

人工合成抗菌肽对口腔肿瘤细胞增殖、侵袭抑制及促凋亡作用

李茵, 温颖, 郑东翔

(首都医科大学附属北京口腔医院,北京市全牙再生与口腔组织功能重建重点实验室,北京 100050)

摘要: [目的] 体外观察不同浓度的人工合成抗菌肽(artificial antimicrobial peptides, AMPs)对口腔肿瘤细胞系的增殖、侵袭抑制及促凋亡作用。[方法] 合成 AMPs 并配置溶液,将 AMPs 溶液(50 μ g/ml~200 μ g/ml)加至肿瘤细胞培养体系中,收获培养后细胞以流式细胞分析法(Annexin-V/PI 染色)进行细胞凋亡检测,并通过 BrdU 掺入实验以及 MTS 法进行细胞增殖检测。通过细胞迁移以及侵袭实验评价 AMPs 对口腔肿瘤细胞系迁移及侵袭能力的影响。[结果] AMPs 可诱导口腔肿瘤细胞系 SACC-83 及 Tca8113 凋亡。在 AMPs 200 μ mol/L 浓度,中晚期凋亡比率分别为 (33.89 $\pm$ 16.74)%、(32.47 $\pm$ 13.53)%,高于 PBS 对照组的中晚期凋亡比率(4.34 $\pm$ 1.08)%和(5.76 $\pm$ 1.43)%(P 均 <0.05),同时 AMPs 对肿瘤细胞促凋亡作用的效果与其浓度呈剂量依赖特点。BrdU 掺入实验及 MTS 法发现 AMPs 可显著性抑制口腔肿瘤细胞系 SACC-83 及 Tca8113 的细胞增殖,当 AMPs 浓度为 50 μ mol/L 时对人口腔肿瘤细胞系 SACC-83 和 Tca8113 细胞增殖活性有明显的抑制作用,AMPs 对人口腔肿瘤细胞系 SACC-83 和 Tca8113 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 分别为 60.38 μ M 和 55.35 μ M。低浓度(50 μ mol/L)AMPs 还可显著性抑制 SACC-83 和 Tca8113 细胞的迁移以及侵袭。[结论] AMPs 体外对口腔肿瘤细胞系 SACC-83 及 Tca8113 有明显的促进凋亡作用,并抑制肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭。

关键词: 人工合成抗菌肽;口腔肿瘤细胞系;细胞凋亡;细胞增殖;迁移;侵袭

中图分类号:R739.8

文献标识码:A

文章编号:1004-0242(2013)06-0466-07

Effect of Artificial Antimicrobial Peptides on Proliferation, Metastasis and Apoptosis in Oral Tumor Cell Lines

LI Yin, WEN Ying, ZHENG Dong-xiang

(Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of Tooth Regeneration and Function Reconstruction, Beijing 100050, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of artificial antimicrobial peptides (AMPs) on proliferation, invasion, metastasis and apoptosis in oral tumor cell line in vitro. [Methods] Synthesis AMPs and dissolving the AMPs into PBS. The solution of AMPs (50 μ g/ml~200 μ g/ml) was added to the tumor cell culture system. The tumor cells apoptosis was detected by flow cytometry analysis method (Annexin-V/PI staining), and proliferation was examined by BrdU and MTS. Transwell migration assay and invasion assay were used to assess the ability of oral tumor cells migration and invasion treated by AMPs. [Results] The AMPs could induce the oral tumor cells apoptosis. In the concentration of AMPs 200 μ mol/L, the percent of late stage apoptosis in oral tumor cells SACC-83 and Tca8113 were (33.89 $\pm$ 16.74)% and (32.47 $\pm$ 13.53)% respectively, which was significantly higher than those in PBS control group [(4.34 $\pm$ 1.08)% and (5.76 $\pm$ 1.43)%] ($P<0.05$). While the effect of AMPs on inducing apoptosis of tumor cells showed dose-effect with the AMPs concentration. Evaluating by BrdU incorporation assay and the MTS proliferation assay, AMPs also inhibited the proliferation in oral tumor cell lines (SACC-83 and Tca8113). When the AMPs concentration of 50 μ mol/L, the human oral tumor cell lines SACC-83 Tca8113 cell proliferation was inhibited significantly. The cell proliferation IC_{50} of AMPs on human oral cancer cell lines SACC-83 and Tca8113 were 60.38 μ M and 55.35 μ M respectively. The low concentration of AMPs (50 μ mol/L) also significantly inhibited the migration and invasion in SACC-83 and Tca8113 cell. [Conclusions] The AMPs can significantly induce the apoptosis, and effectively inhibit the proliferation, invasion and metastasis of oral tumor cell lines SACC-83 and Tca8113 in vitro.

