

蟾蜍他灵对人结直肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化的影响

王艳¹ 王莎莎² 朱春阳¹ 董晨¹ 王瑞¹ 邱文生²

(1 青岛大学医学部,山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院肿瘤内科)

[摘要] 目的 探讨不同浓度蟾蜍他灵(BT)对人结直肠癌细胞 HCT116 增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化的影响。方法 采用 CCK-8 实验检测不同浓度(0、10、20、40、80、160、320 nmol/L)的 BT 处理 24 和 48 h 后的细胞活力,并计算半抑制浓度(IC₅₀);平板克隆实验验证 0、12.5、25.0 nmol/L BT(设为 A、B、C 组)处理 14 d 后对 HCT116 细胞集落形成能力的影响;使用划痕和 Transwell 实验验证 0、25、50 nmol/L BT(设为 A、C、D 组)处理 24 h 后对 HCT116 细胞迁移和侵袭能力的影响;应用 Western blot 实验检测 A、C、D 组处理 24 h 后 HCT116 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平。结果 CCK-8 实验结果显示,BT 处理 HCT116 细胞 24 或 48 h 后,随着 BT 的浓度增加,其抑制 HCT116 细胞增殖的作用显著增强($F=2\ 106.00,3\ 725.00,P<0.05$),处理 24 和 48 h 的 IC₅₀ 分别为 49.59、24.10 nmol/L;平板克隆实验结果显示,B、C 组细胞的集落数量显著少于 A 组($F=159.30,t=12.40,17.32,P<0.05$);划痕和 Transwell 实验结果显示,C、D 组细胞迁移率和侵袭细胞数量显著低于 A 组($F=120.30,296.80,t=12.71\sim 21.27,P<0.05$);Western blot 实验结果显示,BT 显著上调 HCT116 细胞内 E-cadherin 蛋白表达($F=2\ 736.00,P<0.05$),其中 C、D 组显著高于 A 组($t=50.27,72.13,P<0.05$);而 BT 显著下调 N-cadherin 蛋白表达($F=626.80,P<0.05$),其中 C、D 组显著低于 A 组($t=26.54,33.57,P<0.05$)。结论 BT 可明显抑制人结直肠癌细胞 HCT116 的增殖、迁移、侵袭和上皮间质转化过程,有望成为结直肠癌治疗的潜在候选药物。

[关键词] 结直肠肿瘤;HCT116 细胞;蟾酥甙类;细胞增殖;细胞运动;肿瘤浸润;上皮-间质转化

[中图分类号] R735.34

[文献标志码] A

Effect of bufotalin on the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of human colorectal cancer HCT116 cells

WANG Yan, WANG Shasha, ZHU Chunyang, DONG Chen, WANG Rui, QIU Wensheng (Faculty of Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the effect of different concentrations of bufotalin (BT) on the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of human colorectal cancer HCT116 cells. **Methods** CCK-8 assay was used to measure cell viability after 24 and 48 h of BT treatment at different concentrations (0, 10, 20, 40, 80, 160, and 320 nmol/L), and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated. The plate colony formation assay was used to verify the effect of BT treatment at the concentrations of 0, 12.5, and 25.0 nmol/L for 14 days on the colony formation ability of HCT116 cells (established as groups A, B, and C). The wound healing assay and the Transwell assay were used to verify the effect of BT treatment at the concentrations of 0, 25, and 50 nmol/L for 24 h on the migration and invasion abilities of HCT116 cells (established as groups A, C, and D). Western blot was used to measure the protein expression levels of E-cadherin and N-cadherin in HCT116 cells after 24 h of treatment in groups A, C and D. **Results** CCK-8 assay showed that after HCT116 cells were treated by BT for 24 or 48 h, the inhibitory effect of BT on the proliferation of HCT116 cells increased significantly with the increase in the concentration of BT ($F=2\ 106.00,3\ 725.00,P<0.05$), with an IC₅₀ value of 49.59 nmol/L for 24-hour treatment and 24.10 nmol/L for 48-hour treatment. The plate colony formation assay showed that groups B and C had a significantly lower number of colonies of cells than group A ($F=159.30,t=12.40,17.32,P<0.05$). The wound healing assay and the Transwell assay showed that compared with group A, groups C and D had significantly lower cell migration rate and number of invading cells ($F=120.30,296.80,t=12.71\sim 21.27,P<0.05$). Western blot showed that BT significantly upregulated the protein expression level of E-cadherin in HCT116 cells ($F=2\ 736.00,P<0.05$), and groups C and D had a significantly higher expression level than group A ($t=50.27,72.13,P<0.05$); BT significantly downregulated the protein expression level of N-cadherin ($F=626.80,P<0.05$), and groups C and D had a significantly lower expression level than group A ($t=26.54,33.57,P<0.05$). **Conclusion** BT can significantly inhibit the proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition of human colorectal cancer HCT116 cells and is expected to become a potential candidate for the treatment of colorectal cancer.

