3:1固定,计算形成的克隆数并拍照。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期

将对数生长期的AGS细胞用无血清DMEM培养基同步化24 h,经浓度分别为0, 20, 50, 100 μg/mL的Cecropin XJ处理24 h,对照组细胞为同样条件下的不加药细胞。收集处理组和对照组细胞,控制密度在 1×10^5 /mL,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,按说明用细胞凋亡试剂盒进行标记、染色,上流式细胞仪进行检测。

对于细胞周期,收集细胞后用预冷的75%乙醇于-20℃固定1 h。离心弃固定液,PBS洗2次后按照细胞周期试剂盒说明进行标记、染色,上流式细胞仪进行检测。

1.7 细胞划痕实验检测Cecropin XJ对AGS细胞迁移的影响

将对数生长期的AGS细胞制成悬液,以 1×10^6 /mL的密度接种于6孔板,待细胞生长至100%汇合后,吸弃培养液,PBS洗涤1次,用无菌200 μL枪头沿培养板底部划一直线形划痕。PBS再次洗去被刮下的未贴壁细胞,实验组加入终浓度为0, 10, 20, 50, 100 μg/mL的Cecropin XJ,对照组加入等量的无血清培养基,培养12, 24 h后,于倒置显微镜下观察细胞伤口愈合情况并拍照。每组检测5个视野,每组3个复孔,实验重

复3次。迁移率(%)=(实验组划痕长度/对照组划痕长度)×100%。

1.8 Transwell侵袭实验检测Cecropin XJ对AGS细胞侵袭的影响

将生长良好并经0, 20, 50, 100 μg/mL Cecropin XJ处理24 h后的AGS细胞用胰酶消化, 用完全培养基洗涤细胞2次, 制备细胞悬液。收集各处理组细胞, 密度 1×10^5 /mL, 取100 μL接种于底部加有人工基底膜的上室, 将小室置于24孔板, 下室加入含10%胎牛血清的DMEM培养基。分别培养24 h后, 用棉签擦掉上室面的Matrigel和细胞, 4%多聚甲醛固定10 min, 1%结晶紫染色0.5 h, 倒置显微镜下随机计数5个视野中的细胞数。侵袭率(%)=(实验组侵袭细胞的数量/对照组侵袭细胞的数量)×100%。

1.9 统计学处理

实验数据均采用GraphPad Prism 5软件统计分析。实验数据以mean±S.D.形式表示, 组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