Key words: artificial antimicrobial peptides; oral tumor cell lines; proliferation; apoptosis; invasion; metastasis

抗菌肽(antimicrobial peptides)是一类具有较广

抗菌作用的多肽,近年来作为新的有潜力的抗微生物药物,已引起众多学者关注。目前研究表明抗菌肽具有的共同特征是:分子量小、热稳定性强、水溶性

收稿日期:2013-01-21;修回日期:2013-04-23

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(7123214)

通讯作者:郑东翔, E-mail: zhengdongxiang_01@163.com

好、无免疫原性、无强碱性、抗菌谱广等^[1,2]。对于抗菌肽的研究已进入人工合成阶段,研究认为筛选出的人工合成抗菌肽(artificial antimicrobial peptides, AMPs)相比提取的天然抗菌肽具有更高效广谱的抗菌活性^[3]。我们在前期的研究中发现了两段具有广谱抑菌作用的人工合成抗菌肽。最近研究表明抗菌肽不仅可作用于细菌和真菌,对肿瘤细胞和一些原虫也有作用^[4],而且发现了几乎可作用于包括细菌、真菌、病毒、原虫等在内的所有病原体及自身变异细胞的抗菌肽^[4]。本研究将已发现的 AMPs 体外作用于口腔肿瘤细胞系 SACC-83 及 Tca8113,观察人工合成抗菌肽对上述肿瘤细胞增殖及凋亡方面的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用人工合成抗菌肽是通过化学合成法合成,序列为 KLAKKLA 合成由上海生物工程技术服务有限公司完成,多肽合成纯度大于 95%。RPMI 1640 培养基及胎牛血清为美国 Gibco 公司产品。6 孔培养板为丹麦 NUNC 公司产品。ANNEXIN/PI 双染试剂购自北京宝赛公司。5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-Bromo-2'-deoxy-uridine, BrdU)细胞增殖试剂盒购自瑞士罗氏公司。人口腔鳞状细胞癌 KB、人涎腺腺样囊性癌细胞系 SACC-83 和人舌鳞状细胞癌细胞系 Tca8113,由北京口腔医院研究所提供。以上细胞均在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下,培养于含 100ml/L 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。淋巴细胞为实验室冻存,来自健康对照志愿者。流式细胞仪为美国 BD 公司产品 (FACS Calibur; Becton Dickinson 公司,美国),分析软件采用 Flowjo 5.0 (Treestar 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 AMPs 溶液配制

称取 AMPs 冻干粉,将其溶于二甲基亚砜中后再用 PBS 进行稀释,制备不同浓度的 AMPs 溶液;同时以 PBS 稀释同体积的二甲基亚砜作为对照。

1.2.2 细胞系培养

口腔肿瘤细胞系 KB、SACC-83 和 Tca8113 采用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基进行培养。在

细胞传代 24h 后,将不同浓度的 AMPs 溶液加至细胞培养体系中,使抗菌肽的终浓度分别在 25、50、100、200 和 400 μmol/L。以 PBS 稀释同体积的二甲基亚砜作为阴性对照。在细胞系加入 AMPs 后进行培养,收获细胞分别进行细胞凋亡检测及细胞增殖检测。

1.2.3 Annexin-V/PI 标记及细胞凋亡检测

在培养细胞系中加入 AMPs 后,培养 48h 后收获细胞。取 2×10^6 肿瘤细胞及健康人淋巴细胞(作为对照)离心后加入 200 μl binding buffer,并加入 5 μl Annexin-V 室温共孵育 15min 及 PI 抗体室温共孵育 5min。以流式细胞仪双色分别分析早期凋亡(Annexin-V 单阳性细胞)及中晚期凋亡细胞(Annexin-V、PI 双阳性细胞)占总细胞比例。在细胞凋亡早期磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)可从细胞膜的内侧翻转到细胞膜的表面,暴露在细胞外环境中。Annexin-V 是一种分子量为 35~36KD 的 Ca²⁺依赖性磷脂结合蛋白,能与 PS 高亲和力和特异性结合。将 Annexin-V 进行荧光素(FITC、PE)或 Biotin 标记,以标记了的 Annexin-V 作为荧光探针,利用流式细胞仪或荧光显微镜可检测细胞早期凋亡的发生。碘化丙啶(propidium iodide, PI)作为一种核酸染料,不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死亡细胞中,PI 能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将 Annexin-V 与 PI 匹配使用就可以将凋亡早晚期的细胞以及死细胞区分开来。上述凋亡检测重复 3 次。