[KEY WORDS] Colorectal neoplasm; HCT116 cells; Bufanolides; Cell proliferation; Cell movement; Neoplasm invasive-ness; Epithelial-mesenchymal transition

[收稿日期] 2023-12-09; **[修订日期]** 2024-04-18

[基金项目] 北京市希思科临床肿瘤学研究基金(Y-HR-

2018-185);青岛市中医药科技项目(2021-zyym29)

[通讯作者] 邱文生,Email:wsquqdfy@qdu.edu.cn

结直肠癌在全球发病率居第三位,死亡率仅次

于肺癌^[1]。近年来,尽管手术和药物治疗有了重大进展,但晚期结直肠癌患者预后仍然很差。据统计,I 期结直肠癌患者的 5 年生存率为 90%,而 IV 期患者的 5 年生存率下降至 10% 左右^[2]。因此,迫切需要寻找新的治疗药物,使结直肠癌患者获益。

蟾蜍他灵(BT)是一种从中药蟾酥中分离出来的蟾蜍二烯内酯^[3]。其已被证明具有强心、镇痛、抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种药理活性^[4-6]。近年来,BT 因其显著的抗肿瘤活性而受到广泛的关注。研究发现,BT 可诱导人恶性黑色素瘤 A375 细胞发生细胞周期停滞和凋亡,从而抑制其增殖^[7];BT 还可以通过抑制 STAT3/上皮间质转化(EMT)轴来抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和 HCC1937 细胞的增殖、迁移和侵袭^[8]。另外,在非小细胞肺癌细胞 A549 异种移植模型中,5、10 mg/kg 的 BT 可显著抑制肿瘤生长^[9]。然而,BT 是否具有抑制结直肠癌细胞的作用尚不明确。本研究通过使用不同浓度 BT 处理人结直肠癌 HCT116 细胞后,检测 BT 对 HCT116 细胞增殖、集落形成、迁移和侵袭能力的影响,并探究 BT 对 HCT116 细胞 EMT 的影响,旨在为结直肠癌新药研发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞和试剂

人正常肠上皮细胞系 NCM460、人结直肠癌细胞系 HCT116 由武汉普诺赛生命科技有限公司提供,CCK-8 试剂盒及 BT 购自上海陶术生物科技有限公司,BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,E-cadherin 和 N-cadherin 单克隆抗体购于美国 Cell Signaling Technology(CST),GAPDH 多克隆抗体和羊抗兔二抗购于上海爱必信生物科技有限公司。

1.2 细胞培养

将 NCM460 和 HCT116 细胞置于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素溶液的 DMEM 培养基中,于 37 °C、潮湿、含体积分数 0.05 CO₂ 的细胞培养箱中培养,传 2~3 代且待细胞处于对数生长期时用于后续实验。

1.3 CCK-8 实验检测细胞活力

将处于对数生长期的 NCM460 和 HCT116 细胞以 10 000 个/孔接种至 96 孔板,在细胞培养箱中孵育 24 h 以后,分别使用浓度为 0、10、20、40、80、160、320 nmol/L 的 BT 处理细胞,第 24、48 小时时分别向各孔细胞中加入 10 μ L 的 CCK-8 检测试剂