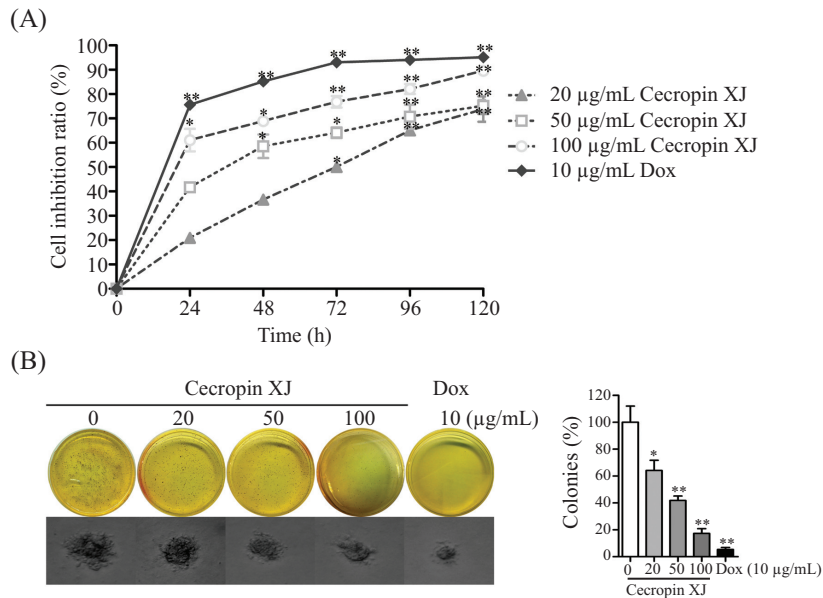
2 结果

2.1 Cecropin XJ抑制AGS细胞的生长与增殖

利用MTT比色法检测Cecropin XJ对人胃癌

AGS细胞增殖的影响, 结果显示, Cecropin XJ对AGS细胞的增殖抑制作用具有剂量和时间依赖性。在作用24 h后, Cecropin XJ能够抑制AGS细胞的生长, 并且随着药物浓度的增加, 抑制作用逐渐增强, 当Cecropin XJ浓度达到100 μg/mL时, 显著抑制AGS细胞的增殖($P < 0.01$)。Cecropin XJ作用于AGS细胞120 h后, 20, 50, 100 μg/mL Cecropin XJ对AGS细胞的增殖抑制率分别为(63.81±9.04)%、(65.13±4.17)%以及(86.55±2.53)%, 均显著抑制AGS细胞的增殖($P < 0.01$), 100 μg/mL Cecropin XJ对AGS细胞增殖的抑制作用与10 μg/mL Dox效果一致(图1A)。可见, Cecropin XJ对人胃癌细胞AGS细胞增殖具有明显的抑制作用, 并呈现时间和剂量依赖性。

软琼脂集落形成实验结果显示, 不加Cecropin XJ处理的AGS细胞形成的集落大而圆, 生长状态良好, 而Cecropin XJ作用之后, 集落生长速度明显减慢, 体积显著减小。除此之外, 通过对长出的集落进行计数, 计算集落形成率。设定不加Cecropin XJ的条件下集落形成率为100%, Cecropin XJ处理组集落形成率分别为(64.19±13.10)%、(41.88±5.68)%以及(18.54±6.21)%, 具有显著差异($P < 0.01$)。从上述结果可知, Cecropin XJ可抑制AGS细胞集落的形成, 说明Cecropin XJ对AGS细胞呈现长时间的抑制增殖作用(图1B)。



A: MTT检测不同浓度CecropinXJ(20, 50, 100 μg/mL)和10 μg/mL Dox处理24, 48, 72, 96, 120 h后AGS细胞的增殖抑制率; B: 软琼脂集落形成实验观察Cecropin XJ作用AGS细胞后集落形成结果。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与对照组(0 μg/mL Cecropin XJ)相比。

A: the inhibition ratio of AGS cells after different concentrations of Cecropin XJ (20, 50, 100 μg/mL) and 10 μg/mL Dox treatment for 24, 48, 72, 96, 120 h were observed by MTT analysis; B: colony formation of AGS cells via Cecropin XJ and Dox treatments was observed by soft agar colony formation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group (0 μg/mL Cecropin XJ).

图1 Cecropin XJ抑制胃癌细胞AGS的生长与增殖

Fig.1 Cecropin XJ inhibited proliferation and growth of AGS cells

2.2 Cecropin XJ促进AGS细胞的凋亡

利用流式细胞仪检测不同浓度Cecropin XJ处理24 h后对AGS细胞凋亡的影响。从图中可以看出,随着Cecropin XJ浓度升高,AGS细胞的凋亡率逐渐上升,加药组与阴性对照组相比有显著性差异($P<0.05$)(表1和图2)。当Cecropin XJ达到100 $\mu\text{g/mL}$ 时,坏死的细胞与对照组具有显著性差异($P<0.05$)。

由此推断,诱导肿瘤细胞发生凋亡可能是Cecropin XJ抗肿瘤作用的重要机制,但高浓度的Cecropin XJ可能会导致细胞膜裂解引起细胞坏死,相关的作用机制需进一步研究。

2.3 Cecropin XJ处理导致AGS细胞细胞周期阻滞在S期

利用流式细胞仪对不同浓度Cecropin XJ处理24 h

表1 不同浓度Cecropin XJ处理AGS细胞24 h后的细胞凋亡率($n=3, \bar{x}\pm s, \%$)

