

野鸦椿酸对人肝癌细胞的抑制作用及机理研究

黄维^{1,2},冯 霁^{2,3},郑毅^{1,2},张泰雷^{1,2},倪林^{2,4},姚霞^{5*},邹小兴^{2,3*}¹福建农林大学生命科学学院;²自然生物资源保育利用福建省高校工程研究中心;³福建农林大学林学院;⁴福建农林大学植物保护学院,福州 350002;⁵中国中药有限公司,北京 100095

摘要:探讨圆齿野鸦椿中野鸦椿酸(EA)对人肝癌细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响及其机制研究。从圆齿野鸦椿果皮中提取得到EA,通过培养人肝癌细胞HepG2细胞,以MTT法分析EA对HepG2细胞增殖的影响,流式细胞术评价不同浓度(20、40、80 μmol/L)的EA对HepG2细胞的凋亡状态和周期分布情况,细胞划痕、Transwell小室实验考察对HepG2细胞侵袭转移能力的变化,用Western blot法和荧光定量PCR法检测野鸦椿酸对上皮-间质转化(EMT)相关标志物E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2和MMP-9的蛋白和mRNA表达的影响。结果显示,EA抑制人肝癌细胞HepG2细胞的增殖,24、48、72 h的IC₅₀分别为32.16 ± 4.58、26.45 ± 3.79和16.76 ± 4.01 μmol/L。随EA浓度的增大,细胞的凋亡率逐渐升高,且发生显著的G0/G1期阻滞。EA可降低HepG2细胞的侵袭和迁移能力,上调E-Cadherin的蛋白和mRNA的水平,下调N-Cadherin、Vimentin、MMP-2和MMP-9的蛋白和mRNA表达。EA抑制人肝癌细胞增殖和侵袭转移能力,可能与其调控EMT相关信号通路有关。

关键词:野鸦椿酸;圆齿野鸦椿;增殖;侵袭;迁移

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.005

The Inhibitory Effect and Mechanism of Euscaphic Acid on Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells

HUANG Wei^{1,2}, FENG He^{2,3}, ZHENG Yi^{1,2}, ZHANG Tai-lei^{1,2}, NI Lin^{2,4}, YAO Xia^{5*}, ZOU Xiao-xing^{2,3*}¹College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University;²Engineering Research Institute of Conservation, Utilization of Natural Bioresources, Fujian Agriculture and Forestry University;³College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University;⁴College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;⁵China National of Traditional & Herbal Medicine Co., Ltd., Beijing 100095, China

Abstract: The purpose of the present work was to study the inhibitory effect of Euscaphic acid (EA) on the proliferation, invasion and migration of human hepatocarcinoma HepG2 cells. EA was extracted from the pericarps of *Euscaphis konishii* Hayata. MTT assay was employed to evaluate the proliferative inhibition of EA on HepG2 cells; flow cytometry was adopted to test cell cycle and apoptosis status; wound healing and transwell assays were performed to determine the effect of EA on invasion and migration abilities. The protein and mRNA expression of E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, MMP-2 and MMP-9 were evaluated using Western blot and qRT-PCR. The results showed that EA significantly inhibits the proliferation of HepG2, with the IC₅₀ of 32.16 ± 4.58, 26.45 ± 3.79 and 16.76 ± 4.01 μmol/L for 24, 48 and 72 h treatment, respectively. EA induced apoptosis and G0/G1 phase arrest in a dose-dependent manner, suppressed invasion and migration ability of HepG2, and mediated the Epithelial-mesenchymal transition (EMT) process of HepG2 cells via upregulating the protein and mRNA levels of E-Cadherin and downregulating the protein and mRNA expression of N-Cadherin, Vimentin, MMP-2 and MMP-9. In summary, the inhibition of proliferation, invasion and migration of human hepatocarcinoma HepG2 cells by EA probably through the EMT associated signaling pathway.