孵育 1 h,使用酶标仪检测波长 450 nm 处各孔的吸光度(A)值。使用 Graphpad Prism 8.0 软件计算半抑制浓度(IC₅₀)。以 BT 处理 HCT116 细胞第 24、48 小时的 IC₅₀ 为依据,选择合适的浓度用于后续实验。

1.4 平板克隆实验检测细胞集落形成能力

取处于对数生长期的 HCT116 细胞以 800 个/孔接种至 6 孔板,在 37 °C 培养箱中孵育 24 h 后,每孔中分别加入 2 mL 浓度为 0、12.5、25 nmol/L 的 BT 培养液处理细胞(设为 A、B、C 组),继续在细胞培养箱中培养 14 d,每 3 d 换液一次。当肉眼观察到有细胞集落形成时,取出 6 孔板,去除原培养液,每孔加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,以 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,拍照并使用 Image J 软件计算各组集落数量。

1.5 划痕实验检测细胞迁移能力

准备 6 孔板,用马克笔在其背后画横线,横线相隔 0.5 cm。取处于对数生长期的 HCT116 细胞接种在 6 孔板上,待细胞生长密度达到约 90% 时,用 100 μ L 无菌移液器吸头垂直于 6 孔板背后横线在孔板内进行划痕,用 PBS 冲洗 3 次,然后在每孔中分别加入 2 mL 浓度为 0、25、50 nmol/L 的 BT 培养液处理细胞(设为 A、C、D 组),用显微镜在第 0、24 小时时拍摄划痕愈合情况,并计算细胞迁移率。

1.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

准备含有 Matrigel 胶的 Transwell 小室。在 24 孔板中加入含 10% 血清的培养基,然后用镊子将小室置于 24 孔板内,取在 6 孔板中处理 24 h 的 A、C、D 组 HCT116 细胞分别以 50 000 个/孔混合 200 μ L 无血清培养基加入小室,最后放入培养箱中培养。待 24 h 后,去除原培养液,使用 4% 多聚甲醛固定 30 min,以 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min。于倒置显微镜下观察,并随机选取 3 个视野拍照,使用 Image J 软件进行计数。

1.7 Western blot 实验检测细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平

取接种于培养皿处理 24 h 的 A 组、C 组、D 组 HCT116 细胞,将含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液加入细胞内进行充分裂解后,提取细胞总蛋白,使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,根据蛋白浓度配置等量等体积的蛋白样本,随后 100 °C 煮沸 5 min,放入 -20 °C 冰箱保存备用。用 10% SDS-PAGE 凝胶分离蛋白样本,然后转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h,然后加入一抗于 4 °C 冰箱孵育过夜。第 2 天用二抗常温孵育 1 h,使

用显影仪显影获取蛋白条带。以 GAPDH 作为内部参照,计算目的蛋白相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计学分析,采用 Image J 软件处理图像。所有实验均独立重复 3 次,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 Dunnett 方法,两组之间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BT 对 HCT116 细胞活力的影响

CCK-8 实验结果显示,经不同浓度(0、10、20、

40、80、160、320 nmol/L)的 BT 处理 24 或 48 h,随着浓度的升高,BT 对 NCM460 细胞活力的抑制能力逐渐增强($F = 478.70, 659.90, P < 0.05$)。经不同浓度(0、10、20、40、80、160、320 nmol/L)的 BT 处理 24 或 48 h,随着浓度的升高,BT 对 HCT116 细胞活力的抑制能力逐渐增强($F = 2 106.00, 3 725.00, P < 0.05$)。详见图 1。BT 处理 NCM460 细胞 24 和 48 h 后的 IC_{50} 分别为 261.40、141.10 nmol/L,BT 处理 HCT116 细胞 24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 49.59、24.10 nmol/L。根据 BT 处理 HCT116 细胞 24 和 48 h 的 IC_{50} 值,后续选择浓度 0、12.5、25 nmol/L 的 BT 用于平板克隆实验,浓度 0、25、50 nmol/L 的 BT 用于其他实验。