Table 1 Cell apoptosis rates of AGS cells under different concentrations of Cecropin XJ for 24 h ($n=3, \bar{x}\pm s, \%$)

新疆家蚕抗菌肽 Cecropin XJ ($\mu\text{g/mL}$)	活细胞 PI(-)AnnexinV(-)	早期凋亡细胞 PI(-)AnnexinV(+)	晚期凋亡细胞 PI(+AnnexinV(+)	死细胞 PI(+AnnexinV(-)
0	92.73 \pm 0.97	3.35 \pm 0.56	2.77 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
20	85.04 \pm 0.84*	1.41 \pm 0.06	16.43 \pm 3.49*	0.45 \pm 0.1
50	73.00 \pm 2.27*	2.27 \pm 0.02	22.67 \pm 1.28*	0.94 \pm 1.13
100	37.42 \pm 2.27**	15.51 \pm 2.19*	43.94 \pm 4.00**	4.46 \pm 1.18*

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)相比。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group (0 $\mu\text{g/mL}$).

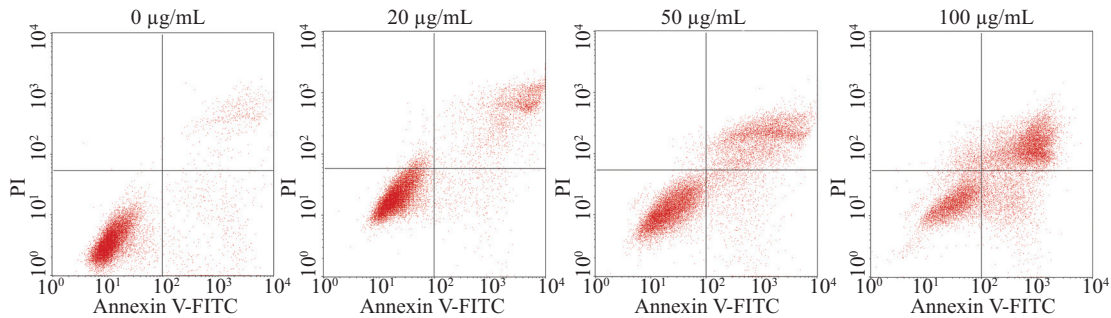
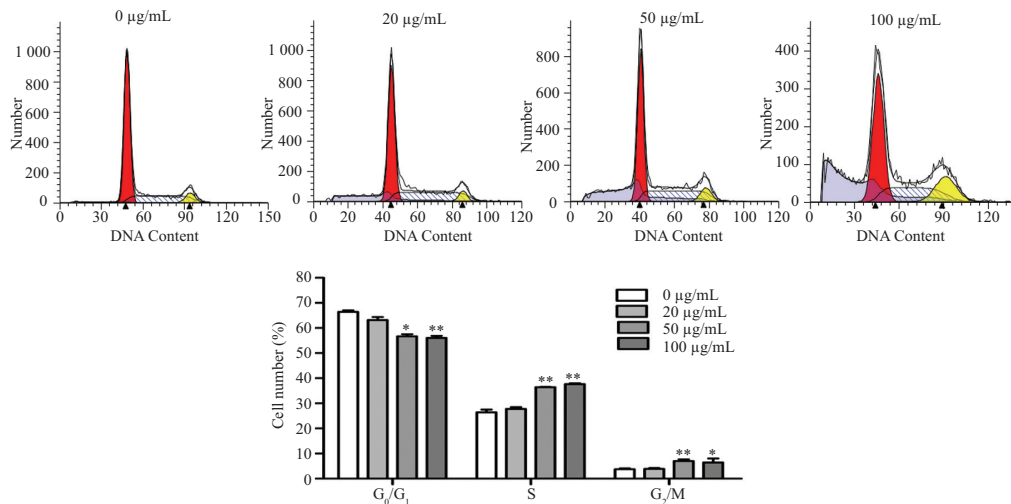


图2 流式细胞术检测不同浓度Cecropin XJ对AGS细胞凋亡的影响

Fig.2 Effect of Cecropin XJ with different concentrations on apoptosis of AGS cells by flow cytometric analysis