Key words: euscaphic acid; *Euscaphis konishii* Hayata; proliferation; invasion; migration

收稿日期:2018-03-07 接受日期:2018-07-02

基金项目:国家自然科学基金(31700292);福建省自然科学基金(2018J01653);中国博士后科学基金(2018M632566);福建农林大学科技创新专项(CXZX2016072)

* 通信作者 Tel: 86-015980662883; E-mail: fjzxzx@126.com, yaoxia1118@163.com

肝癌是全球死亡率第三位的恶性肿瘤疾病,我国每年约有38.3万人死于肝癌,占全球肝癌死亡病例数的51%,是全球肝癌发病率和死亡率最高的国家^[1]。肝癌起病隐匿,进展迅速,一旦确诊几乎

已处于病程的中晚期,而肝癌细胞的侵袭迁移是引起肝癌患者死亡的重要原因^[2]。因此寻找和开发具有抗肝癌侵袭迁移的药物,对于肝癌的预防和治疗,增加患者的生存时间具有重要的意义。

圆齿野鸦椿(*Euscaphis konishii* Hayata),又名福建野鸦椿^[3],为省沽油科野鸦椿属常绿小乔木^[4],具有抗炎镇痛,清热解毒,消肿散结等功效^[5,6],是福建省民间传统药材。课题组前期发现其醇提物具有较好的抗肝癌作用^[7],并在其抗癌活性筛选中提取得到了五环三萜化合物野鸦椿酸(*Euscaphic acid*, EA, 见图1)。EA最早发现于野鸦椿属*E. japonica*的果皮^[8],具有抗HIV^[9]、抗炎^[10-12]和抗肿瘤^[13,14]等作用,对乳腺癌、肺癌、结肠癌等肿瘤细胞均具有显著的细胞毒作用,而对非肿瘤细胞几乎无细胞毒性^[11],其抗肿瘤的作用机制尚未明确。本研究旨在观察EA对人肝癌HepG2细胞的增殖、侵袭及迁移能力的影响,探讨EA抗肿瘤的作用机制,为肝癌防治提供低毒、高效的天然抗肿瘤药物,对于圆齿野鸦椿药用价值的开发具有重要的意义。

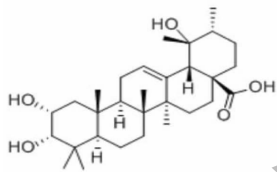


图1 野鸦椿酸的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of Euscaphic acid (EA)

1 实验材料

1.1 药品与试剂

圆齿野鸦椿于2016年10月采自福建省邵武市天成岩,经福建农林大学邹双全研究员鉴定为省沽油科野鸦椿属圆齿野鸦椿*Euscaphis konishii* Hayata,圆齿野鸦椿果实晒干后分离果皮和种子,将果皮粉碎成粉,粉碎后用95%乙醇提取,用乙酸乙酯萃取,经过聚酰胺、硅胶柱层析,凝胶柱层析,用乙腈水重结晶得到无色晶体,通过质谱和¹H NMR分析,与文献^[7]比对一致,确认为野鸦椿酸EA。

DMEM高糖培养基、胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶和0.01 mol/L PBS溶液均购自Hyclone公司,四甲基偶氮唑盐MTT、5-氟尿嘧啶(5-Fu)和碘化丙啶(PI)购于sigma公司,Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(KGA106)购自江苏凯基生物

技术股份有限公司,Matrigel和Transwell小室购于BD公司,BCA蛋白定量试剂盒购于Thermo公司,RNA提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒购于大连宝生物公司,二甲基亚砜DMSO及其余试剂均为分析纯。

1.2 仪器

二氧化碳培养箱(Thermo Forma 371,美国),倒置显微镜(1X51, Olympus, 日本),酶标仪(Lab systems MK3, Thermo, 美国),流式细胞仪(FACSC autoTM II, BD, 美国),荧光、化学发光成像系统(BOX Chemi XT4, Syngene, 英国),NANODROP 2000(Thermo Scientific, 美国),电泳仪(Mini-p3, Bio-Rad, 美国),荧光定量PCR仪(LightCycler 96, Roche, 瑞士)。