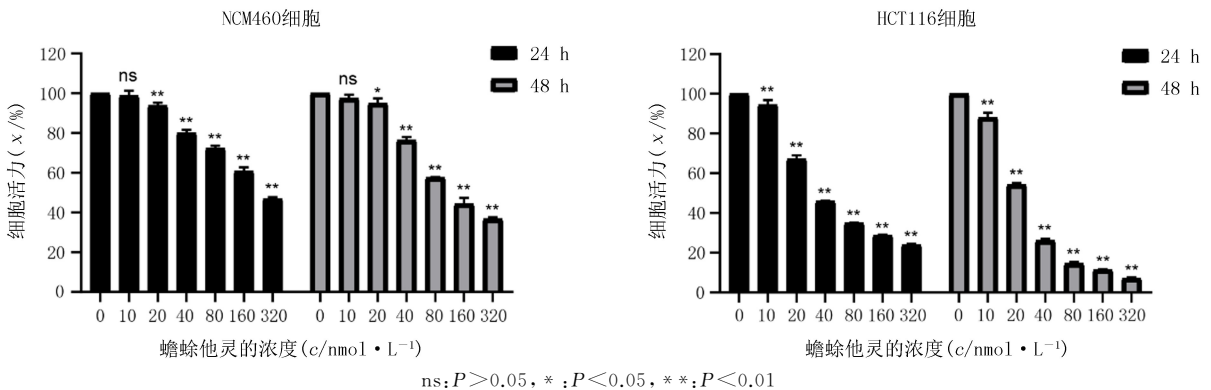


图 1 不同浓度 BT 处理 NCM460 和 HCT116 细胞 24、48 h 的细胞活力

2.2 BT 对 HCT116 细胞集落形成能力的影响

平板克隆实验结果显示,A~C 组 HCT116 细胞的集落数量分别为(453.00 ± 17.00)、(301.00 ± 8.89)、(240.70 ± 17.56)个,各组间比较差异有显著性($F = 159.30, P < 0.05$),其中 B、C 组显著少于 A 组($t = 12.40, 17.32, P < 0.05$),C 组显著少于 B 组($t = 4.92, P < 0.05$)。见图 2。

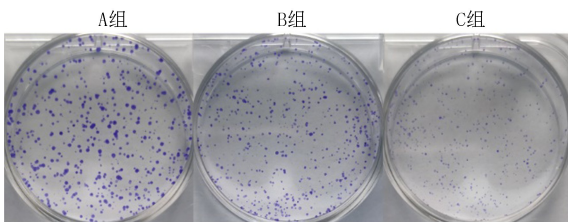


图 2 A~C 组 HCT116 细胞集落形成情况比较

2.3 BT 对 HCT116 细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,A、C、D 组 HCT116 细胞的迁移率分别为(28.84 ± 3.00)%、(4.22 ± 2.38)%、(1.63 ± 1.49)% ,各组间比较差异有显著意义($F = 120.30, P < 0.05$),其中 C、D 组显著低于 A 组($t = 12.71, 14.05, P < 0.05$),D 组与 C 组比较无显著差异($P > 0.05$)。见图 3。

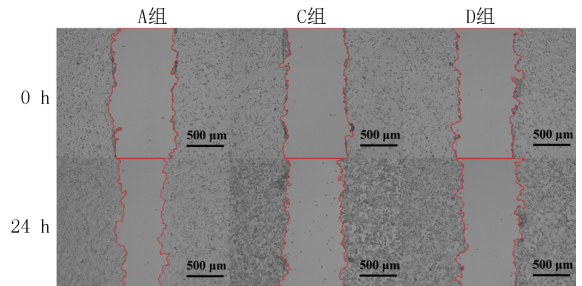


图 3 A、C、D 组 HCT116 细胞迁移情况比较(40 倍)