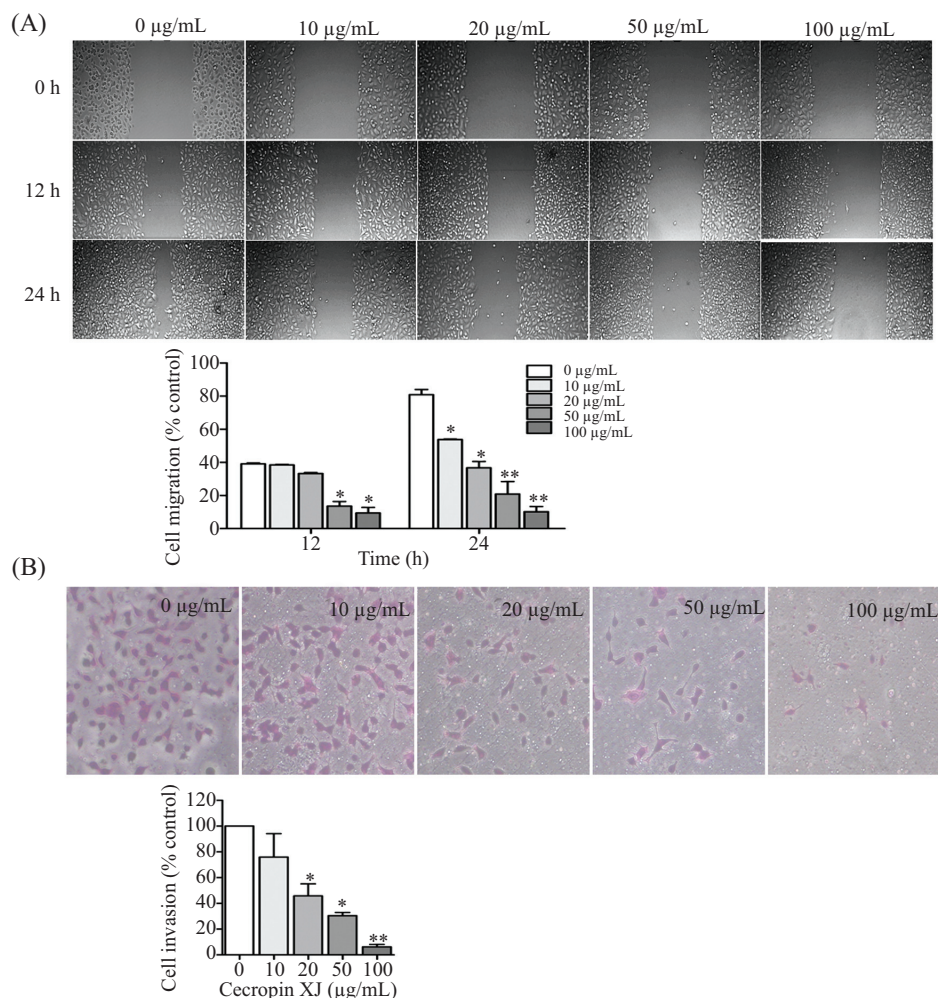


* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组(0 $\mu\text{g/mL}$)相比。

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ compared with control group (0 $\mu\text{g/mL}$).

图3 不同浓度Cecropin XJ对AGS细胞周期的影响

Fig.3 Effect of Cecropin XJ with different concentrations on cell cycle of AGS cells by flow cytometric analysis



A: 细胞划痕实验检测细胞迁移能力; B: Transwell实验检测细胞侵袭能力。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组(0 µg/mL)相比。

A: cell migration was detected by wound-healing assay; B: cell invasion was detected by Transwell assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group (0 µg/mL).