1.2.4 MTS 实验检测 AMPs 对口腔肿瘤细胞的半数抑制浓度

消化单层培养的肿瘤细胞,用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基制成 2.5×10^4 /ml 的单细胞悬液,按 5×10^3 个细胞 200 μl/孔接种 96 孔细胞培养板。根据 1.2.3 中 AMPs 对口腔肿瘤细胞凋亡作用的结果设定 10 个 AMPs 浓度(0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6、51.2 和 102.4 μmol/L),每组设 3 个平行孔。培养 24h 后,弃去原有培养基,分别加入不同浓度的 AMPs 后培养基孵育,每 2d 换液 1 次。培养 8 d 后,每孔 100 μl 培养基加 20 μl CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (室温静止 90min,完全溶解),在 37℃、5% CO₂ 的环境下孵育 1h。在酶标仪 490nm 波长下测定各孔吸光度值。以浓度为横坐标,吸光值为纵坐标绘制细胞生长曲线,软件计算

AMPs 的半数抑制浓度 (50% inhibitory concentration, IC_{50})。

1.2.5 BrdU 掺入实验检测肿瘤细胞增殖

培养肿瘤细胞系中加入半数抑制浓度 AMPs 后共培养 96h, 在培养结束前 12h 加入 BrdU (终浓度 $10\mu\text{M}$) 共同培养 12h 后, 终止反应, 显色, 在酶标仪 450nm 波长下读数, 计算细胞增殖指数。增殖指数 = (刺激孔 OD - 对照孔 OD) / 对照孔 OD。

1.2.6 肿瘤细胞迁移及侵袭实验

Transwell® 迁移实验试验流程: 先将 Transwell 小室平衡至室温; 准备细胞悬液, 将细胞准备好后, 以 $5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 的浓度重新悬浮于无血清培养基中, AMPs 组在细胞培养中加入终浓度为 $50\mu\text{M}$ 的 AMPs, 对照组加入 PBS 组; 将上述细胞悬液 ($150\mu\text{l}$) 加入侵袭小室, 尽量让细胞均匀地铺在小室内侧底面。同时在外围小室中加入含 10% FBS 的 $500\mu\text{l}$ 培养基, 在孵箱中培养 12 h 后, 取出小室; 用湿棉签反复、轻柔、全面地擦去小室内侧底面的贴壁细胞, 应避免用力过大导致膜底面变形影响后续镜下观察, 同时应注意避免擦碰小室外侧底面的贴壁细胞; 将小室放入含 $300\mu\text{l}$ 结晶紫染色液的下室, 室温染色 20 min 后, 转移至其他含 $500\mu\text{l}$ PBS 的下室, 逐孔充分漂洗直至漂洗液澄清; 风干后置相差显微镜下观察、拍照、计数。

细胞侵袭实验: 使用美国 Millipore 公司的 QCMTM Cell Invasion Assay (ECM550) 细胞侵袭检测试剂盒。平衡 Invasion 小室及实验用品至室温, 以 $2.5 \times 10^5 \text{ cells/ml}$ 的浓度重新悬浮于无血清培养基中, AMPs 组在细胞培养中加入终浓度为 $50\mu\text{M}$ 的 AMPs, 对照组加入 PBS 组; 将上述细胞悬液 ($300\mu\text{l}$) 加入侵袭小室, 尽量让细胞均匀地铺在小室内侧底面。同时在外围小室中加入含 10% FBS 的 $500\mu\text{l}$ 培养基, 在孵箱中培养 48h 后, 取出小室; 用湿棉签反复、轻柔、全面地擦去小室内侧底面的贴壁细胞, 应避免用力过大导致膜底面变形影响后续镜下观察, 同时应注意避免擦碰小室外侧底面的贴壁细胞; 将小室放入含

$300\mu\text{l}$ 结晶紫染色液的下室, 室温染色 20 min 后, 转移至其他含 $500\mu\text{l}$ PBS 的下室, 逐孔充分漂洗直至漂洗液澄清; 风干后置相差显微镜下观察、拍照、计数。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 软件以及 Graphpad Prism 5.0 (Graphpad 公司, 美国) 进行数据统计分析, 多组间采用 F 分析, 两组间比较采用双侧 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度下 AMPs 对口腔肿瘤细胞系凋亡作用

将人工合成的抗菌肽作用于人口腔肿瘤细胞系 SACC-83 和 Tca8113 时, 发现 AMPs 对人口腔肿瘤细胞系有明显的促进肿瘤细胞凋亡的作用 (Figure 1), 并在一定程度上呈剂量依赖的特点。在 AMPs 低浓度时 ($25\mu\text{mol/L}$), 有约 5%~8% 口腔肿瘤细胞系出现早期凋亡, 当抗菌肽作用浓度在 $50\mu\text{mol/L}$ 时人口腔