2.4 BT 对 HCT116 细胞侵袭能力的影响

Transwell 实验结果显示,A、C、D 组 HCT116 细胞的侵袭数量分别为(781.00 ± 77.00)、(21.33 ± 1.53)、(8.67 ± 0.58)个,各组间比较差异具有显著性($F = 296.80, P < 0.05$),其中 C、D 组显著少于 A 组($t = 20.92, 21.27, P < 0.05$),D 组与 C 组比较无显著差异($P > 0.05$)。见图 4。

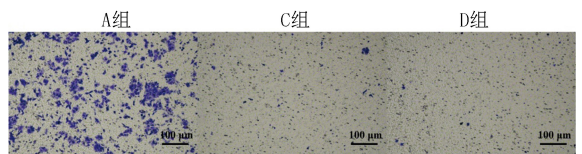


图 4 A、C、D 组 HCT116 细胞侵袭情况比较(100 倍)

2.5 BT 对 HCT116 细胞 EMT 的影响

Western blot 实验结果显示, A 组、C 组、D 组 HCT116 细胞中 E-cadherin 的蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 2.02 ± 0.03 、 2.47 ± 0.04 , N-cadherin 的蛋白相对表达量分别为 1.00 ± 0.00 、 0.48 ± 0.02 、 0.34 ± 0.04 。随着 BT 的浓度增加, E-cadherin 蛋白表达显著上调 ($F = 2\ 736.00, P < 0.05$), 其中 C、D 组显著高于 A 组 ($t = 50.27, 72.13, P < 0.05$), D 组显著高于 C 组 ($t = 21.86, P < 0.05$); 而 N-cadherin 蛋白表达则显著下调 ($F = 626.80, P < 0.05$), 其中 C、D 组显著性低于 A 组 ($t = 26.54, 33.57, P < 0.05$), D 组显著低于 C 组 ($t = 7.03, P < 0.05$)。见图 5。

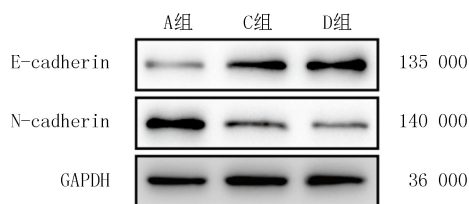


图 5 A、C、D 组 HCT116 细胞中 E-cadherin 和 N-cadherin 蛋白表达水平比较

3 讨论

结直肠癌是一种始于结肠和直肠的癌症。国际癌症研究机构估计, 到 2040 年, 全球结直肠癌新发病例数将明显增加, 死亡率将明显增高^[10]。目前结直肠癌的临床治疗主要包括手术和化疗, 然而耐药性的发生和化疗相关的毒副作用是结直肠癌患者化疗失败或停药的主要原因^[11-12]。中药因其在缓解症状、降低化疗引起的不良反应、延长生存期等方面的独特优势, 成为肿瘤治疗的一个研究热点^[13]。BT 是一种从中药蟾酥中提取的类固醇内酯类化合物^[14]。蟾酥是中华大蟾蜍或黑眶蟾蜍有毒分泌物中的干燥产物, 其在中国用于疾病的治疗已有数百年的历史^[15]。其中蟾蜍二烯内酯被认为是蟾酥最主要的活性成分之一, 其对多种肿瘤具有显著的抑制作用^[16]。

既往研究表明, BT 对食管鳞状细胞癌细胞系 Eca-109、EC9706、TE5、Hec2、TE11 均有明显的抑制作用^[17]。成骨细胞瘤细胞 U2OS 异种移植模型小鼠经 $0.5 \sim 1 \text{ mg/kg}$ 的 BT 处理后, 小鼠体内肿瘤生长受到了显著抑制^[18]。然而, BT 在结直肠癌中的抗肿瘤作用知之甚少。无限复制是癌细胞生长所获得的一种表型, 癌细胞通过修复端粒来获得无限倍增的能力^[19]。因此, 本研究首先探究了不同浓度