1.3 细胞培养

人肝癌细胞株HepG2购于中国科学院上海细胞库,于DMEM高糖培养基(含10%的FBS,100 U/mL青霉素和100 U/mL链霉素),37℃,5%CO₂,饱和湿度培养箱中培养,取对数生长期细胞用于试验。

2 实验方法

2.1 MTT法细胞增殖毒性试验

在96孔培养板上接种 5×10^3 个细胞/孔,每孔180 μL,试验组分别加入不同浓度的EA或溶剂DMSO,每组设5个平行孔,37℃培养24、48、72 h,加入5 g/L的MTT溶液20 μL/孔,继续培养4 h后,弃去上清,加入150 μL DMSO溶解,在570 nm波长下测吸光度值(OD值),根据吸光度计算细胞生长抑制率。细胞生长抑制率(%) = (OD对照-OD试验)/(OD对照-OD空白) × 100%。

2.2 流式细胞术测定细胞凋亡

取对数生长期的HepG2细胞,接种于6孔板,用20、40、80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24 h后,调整密度为 $1 \sim 5 \times 10^5$ /mL细胞悬液,用PBS洗2遍,再将细胞重悬于Binding Buffer悬浮细胞。按Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒方法进行操作,在1 h内用流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

2.3 流式细胞术测定细胞周期

取对数生长期的HepG2细胞,接种于6孔板,用20、40、80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24 h后,消化细胞后进行轻柔的吹打形成单细胞悬液,用PBS重悬细胞后,加入预冷乙醇至终浓度为

70%,置于4℃固定12h以上。加入5 μL 10 mg/mL RNase,37℃放置30min,加入PI(100 μg/mL)染液,室温避光染色15min,采用流式细胞仪检测和分析细胞周期分布情况。

2.4 细胞划痕试验

HepG2细胞 4×10^5 /mL接种于24孔板中,待细胞处于亚融合状态时,用10 μL枪头垂直于孔板划线,用PBS洗去细胞碎片,在倒置显微镜下用10×10倍镜拍照记录,即为对照划痕宽度。用20、40、80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24h后,分别进行拍照。用imageJ软件来测量划痕区域宽度,以划痕愈合率代表细胞迁移速率。划痕愈合率(%)=(对照划痕宽度-处理后划痕)。

2.5 Transwell 细胞侵袭试验

在24孔板里放入Transwell小室,小室中加入200 μL培养基,将Matrigel基质胶用无血清的培养基按1:6稀释,每个小室底部膜的上室加入80 μL,置于培养箱孵育1h,使Matrigel聚合成凝胶。收集对数生长期细胞,用无血清培养基重悬细胞,调整细胞密度为 5×10^6 个/mL,每个小室的上室加入细胞悬液100 μL,在小室上室用20、40、80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24h,24孔板下室加入600

μL含10%FBS的培养基,于培养基内培养24h。用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,PBS洗上室3遍,待膜风干后,用0.1%结晶紫染色30min,将膜倒立风干,在显微镜下观察细胞,取5个不同视野拍照计数。

2.6 Western blot 法检测蛋白浓度

人肝癌HepG2细胞用20、40、80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24h后,用PBS洗2遍,加入适量NP40裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)在冰上裂解30min。用BCA蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific)进行总蛋白定量后,用SDS-PAGE电泳进行蛋白分离并以PVDF膜进行电转,封闭液封闭后,孵育适当稀释比例的一抗和二抗,最后ECL显影,在凝胶成像仪上进行拍照。

2.7 荧光定量PCR法检测mRNA水平

人肝癌HepG2细胞接种于6孔板,用20、40和80 μmol/L EA或溶剂DMSO处理细胞24h后,提取总RNA,以NANODROP 2000(Thermo Scientific)进行浓度测定。mRNA逆转录为cDNA,cDNA进行荧光定量PCR检测。E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9及GAPDH引物由上海生工生物工程公司合成。