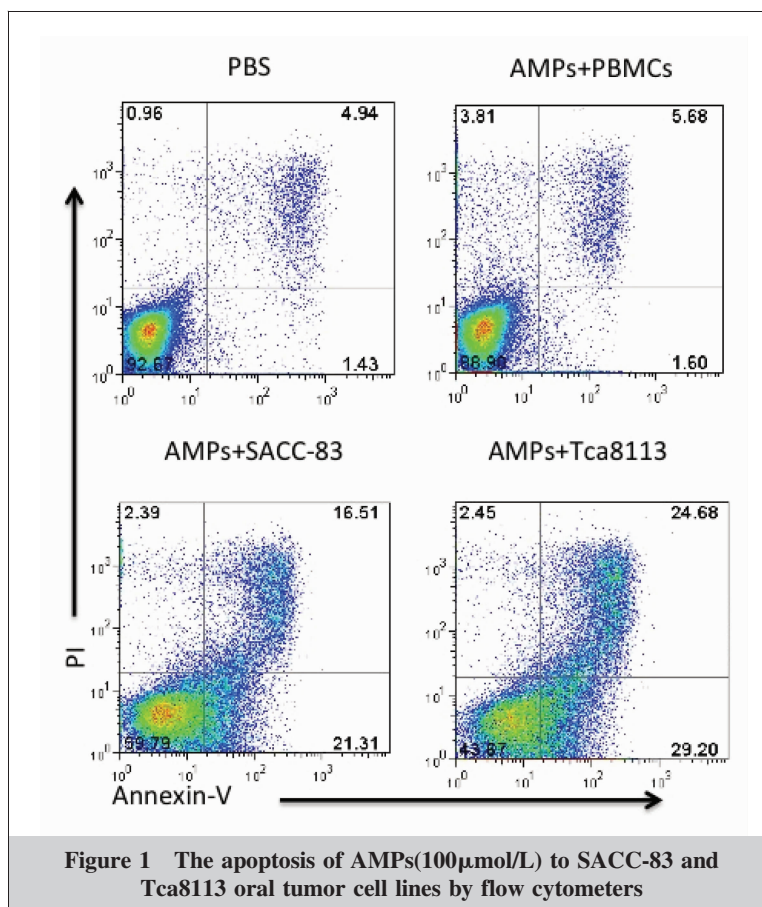


Table 1 The percentage of apoptosis induced by different concentrations of AMPs to oral tumor cell lines(%)

	SACC-83		Tca8113		PBMCS	
	Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis	Early apoptosis	Late apoptosis
PBS	1.44±0.28	4.34±1.08	1.51±0.11	5.76±1.43	0.89±0.33	3.43±1.24
AMPs(μmol/L)						
25	5.86±1.43	2.74±1.79	6.54±2.98	5.64±4.06	1.02±0.45	3.41±0.65
50	15.98±5.86*	12.98±2.79*	13.99±4.79*	8.98±3.97*	1.65±0.86	5.64±2.78
100	21.87±9.33*	18.52±6.32*	31.21±7.29*	28.69±11.53*	1.51±0.11	8.61±3.54*
200	28.43±14.37*	33.89±16.74*	41.76±12.9*	32.47±13.53*	4.64±2.09*	7.07±5.12*
400	23.89±11.78*	48.56±15.87*	28.69±24.8*	36.97±17.75*	3.78±3.28*	12.97±3.67*

* :A statistically significant difference compared with control group (PBS group), $P<0.05$.

肿瘤细胞系时, 约有 10%~20% 细胞出现早期凋亡 (Annexin-V 阳性细胞群); 而当抗菌肽作用浓度达到 100 μmol/L 以上时, 口腔肿瘤细胞系则均出现明显的凋亡 (其凋亡率可达 50% 以上) (Figure 1, Table 1)。当抗菌肽作用浓度达到 200 μmol/L 以上时, 口腔肿瘤细胞系细胞均出现明显凋亡, 其中 SACC-83 和 Tca8113 中晚期的凋亡率 (Annexin-V/PI 双阳性细胞群) 分别达到 (33.89±16.74)%、(32.47±13.53)%, 与阴性对照组的中晚期凋亡比率 [(4.34±1.08)% 和 (5.76±1.43)%] 相比差异有统计学意义 (P 值分别为 0.0023 和 0.0019)。同时研究发现, AMPs 对来自正常人的淋巴细胞无显著性促进凋亡的作用。

2.2 AMPs 对口腔肿瘤细胞增殖的影响

以药物处理细胞 8d 后, 当 AMPs 浓度为 50 μmol/L 时对口腔肿瘤细胞系 SACC-83 和 Tca8113 细胞增殖活性有明

显的抑制作用, 而在低于 10 μmol/L 剂量的其他组未见明显抑制作用, 其抑制作用呈剂量相关性 (Figure 2)。通过量效曲线得出 AMPs 对人口腔肿瘤细胞系 SACC-83 和 Tca8113 细胞增殖抑制作用的 IC_{50} 分别