图4 Cecropin XJ对AGS细胞的迁移和侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of Cecropin XJ on migration and invasion of AGS cells by wound-healing assay and Transwell assay

后的AGS细胞进行细胞周期的检测。随着Cecropin XJ浓度的增加, G_1 期细胞减少, S期细胞增加, G_2/M 期细胞数在50和100 µg/mL Cecropin XJ浓度下显著增加, 表明Cecropin XJ可阻滞AGS细胞在S期从而抑制AGS细胞的增殖(图3)。

2.4 Cecropin XJ降低AGS细胞的侵袭与迁移能力

细胞划痕结果显示, 培养AGS细胞12 h和24 h后, AGS细胞分别迁移了(39.14±0.85)%和(80.84±5.52)% (图4A)。而加入50 µg/mL和100 µg/mL Cecropin XJ作用12 h后, 细胞迁移率仅为(13.61±4.81)%和(9.48±5.78)%, 迁移能力明显减弱。当用10 µg/mL和20 µg/mL Cecropin XJ细胞24 h时, 细胞迁移受到显著抑制($P < 0.05$), 说明Cecropin XJ对AGS细胞迁移的抑制呈浓度和时间依赖的方式。

经不同浓度Cecropin XJ处理AGS细胞24 h后, 各处理组均收集 1×10^4 细胞进行Transwell实验。实验结果显示, 20 µg/mL Cecropin XJ对AGS的侵袭能力有显著的抑制作用($P < 0.05$), 并且这种作用呈浓度依赖(图4B)。当Cecropin XJ浓度达到100 µg/mL时, AGS细胞的侵袭率仅为6.2%。上述结果表明, Cecropin XJ抑制AGS细胞的侵袭作用随浓度增加而愈明显。

3 讨论

抗癌化疗药物杀伤癌细胞的同时也会攻击正常细胞, 因此, 化疗引起严重的不良反应甚至威胁生命。为了寻找更新、更安全的化疗药物或化疗辅助药物, 肿瘤学家开始广泛关注天然产物, 它们不仅克

服了传统抗癌药物的缺陷, 而且对肿瘤细胞具有天然的抗增殖作用。抗菌肽具有强烈的抗肿瘤活性, 可通过膜裂解或促进细胞凋亡或阻滞细胞周期等抑制肿瘤细胞的增殖^[10], 成为潜在的化疗辅助药物。

研究证明, 家蚕抗菌肽(Cecropin XJ)不仅有效杀灭细菌, 对许多肿瘤细胞也具有抑制作用。Moore等^[11]首次发现, Cecropin B对哺乳动物的肿瘤细胞具有抗肿瘤活性, 如白血病^[12]、乳腺癌^[13]和膀胱癌^[14]等, 并呈时间和浓度依赖。但对胃癌的抗肿瘤活性研究还很少, 目前大多数都是针对幽门螺旋杆菌来源的Cecropin类似物进行对胃癌的抗肿瘤作用的研究^[15]。本课题组已有研究(未发表)表明, Cecropin XJ在一定作用浓度范围内对正常胃上皮细胞系GES-1的增殖几乎没有影响, 而对胃癌细胞系BGC823、SGC7901、AGS均有显著的抑制增殖作用($P < 0.05$), 其中, AGS细胞对Cecropin XJ最为敏感。因此, 本实验通过MTT实验检测Cecropin XJ对敏感株人胃癌细胞AGS生长增殖的影响。结果显示, Cecropin XJ在体外能显著抑制AGS细胞的生长和增殖, 而且这种抑制作用具有浓度和时间依赖性。同时, 软琼脂集落形成实验的结果显示, Cecropin XJ使其集落形成的能力显著降低, 表示Cecropin XJ能够长期抑制AGS细胞的增殖和生长。