表1 引物列表

Table 1 List of primers used in PCR amplification

基因 Gene	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
E-Cadherin	TGCCAGAAAATGAAAAAGG	GGATGACAGCGTGAGAGA
N-Cadherin	CATCCTGCTTATCCTTGCTGCTG	CTGGTCTTCTTCTCCTCCACCTT
Vimentin	AAGGAGGAAATGGCTCGTCAC	CTCAGGTTGAGGGAG-GAAAAGT
MMP-2	CTACTGAGTGCCGTGTTTG	GGAAGCTCTGACCTTCCAG
MMP-9	TCTTCCAAGGCCAATCCTA	ATCACCGTCGAGTCAGCTC
GAPDH	CGTGGACATCCGCAAAG	AAGGTGGACAGCGAGGC

2.8 统计学处理

采用SPSS22.0软件进行统计学分析,试验结果以平均值±标准差表示,各组间比较采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 EA对人肝癌HepG2细胞增殖的抑制作用

首先,采用MTT法分析EA对人肝癌细胞的细胞毒作用。对照组HepG2细胞生长良好,经过不同浓度的EA处理24、48和72h后,细胞呈现明显浓

度和时间依赖的增殖抑制,其半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 32.16 ± 4.58 、 26.45 ± 3.79 、 16.76 ± 4.01 μmol/L,与对照组相比,不同时间和浓度的EA均可显著抑制HepG2细胞增殖($P < 0.05$),差异有统计学意义,结果见图2。

3.2 EA促进HepG2细胞凋亡

以Annexin V-FITC/PI双染法检测EA对HepG2细胞的凋亡诱导作用,由图3和表2可知,对照组HepG2细胞无明显的坏死(Q1象限)、早期凋亡(Q4象限)或晚期凋亡(Q2象限)的现象。随着

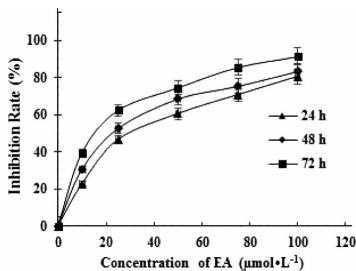


图2 EA对肝癌HepG2细胞的增殖抑制作用

Fig. 2 The proliferative inhibition of EA on human hepatocellular carcinoma cell HepG2.

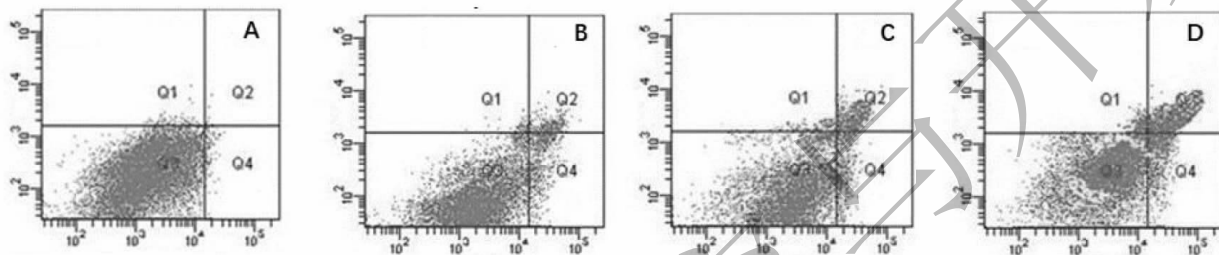


图3 流式细胞术检测EA对HepG2细胞凋亡的影响

Fig. 3 The effect of EA on apoptosis of HepG2 cells detected by flow cytometry

注:(A)对照组;(B) 20 μmol/L EA 给药组;(C) 40 μmol/L EA 给药组;(D) 80 μmol/L EA 给药组。

Note:(A) the control group;(B) 20 μmol/L EA treated group;(C) 40 μmol/L EA treated group;(D) 80 μmol/L EA treated group.