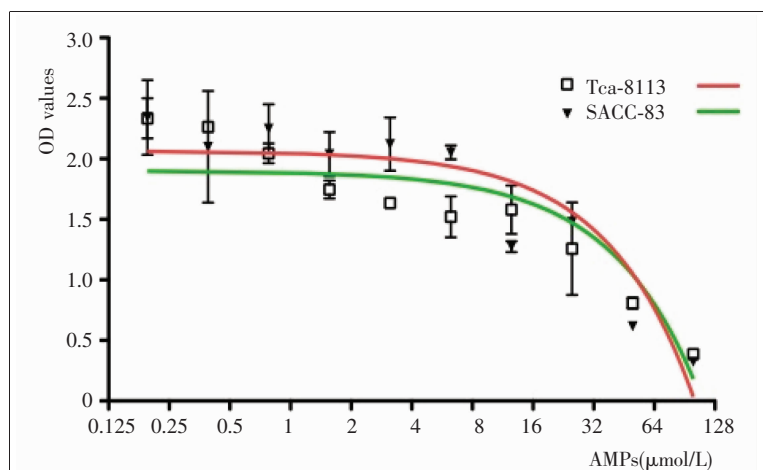


Figure 2 The proliferative effect of different concentrations of AMPs in oral tumor cell lines

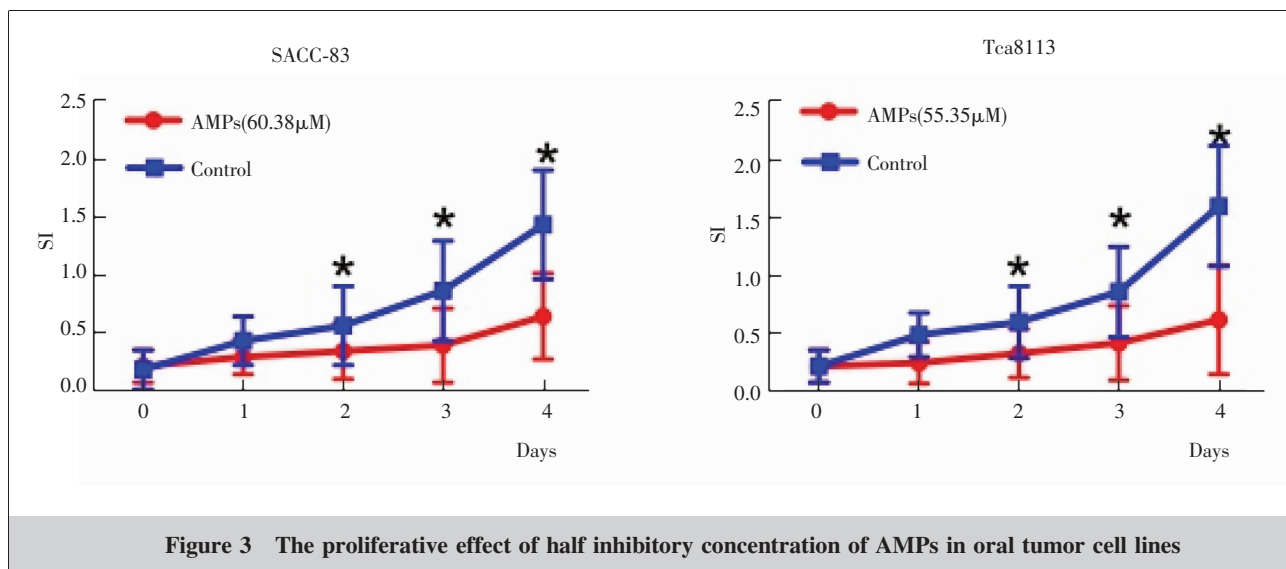


Figure 3 The proliferative effect of half inhibitory concentration of AMPs in oral tumor cell lines

为 $60.38\mu\text{M}$ 和 $55.35\mu\text{M}$ 。

对于半数抑制浓度下 AMPs 作用口腔肿瘤细胞系后不同时间点对肿瘤细胞增殖影响分析发现, AMPs 作用肿瘤细胞系 2d 后与对照组相比, 肿瘤细胞的增殖开始出现显著性抑制(Figure 3)。以 SACC-83 为例, 肿瘤细胞体外培养 2d 时, AMPs 作用组增殖指数为 0.37 ± 0.24 , 对照组增殖指数为 0.59 ± 0.34 ($P=0.0121$); 肿瘤细胞体外培养 3d 时, AMPs 作用组增殖指数为 0.42 ± 0.32 , 对照组增殖指数为 0.89 ± 0.43 ($P=0.0043$); 肿瘤细胞体外培养 4d 时, AMPs 作用组增殖指数为 0.67 ± 0.37 , 对照组增殖指数为 1.46 ± 0.47 ($P=0.0008$)。