大多数的抗癌药物均是通过促进细胞凋亡达到抗肿瘤的功^[16], Cecropin对多种肿瘤细胞具有诱导凋亡的作用, 说明诱导细胞凋亡可能为Cecropin抑制细胞增殖的机制之一。先前的研究报道了低浓度的抗菌肽也许是通过细胞内Ca²⁺、自由基和caspase-3的信号通路促进K562细胞的凋亡, 而高浓度的抗菌肽通过膜裂解的机制促使细胞死亡^[17]。本实验运用流式细胞仪测定细胞凋亡, 结果显示, Cecropin XJ在20 μg/mL时AGS细胞凋亡率就已达到16%, 在100 μg/mL时坏死的细胞显著增加, 说明低浓度的Cecropin XJ促进胃癌细胞的凋亡, 在高浓度下可导致细胞的死亡。Wang等^[18]的研究表明, 抗菌肽temporin-1CEa在高浓度下可直接裂解乳腺癌细胞的细胞膜, 细胞膜被破坏后导致磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻以及细胞内物质向外释放进而导致细胞死亡。这可能也是Cecropin XJ的抗肿瘤机制之一, 但需要进一步验证。

细胞周期停滞在S期说明细胞DNA合成受抑制或DNA损伤未得到修复使得细胞不能进行分裂^[19]。

我们的结果表明, Cecropin XJ浓度依赖地使AGS细胞周期停滞在S期, 因此阻碍了细胞进入分裂期。已有研究表明, 抗菌肽可以通过与细胞的DNA相结合或抑制DNA聚合酶的活性从而抑制细胞DNA的合成^[20-21]。然而, 更多的文献报道了抗菌肽诱导细胞周期停滞在G₁/S期^[22], 虽然停滞的细胞周期在不同时期, 但Cecropin XJ依然显示了强烈的抑制增殖作用。这表明Cecropin XJ可能通过阻滞细胞周期促进细胞凋亡、抑制细胞增殖, 具体涉及到的相关调控因子还有待研究。

肿瘤细胞的侵袭、转移是恶性肿瘤生物学行为的主要特征, 是恶性肿瘤难治愈和引起肿瘤患者治疗失败甚至死亡的主要原因之一^[23]。Tian等^[24]的研究发现, 抗菌肽RP39可抑制乳腺癌细胞的侵袭和转移。蜂毒素(Melittin)可以通过抑制MMP-9的表达和FAK的磷酸化抑制乳腺癌MDA-MB-231和MCF-7的转移^[25]。本研究中, 不同浓度的Cecropin XJ处理AGS细胞24 h后, 可有效地抑制AGS细胞的迁移和侵袭能力, 且这种作用呈浓度依赖的方式。

本研究采用MTT法和流式细胞术等手段检测了Cecropin XJ对人胃癌细胞AGS增殖的抑制作用及诱导凋亡作用。结果表明, Cecropin XJ抑制AGS细胞的生长和增殖, 阻滞细胞周期的进程并促进细胞凋亡, 降低细胞侵袭和迁移的能力, 说明Cecropin XJ能够较为全面地影响AGS细胞的生长, 这为开发Cecropin XJ成为抗肿瘤药物提供了理论基础和实验依据。

参考文献 (References)

- 1 Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
- 2 Maruyama K, Gunvén P, Okabayashi K, Sasako M, Kinoshita T. Lymph node metastases of gastric cancer. General pattern in 1931 patients. *Ann Surg* 1989; 210(5): 596-602.
- 3 Kelsen D, Vande Velde C, Minsky B. Gastric cancer: Clinical management. In: Kelsen D, Daly JM, Kern SE, eds. *Gastrointestinal Oncology*. PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 408-16.
- 4 Murad AM, Santiago FF, Petroianu A, Rocha PR, Rodrigues MA, Rausch M. Modified therapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and methotrexate in advanced gastric cancer. *Cancer* 1993; 72(1): 37-41.
- 5 Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukocyte Bio* 2004; 75(1): 39-48.
- 6 李金耀, 张富春, 马正海. 家蚕天蚕素cDNA原核表达及抗菌活性检测. *昆虫学报*(Li Jinyao, Zhang Fuchun, Ma Zhenghai. Prokaryotic expression of cecropin gene isolated from the silkworm *Bombyx mori* Xinjiang race and antibacterial activity of