表2 EA对HepG2细胞凋亡诱导的研究($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 The apoptosis induction of EA on human hepatocellular carcinoma cell HepG2($\bar{x} \pm s, n=3$)

EA 给药浓度 Concentration	早期凋亡 Early apoptosis (%)	晚期凋亡 Late apopyosis (%)	坏死 Necrosis (%)
对照组 Control group	0.12 ± 0.03	0.54 ± 0.11	0.35 ± 0.07
20 μmol/L	1.26 ± 0.21 *	2.33 ± 0.19 *	0.65 ± 0.14
40 μmol/L	3.53 ± 0.32 **	4.37 ± 0.48 **	2.18 ± 0.29 *
80 μmol/L	7.64 ± 1.02 ***	11.59 ± 2.34 ***	4.10 ± 0.52 **

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

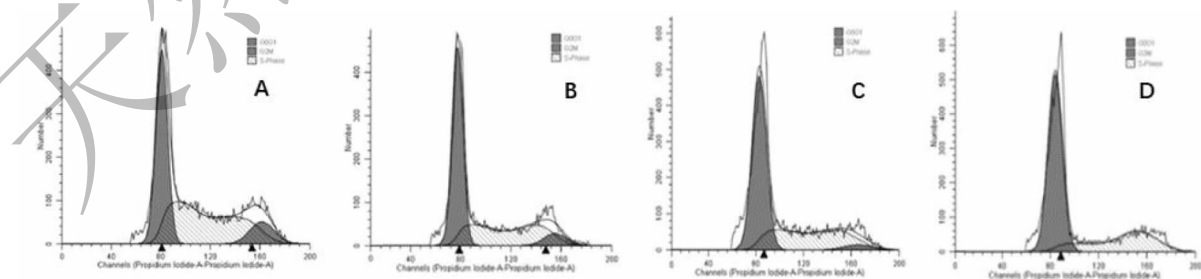


图4 流式细胞术检测EA对HepG2周期进程的影响

Fig. 4 The effect of EA on cell cycle of HepG2 cells detected by flow cytometry

注:(A)对照组;(B) 20 μmol/L EA 给药组;(C) 40 μmol/L EA 给药组;(D) 80 μmol/L EA 给药组。

Note:(A) the control group;(B) 20 μmol/L EA treated group;(C) 40 μmol/L EA treated group;(D) 80 μmol/L EA treated group.

EA浓度的增大,凋亡的细胞比例逐渐增大,其中晚期凋亡细胞的比例增大最为明显,提示EA促进HepG2细胞凋亡。

3.3 EA引起HepG2细胞G0/G1期阻滞

以PI单染法流式细胞术分析EA对HepG2细胞周期的影响,由图4和表3可知,随着EA浓度的增大,HepG2细胞在G0/G1期分布比例明显上升,而S期和G2/M的分布比例下降,呈现明显的剂量依赖性,提示EA可引起HepG2细胞G0/G1期阻滞。

表3 EA对HepG2细胞周期进程的研究($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 The cell cycle arrest of EA on human hepatocellular carcinoma cell HepG2($\bar{x} \pm s, n=3$)

EA 给药浓度 Concentration	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
对照组	37.42 ± 3.26	46.20 ± 3.12	16.38 ± 1.84
20 μmol/L	47.96 ± 4.73 *	41.32 ± 3.96	10.72 ± 1.05
40 μmol/L	59.98 ± 5.27 *	34.65 ± 3.48 *	5.36 ± 0.74 *
80 μmol/L	74.84 ± 6.91 **	23.67 ± 2.34 **	1.49 ± 0.50 *

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.4 EA对HepG2细胞迁移的抑制作用

细胞划痕试验用来评价EA对HepG2迁移能力的影响。由图5可知,与对照组相比,随着EA浓度的升高,HepG2细胞划痕愈合能力减弱,20、40、80

μmol/L EA作用24 h后,迁移抑制率分别为31.75 ± 3.66%, 48.53 ± 4.39%, 72.56 ± 4.15%,结果表明EA可抑制HepG2细胞的迁移。