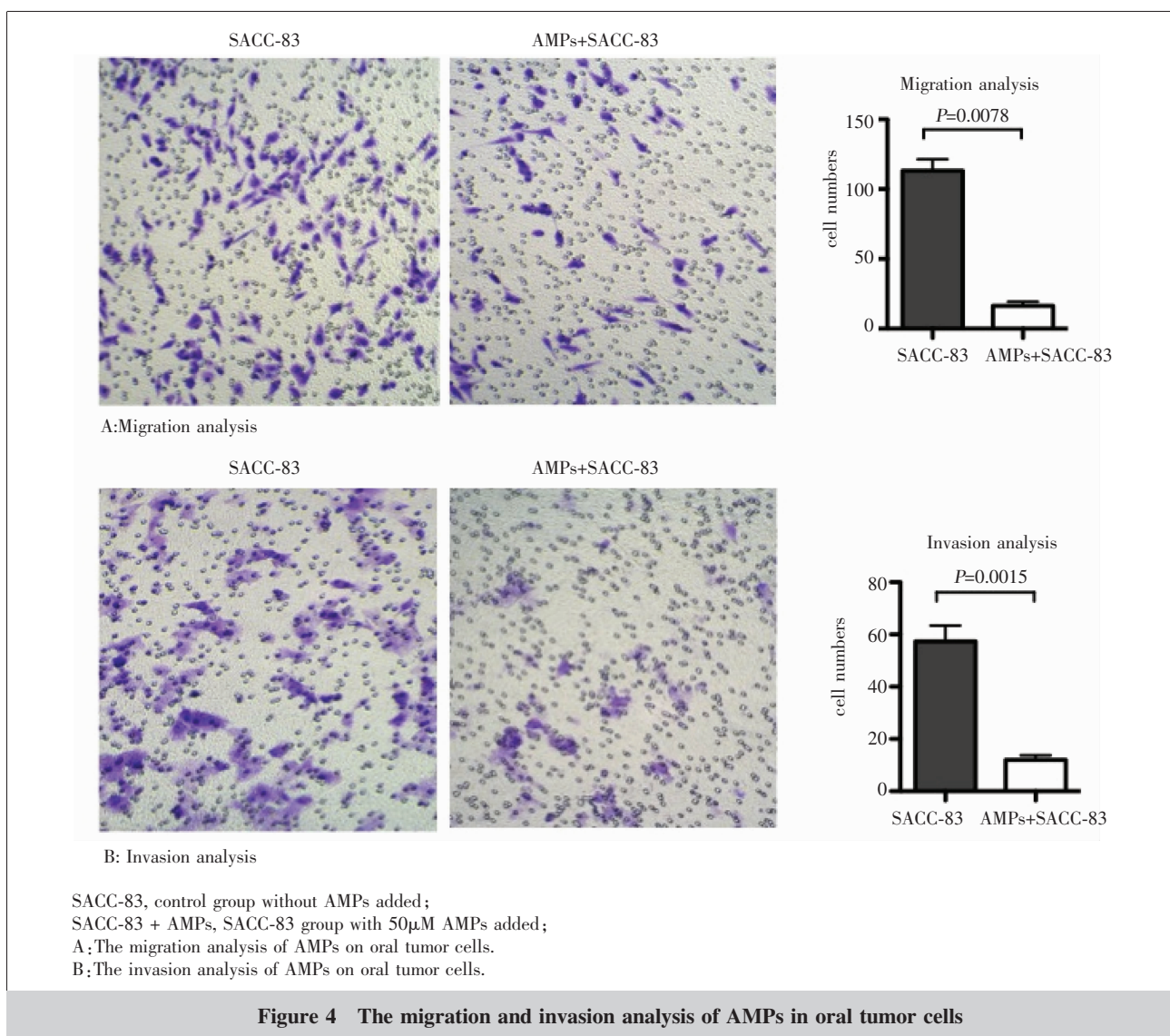
2.3 AMPs 对口腔肿瘤细胞迁移及侵袭作用的影响

根据研究结果所确定的 AMPs 对口腔肿瘤细胞

系凋亡及增殖作用浓度, 我们选择对口腔肿瘤细胞系仅有较低促凋亡以及抑制增殖的浓度 $50\mu\text{mol/L}$ 进行 AMPs 对口腔肿瘤细胞迁移及侵袭作用的影响的评价。研究结果发现, AMPs 作用于口腔肿瘤细胞 SACC-83 细胞后可显著性降低肿瘤细胞的迁移能力(Figure 4A)。同时, AMPs 对口腔肿瘤细胞 SACC-83 的作用还可显著性降低肿瘤细胞的侵袭能力(Figure 4B)。