(0、10、20、40、80、160、320 nmol/L) BT 对人结直肠癌细胞 HCT116 增殖活力的影响, 结果显示, 随着浓度的升高, BT 对 HCT116 细胞增殖的抑制能力逐渐增强, 并呈剂量依赖性, 24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 49.59、24.10 nmol/L。此外, 本研究还设置了人正常肠上皮细胞 NCM460 作为对照, 结果发现 BT 对于 NCM460 细胞有一定的抑制作用, 24 和 48 h 的 IC_{50} 分别为 261.40、141.10 nmol/L。与 HCT116 细胞比较, BT 处理 NCM460 细胞 24 和 48 h 的 IC_{50} 更高, 这表明 NCM460 细胞比 HCT116 细胞更能耐受 BT 的毒副作用。另有研究表明 BT 可抑制成骨细胞瘤细胞 MG63 和非小细胞肺癌细胞 A549 的集落形成能力^[9,18]。因此, 本研究也进一步观察了 BT 对 HCT116 细胞集落形成能力的影响, 本研究以 BT 处理 HCT116 细胞 24 h 后的 IC_{50} 为依据, 设置 0、12.5、25.0 nmol/L 的浓度梯度处理 HCT116 细胞, 结果显示随着 BT 浓度增加, HCT116 细胞存活的集落数量显著减少。以上这些结果表明, BT 对结直肠癌细胞具有明显的细胞毒作用。

近几年研究发现, BT 可以抑制三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、HCC1937 细胞的迁移和侵袭能力^[8]。转移是肿瘤患者死亡的主要原因。在转移过程中, 肿瘤细胞离开原发部位并扩散到全身, 形成继发肿瘤并最终致器官衰竭^[20]。转移级联反应的第一步是侵袭, 肿瘤细胞穿透其周围的基底膜并通过细胞外基质迁移到周围组织^[21]。因此, 本研究探究了 BT 是否会影响结直肠癌细胞的迁移和侵袭, 以 BT 处理 HCT116 细胞 24 和 48 h 后的 IC_{50} 为依据, 设置 0、25、50 nmol/L 的浓度梯度处理 HCT116 细胞。划痕和 Transwell 实验的结果显示, 随着 BT 浓度增加, HCT116 的细胞迁移率和细胞侵袭数量显著减少, 表明其能够抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭。

EMT 被认为是癌细胞一种关键的表型改变, 其将上皮细胞转化为间充质细胞, 因此对肿瘤的发生、侵袭和转移至关重要^[22]。一些分子标志物的表达水平可以揭示 EMT 的程度, 如癌组织或癌细胞内 E-cadherin 表达降低和 N-cadherin 表达增加可显著性诱导 EMT 过程^[23-24]。有研究证实, BT 可以通过增加三阴性乳腺癌细胞中 E-cadherin 蛋白表达和降低 N-cadherin、Vimentin 蛋白表达, 来抑制 EMT 过程^[8]。在本研究中, BT 处理可以显著上调 HCT116 细胞中 E-cadherin 蛋白表达, 同时下调 N-cadherin 蛋白表达, 这表明 BT 可以抑制结直肠癌

细胞的 EMT 过程,进而抑制结直肠癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述,BT 是一种有前途的天然抗癌药物,能明显抑制人结直肠癌细胞的增殖、集落形成、迁移、侵袭和 EMT 过程,可为结直肠癌抗肿瘤治疗药物的开发提供新的思路。但是本研究仍然存在诸多不足之处,仅局限于细胞水平的实验研究,后续应考虑构建结直肠癌和转移瘤动物模型,进一步深入研究 BT 在动物体内的抗癌作用及其分子机制。

作者声明:王艳、邱文生、王莎莎负责研究构思和实验设计;王艳负责细胞培养和实验操作;朱春阳、董晨、王瑞负责实验数据处理。所有作者均参与该论文写作和修改并同意发表,且均声明无利益冲突。

[参考文献]

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2024. DOI:10/gtp98r.

[2] FAN A H, WANG B D, WANG X, et al. Immunotherapy in colorectal cancer: Current achievements and future perspective [J]. Int J Biol Sci, 2021,17(14):3837-3849.

[3] YE M, GUO D A. Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005,19(13):1881-1892.