- fusion cecropin. *Acta Entomologica Sinica* 2004; 47(3): 407-11.
- 7 刘忠渊, 张富春, 蔡伦, 赵干, 王宾. 酵母菌中表达的新疆家蚕抗菌肽(Cecropin XJ)的特性研究. *微生物学报*(Liu Zhongyuan, Zhang Fuchun, Cai Lun, Zhao Gan, Wang Bin. Studies on the properties of Cecropin-XJ expressed in yeast from Xinjiang Silkworm. *Acta Microbiolgy Sinica* 2003; 43(5): 635-41.
- 8 Xia LJ, Zhang FC, Liu ZY, Ma J, Yang JH. Expression and characterization of cecropinXJ, a bioactive antimicrobial peptide from *Bombyx mori* (Bombycidae, Lepidoptera) in *Escherichia coli*. *Exp Ther Med* 2013; 5(6): 1745-51.
- 9 Xia L, Liu Z, Ma J, Sun S, Yang J, Zhang F. Expression, purification and characterization of cecropin antibacterial peptide from *Bombyx mori* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 2013; 90(1): 47-54.
- 10 Hoskin DW, Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(2): 357-75.
- 11 Moore AJ, Devine DA, Bibby MC. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Pept Res* 1994; 7(5): 265-9.
- 12 José MC, Judit CM, Elena P, Gerardo AC, Maria AP, Manuel AP. The antimicrobial peptide cecropin A induces caspase-independent cell death in human promyelocytic leukemia cells. *Peptides* 2010; 31(8): 1494-503.
- 13 Zang G, Thomas A, Liu Z, Chen D, Ling H. Preventing breast cancer growth by cationic Cecropin B. *Biol Syst* 2013; 2(3): 112.
- 14 Suttman H, Retz M, Paulsen F, Harder J, Zwergel U, Kamradt J, et al. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urol* 2008; 8(5): 1-7.
- 15 Bylund J, Christophe T, Boulay F, Nystrom T, Karlsson A, Dahlgren C. Proinflammatory activity of a cecropin-like antibacterial peptide from *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(6): 1700-4.
- 16 Hu W, Kavanagh JJ. Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway. *Lancet Oncol* 2003; 4(12): 721-9.
- 17 Paredes-Gamero EJ, Martins MN, Cappabianco FA, Ide JS, Miranda A. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: Regulated cell death or membrane disruption. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820(7): 1062-72.
- 18 Wang C, Zhou Y, Li S, Li HB, Tian LL, Wang H, et al. Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic α -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells. *Life Sci* 2013; 92(20/21): 1004-14.
- 19 Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(10): 792-804.
- 20 Ourth DD. Antitumor cell activity *in vitro* by myristoylated-peptide. *Biomed Pharmacother* 2011; 65(4): 217-27.
- 21 Kuriyama I, Miyazaki A, Tsuda Y, Yoshida H, Mizushima Y. Inhibitory effect of novel somatostatin peptide analogues on human cancer cell growth based on the selective inhibition of DNA polymerase β . *Bioorg Med Chem* 2013; 21(2): 403-11.
- 22 Su L, Xu G, Shen J, Tao Y, Zhang X, Jia S, et al. Anticancer bioactive peptide suppresses human gastric cancer growth through modulation of apoptosis and the cell cycle. *Oncol Rep* 2010; 23(1): 3-9.
- 23 Chen W, Wang X, Zhuang J, Zhang L, Lin Y. Induction of death receptor 5 and suppression of survivin contribute to sensitization of TRAIL-induced cytotoxicity by quercetin in non-small cell lung cancer cells. *Carcinogenesis* 2007; 28(10): 2114-21.
- 24 Tian W, Li B, Zhang X, Dang W, Wang X, Tang H, et al. Suppression of tumor invasion and migration in breast cancer cells following delivery of siRNA against Stat3 with the antimicrobial peptide PR39. *Oncol Rep* 2012; 28(4): 1362-8.
- 25 Jeong YJ, Choi Y, Shin JM, Cho HJ, Kang JH, Park KK, et al. Melittin suppresses EGF-induced cell motility and invasion by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* 2014; 68: 218-25.