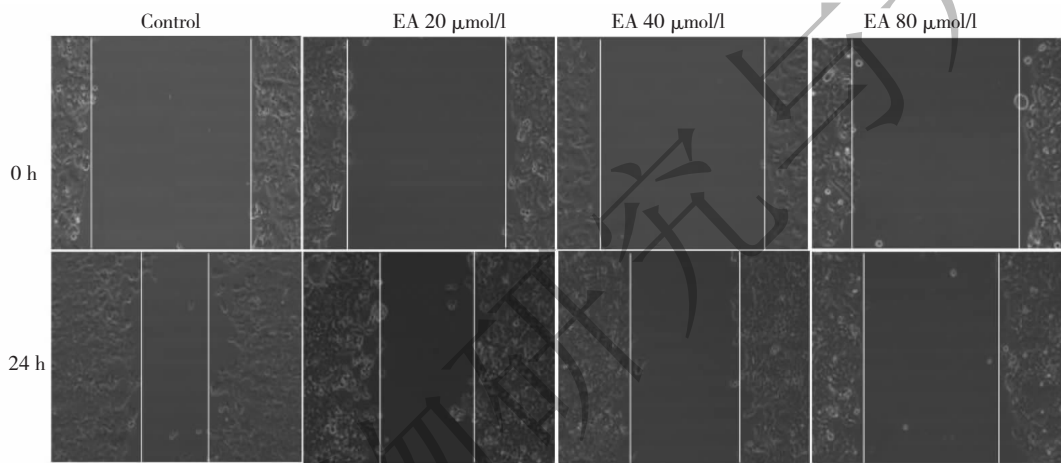


图5 EA对HepG2细胞的迁移抑制作用

Fig. 5 The inhibition of EA on the migration of HepG2

3.5 EA对HepG2细胞侵袭的抑制作用

Transwell实验用来评价EA对HepG2侵袭能力的影响。由图6可知,与对照组相比,20、40、80

μmol/L EA作用细胞24 h后,随着EA浓度的升高,HepG2细胞穿过小室的细胞数目减少,显示EA对HepG2细胞的侵袭具有较好的抑制作用。

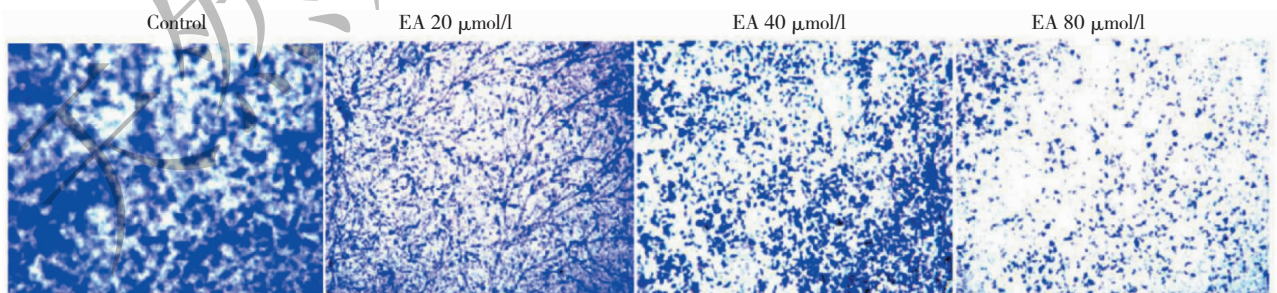


图6 EA对HepG2细胞的侵袭抑制作用

Fig. 6 The inhibition of EA on the invasion of HepG2

3.6 EA对E-cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2和MMP-9蛋白表达量的影响

上皮-间质转化(Epithelial mesenchymal transi-

tion, EMT)是指上皮细胞(如肿瘤细胞)在与周围基质的相互作用过程中,丧失其上皮细胞的特征,而表现间质细胞的特征,即肿瘤细胞黏附能力下降,降解

和破坏基底膜和细胞外基质,从而向周围组织、血道和淋巴道进行侵袭和转移,是导致肿瘤患者治疗失败乃至死亡的主要原因^[15]。为此,我们考察了EA对上皮细胞标志物 E-cadherin、间质细胞标志物 N-Cadherin 和波形蛋白 Vimentin 及基质金属蛋白