[4] 陈文杰,胡耀廷,王如锋,等. 蟾蜍二烯酸内酯类成分的生物转化和生物合成研究进展[J]. 中草药, 2021,52(15):4741-4751.

[5] SU C L, LIN T Y, LIN C N, et al. Involvement of caspases and apoptosis-inducing factor in bufotalin-induced apoptosis of Hep 3B cells[J]. J Agric Food Chem, 2009,57(1):55-61.

[6] EL-SEEDI H R, YOSRI N, EL-AARAG B, et al. Chemistry and the potential antiviral, anticancer, and anti-inflammatory activities of cardiotoxic steroids derived from toads[J]. Molecules, 2022,27(19):6586.

[7] PAN Z H, QU C J, CHEN Y, et al. Bufotalin induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human malignant melanoma A375 cells[J]. Oncol Rep, 2019,41(4):2409-2417.

[8] PARK S J, JUNG H J. Bufotalin suppresses proliferation and metastasis of triple-negative breast cancer cells by promoting apoptosis and inhibiting the STAT3/EMT axis[J]. Molecules, 2023,28(19):6783.

[9] ZHANG W, JIANG B P, LIU Y X, et al. Bufotalin induces ferroptosis in non-small cell lung cancer cells by facilitating the ubiquitination and degradation of GPX4[J]. Free Radic Biol Med, 2022,180:75-84.

[10] IONESCU V A, GHEORGHE G, BACALBASA N, et al. Colorectal cancer: From risk factors to oncogenesis[J]. Medi-

cina (Kaunas), 2023,59(9):1646.

- [11] HUANG X M, YANG Z J, XIE Q, et al. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review[J]. Biomed Pharmacother, 2019,117:109142.
- [12] WANG Q L, LI Z H, GUO J, et al. Effect of Chinese herbal medicine formula on progression-free survival among patients with metastatic colorectal cancer: Study protocol for a multi-center, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial [J]. PLoS One, 2022,17(12):e0275058.
- [13] ZHANG X Y, QIU H, LI C S, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer [J]. Biosci Trends, 2021,15(5):283-298.
- [14] HUANG Y, YANG G X, FEI J, et al. Bufotalin ameliorates experimental Sjögren's syndrome development by inhibiting Th17 generation[J]. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2020,393(10):1977-1985.
- [15] LI F J, HU J H, REN X, et al. Toad venom: A comprehensive review of chemical constituents, anticancer activities, and mechanisms[J]. Arch Pharm, 2021,354(7):e2100060.
- [16] KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J, STOCHMAL A. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: An overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use [J]. Phytochem Rev, 2017,16(6):1155-1171.
- [17] LIN S H, LV J H, PENG P L, et al. Bufadienolides induce p53-mediated apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Oncol Lett, 2018,15(2):1566-1572.
- [18] ZHU Y R, XU Y, FANG J F, et al. Bufotalin-induced apoptosis in osteoblastoma cells is associated with endoplasmic reticulum stress activation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014,451(1):112-118.
- [19] HANAHAN D, WEINBERG R A. The hallmarks of cancer [J]. Cell, 2000,100(1):57-70.
- [20] LAMBERT A W, PATTABIRAMAN D R, WEINBERG R A. Emerging biological principles of metastasis [J]. Cell, 2017,168(4):670-691.
- [21] KRAKHMAL N V, ZAVYALOVA M V, DENISOV E V, et al. Cancer invasion: Patterns and mechanisms[J]. Acta Naturae, 2015,7(2):17-28.
- [22] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends Cell Biol, 2019,29(3):212-226.
- [23] GRAVDAL K, HALVORSEN O J, HAUKAAS S A, et al. A switch from E-cadherin to N-cadherin expression indicates epithelial to mesenchymal transition and is of strong and independent importance for the progress of prostate cancer[J]. Clin Cancer Res, 2007,13(23):7003-7011.
- [24] CHEN L, MUÑOZ-ANTONIA T, CRESS W D. Trim28 contributes to EMT via regulation of E-cadherin and N-cadherin in lung cancer cell lines[J]. PLoS One, 2014,9(7):e101040.