3 讨论

近年国内外的有关抗菌肽研究发现其不仅可以抑制细菌、真菌等微生物, 还有很强的抗肿瘤活性^[5,6]。目前相关研究主要围绕生物体产生的天然抗



菌肽展开,该类抗菌肽的应用不仅受到来源的限制,也受到免疫安全性等诸多问题的困扰^[7-13],与天然抗菌肽相比,通过化学合成的人工合成抗菌肽具有可大量生产及更高效、广谱的抗菌活性的优势。在前期研究中已证实本实验中使用的合成抗菌肽可显著性抑制口腔常见感染菌^[14],但对于口腔肿瘤细胞是否也存在杀伤以及抑制增殖的作用尚不明确。

本研究着重探讨了 AMPs 体外对口腔肿瘤细胞系的作用,初步发现 AMPs 作用于人口腔肿瘤细胞系 SACC-83 及 Tca8113 时,与对照组相比中晚期凋亡比率差异具有统计学意义($P<0.05$),AMPs 对上述口腔肿瘤细胞系有明显的促凋亡作用,并在一定程度上呈剂量依赖性。本研究也进一步证实 AMPs 可显著性抑制口腔肿瘤细胞的增殖,并且对细胞增殖的抑制能力与 AMPs 的浓度也呈量效依赖的特点。同时 AMPs 对健康人淋巴细胞的凋亡和增殖没有明显影响作用,具备一定的生物安全性。

对于抗菌肽抑杀肿瘤细胞机制的探讨是目前研究的热点,与杀菌机制不尽相同,抗菌肽抑杀肿瘤细胞机制比杀菌机制更为复杂。一方面,它直接接触性抑杀肿瘤细胞,主要从细胞膜、线粒体、核膜、细胞核染色体和细胞骨架等方面来达到抑杀肿瘤细胞的效果。除了对癌细胞的膜损伤外,还可能诱导核染色体 DNA 断裂,并抑制染色体 DNA 的合成,细胞骨架也受到一定程度的损伤。目前对于天然抗菌肽作用于肿瘤细胞的机制研究初步认为,天然抗菌肽可能主要通过破坏肿瘤细胞内部结构发挥作用^[15,16]。另一方面,抗菌肽还可以通过抑制 MAPK/ERK 以及 PI3K 通路促进肿瘤细胞凋亡或调动机体免疫机能,从体液免疫方面来抵抗癌细胞的入侵^[17-20]。我们的研究发现人工合成抗菌肽可显著性抑制口腔肿瘤细胞增殖,诱导口腔肿瘤细胞系凋亡,而对人体正常细胞(如外周血单个核细胞)则无上述效应。推测该作用机制可能类似于抗菌肽作用于细菌的作用机制,主要通过阳离子肽的作用在肿瘤细胞膜表面产生空洞,进而影响细胞活性。

本研究除发现 AMPs 可直接抑制口腔肿瘤细胞增殖以及促进肿瘤细胞凋亡之外,同时也证实 AMPs 可显著性抑制口腔肿瘤细胞的迁移以及侵袭。该效应的发挥可能与 AMPs 损伤细胞骨架相关。本研究结果是基于体外细胞的模型研究,对于进一

步机制的探讨仍需深入开展。

抗菌肽作为一种生物多肽类物质,目前研究已提示其对局部暴露的感染病原菌和肿瘤细胞作用效果优于其抑制体内感染病原菌的效果。本实验观察到 AMPs 能够特异性抑制某些肿瘤细胞的生长,而对正常人体细胞无害,同时以往文献报道部分天然抗菌肽还能促进白细胞的增殖,调动人体的免疫系统而起抗肿瘤作用。口腔作为一个开放的器官,其生理构造和口腔生物菌群特点,有利于抗菌肽局部应用并有效发挥作用,对于预防和治疗口腔微生物感染或应用于口腔肿瘤治疗方面是非常有利的。抗菌肽在体外局部应用方面存在很大潜力,对于防治口腔感染或应用于肿瘤治疗提供了一种新的方法。本实验的相关研究结果初步显示了 AMPs 作为一种新的口腔感染防治及肿瘤治疗药物的潜在价值,AMPs 除可作为一种抑制口腔感染的药物外,还可能对口腔肿瘤细胞产生抑制或杀伤作用,为进一步评价 AMPs 在口腔感染防治及肿瘤治疗上的应用,提供了一定的实验室研究基础。

参考文献:

- [1] Zasloff M. Antimicrobial peptides in health and disease[J]. N Engl J Med, 2002, 347(15):1199-1200.
- [2] Reddy KV, Yedery RD, Aranha C. Antimicrobial peptides: premises and promises [J]. Int J Antimicrob Agents, 2004, 24 (6): 536-547.
- [3] Antcheva N, Morgera F, Creatti L, et al. Artificial beta-defensin based on a minimal defensin template [J]. Biochem J, 2009, 421(3):435-447.
- [4] Chernysh S, Kim SI, Bekker G, et al. Antiviral and antitumor peptides from insects[J]. PNAS, 2002, 99(20): 12628-12632.
- [5] Wang C, Zhou Y, Li S, et al. Anticancer mechanisms of temporin-1CEa, an amphipathic α -helical antimicrobial peptide, in Bcap-37 human breast cancer cells [J]. Life Sci, 2013, S0024-3205(B)00196-3.[Epub ahead of print]
- [6] Wang C, Li HB, Li S, et al. Antitumor effects and cell selectivity of temporin-1CEa, an antimicrobial peptide from the skin secretions of the Chinese brown frog (*Rana chensinensis*) [J]. Biochimie, 2012, 94(2):434-441.
- [7] Zasloff M. Innate immunity, antimicrobial peptides, and protection of the oral cavity [J]. Lancet, 2002, 360(9340): 1116-1117.
- [8] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organi-

- sms[J]. *Nature*, 2002, 415(6870):389-395.
- [9] Dale BA, Tao R, Kimball JR, et al. Oral antimicrobial peptides and biological control of caries [J]. *BMC Oral Health*, 2006, 6(Suppl 1):S13.
- [10] Tao R, Jurevic RJ, Coulton KK, et al. Salivary antimicrobial peptide expression and dental caries experience in children[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(9):3883-3888.
- [11] Tao RC, Huang GW. Antimicrobial peptides and oral health[J]. *Guangxi Medicine*, 2005, 27(12):1967-1969. [陶人川, 黄光武. 抗菌肽与口腔健康 [J]. *广西医学*, 2005, 27(12):1967-1969.]
- [12] Hao YQ, Zhou XD. The research progress in antimicrobial peptides and oral microbial [J]. *Foreign Medical Sciences (Stomatology)*, 2004, 31(5):346-350. [郝玉庆, 周学东. 抗菌肽及其对口腔微生物作用研究进展[J]. *国外医学口腔医学分册*, 2004, 31(5):346-350]
- [13] Ye P. Human beta-defensin-expression in normal oral mucosa lesions[J]. *Journal of Clinical Stomatology*, 2003, 19(9): 271-275. [叶萍. 人类 β 防御素在正常口腔黏膜及病变组织中的表达[J]. *临床口腔医学杂志*, 2003, 19(9):271-275.]
- [14] Li Y, Wen Y, Zheng DX. The artificial antimicrobial peptides having potential application to preventing oral infection[J]. *Journal of Chinese Physician*, 2008, 32(9):32-34. [李茵, 温颖, 郑东翔. 人工合成抗菌肽对口腔感染的防御作用的研究[J]. *中国医师杂志*, 2008, 32(9):32-34.]
- [15] Kuroda K, Fukuda T, Yoneyama H, et al. Anti-proliferative effect of an analogue of the LL-37 peptide in the colon cancer derived cell line HCT116 p53+/+ and p53-/-[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(3):829-834.
- [16] Zhan YH, Liu J, Qu XJ, et al. β -Elemene induces apoptosis in human renal-cell carcinoma 786-0 cells through inhibition of MAPK/ERK and PI3K/Akt/ mTOR signalling pathways[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(6):2739-2744.
- [17] Eckert R, He J, Yarbrough DK, et al. Targeted killing of *Streptococcus mutans* by a pheromone-guided "smart" antimicrobial peptide [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(11):3651-3657.
- [18] Chen YX, Xu XM, Hong SG, et al. RGD-tachyplesin inhibits tumor growth[J]. *Cancer Research*, 2001, 61(6): 2434-2438.
- [19] Chen LH, Zhou L, Xu N. The antitumor mechanism of cationic antimicrobial peptides [J]. *Jilin Medical College*, 2009, 30(5):298-300. [陈凌昊, 周浪, 许娜. 阳离子抗菌肽抗肿瘤的作用机制 [J]. *吉林医药学院学报*, 2009, 30(5): 298-300.]
- [20] Han YP, Zhai ZY. The anti-tumor effect of antimicrobial peptides [J]. *Chemistry of Life*, 2006, 26(2):181-183. [韩玉萍, 翟朝阳. 抗菌肽的抗肿瘤作用 [J]. *生命的化学*. 2006, 26(2):181-183.]