(Matrix metalloprotein, MMP) 蛋白表达量的影响。由图 7 可知,与对照组相比,EA 剂量组随浓度增高, E-Cadherin 的表达上升,而 N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 表达均呈现剂量依赖性下降。

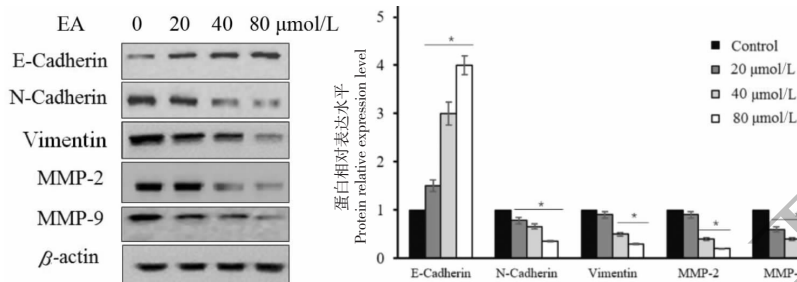


图 7 EA 对 HepG2 细胞的 E-cadherin、N-cadherin、vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响
Fig. 7 The effect of EA on the protein level of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, MMP-2 and MMP-9

3.7 EA 对 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 水平的影响

荧光定量 PCR 法检测 EA 处理后 HepG2 细胞中 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 的表达,由图 8 可知,EA 浓度增加会引起 HepG2 细胞中 E-Cadherin 的 mRNA 水平上升,而降低 N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 水平。

选择能抑制肿瘤细胞增殖、诱导其凋亡并可调节细胞周期的药物,是目前抗肿瘤治疗的有效途径之一。在本研究中,我们以 MTT 法分析 EA 的细胞毒作用,发现随着处理浓度和作用时间的递增,EA 对 HepG2 细胞的增殖抑制愈强;流式细胞术检测不同浓度的 EA 作用 24 h 后对 HepG2 的细胞状态和周期进程的影响,发现 EA 可显著诱导肝癌细胞凋亡并发生 G1 期阻滞,从而达到抑制肿瘤细胞生长的目的。

肝癌细胞的侵袭迁移是引起肝癌患者死亡的重要原因,肝癌细胞可与周围基质失去直接的黏附,呈现间质样表型,发生 EMT 现象,从而具备侵袭和转移的能力,其主要特征有细胞黏附分子(如 E-钙黏蛋白, E-Cadherin)表达的减少、细胞角蛋白细胞骨架转化为波形蛋白(Vimentin)为主的细胞骨架及形态上具有间充质细胞的特征(如 N-Cadherin 蛋白上调)^[16]。金属基质蛋白酶 MMP 几乎能降解细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)中的各种蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,是肿瘤细胞侵袭转移生理活动中的关键酶^[17]。

基于上述研究,我们以细胞划痕试验和 Transwell 小室探讨 EA 对肝癌细胞侵袭迁移能力的影响。结果表明,随着 EA 处理浓度的递增, HepG2 细胞划痕的愈合能力逐渐减弱,穿过小室的细胞数目也逐渐减少,提示 EA 可显著抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。同时,我们采用 Western blot 和荧光定量 PCR 检测 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 的表达情况,结果表明,增大

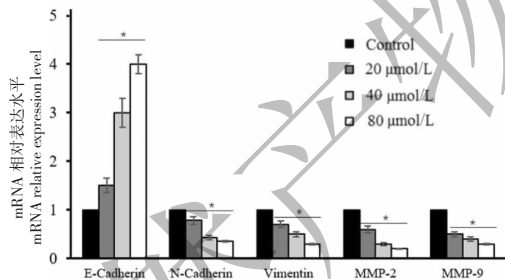


图 8 EA 对 HepG2 细胞的 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达的影响
Fig. 8 The effect of EA on the mRNA level of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-2 and MMP-9

4 结论

福建传统药材圆齿野鸦椿具有抗炎镇痛,清热解毒,消肿散结等功效,课题组从圆齿野鸦椿果皮中提取得到单体化合物野鸦椿酸 EA。本研究显示,EA 能抑制人肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、诱导其细胞凋亡及引起细胞周期阻滞,同时 EA 也可降低 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力,并可调控上皮-间质转化(EMT)相关的蛋白和基因的表达。

EA 的给药浓度,可逐渐上调 HepG2 细胞中 E-Cadherin 的蛋白和 mRNA 表达,而下调 N-Cadherin、Vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白和 mRNA 的表达,表明 EA 可通过抑制人肝癌细胞 HepG2 的 EMT 进程,降低金属基质蛋白酶 MMP 的表达,从而抑制肝癌的侵袭和迁移,这为 EA 抗肿瘤作用的机制提供了体外实验证据,接下来我们将对 EA 抑制人肝癌细胞 HepG2 的体内效果作进一步的评价。

参考文献

- 1 Lv GS(吕桂帅),Chen L(陈磊),Wang HY(王红阳). Research progress and prospect of liver cancer in China[J]. *Sci Bull*(生命科学),2015,5:237-248.
- 2 El-Serag H B. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2011,365:1118-1127.
- 3 Cheng DY(程冬英),Sun HX(孙华香). Simple identification of *Euscaphis japonica* Kuntz and *Euscaphis konishii* Hayata[J]. *Strait Pharm J*(海峡药学),1994,6(3):11.
- 4 Fang WP(方文培). Flora of China: Vol 46(中国植物志:第 46 卷)[M]. Beijing:Science Press,1981:23-24.
- 5 Fujian Institute of Traditional Chinese Medicine(福建中医研究所). Fujian folk herbal medicine(福建民间中草药)[M]. Fuzhou:Fujian People's Publishing House,1959:349.
- 6 Fujian medical research institute(福建省医药研究所). Fujian pharmacology(福建药物志)[M]. Fuzhou:Fujian People's Publishing House,1979:294-295.
- 7 Huang W(黄维),Zou XX(邹小兴),Ding H(丁卉),et al. Research on anti-hepatoma effect of *Euscaphis konishii* Hayata ethanol extracts[J]. *Mod Chin Med*(中国现代中药),2018,20:179-183.
- 8 Takahashi K, Kawaguchi S, Nishimura K, et al. Studies on constituents of medicinal plants. XIII. Constituents of the pericarps of the capsules of *Euscaphis japonica* Pax[J]. *Chem Pharm Bull*,1974,22:650-653.
- 9 Xu HX,Zeng FQ,Wan M, et al. Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*[J]. *J Nat Prod*,1996,59:643-645.
- 10 Banno N,Akihisa T,Tokuda H, et al. Anti-inflammatory and antitumor-promoting effects of the triterpene acids from the leaves of *Eriobotrya japonica*[J]. *Biol Pharm Bull*,2005,28:1995-1999.
- 11 Kim IT,Ryu S,Shin JS, et al. Euscaphic acid isolated from roots of *Rosa rugosa* inhibits LPS-induced inflammatory responses via TLR4-mediated NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages[J]. *J Cell Biochem*,2012,113:1936-1946.
- 12 Zhang LJ,Cheng JJ,Liao CC, et al. Triterpene acids from *Euscaphis japonica* and assessment of their cytotoxic and anti-NO activities[J]. *Planta Med*,2012,78:1584-1590.
- 13 Numata A,Yang P,Takahashi C, et al. Cytotoxic triterpenes from a Chinese medicine, Goreishi [J]. *Biol Pharm Bull*,1989,37:648-651.
- 14 Cheng JJ,Zhang LJ,Cheng HL, et al. Cytotoxic hexacyclic triterpene acids from *Euscaphis japonica* [J]. *J Nat Prod*,2010,73:1655-1658.
- 15 Kai F,Laklai H,Weaver VM. Force matters: biomechanical regulation of cell invasion and migration in disease [J]. *Trends Cell Biol*,2016,7:486-497.
- 16 Iwalsuki M,Mimori K,Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance[J]. *Cancer Sci*,2010,101:293-299.
- 17 Evette SR,Derek CR. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*,2010,15:201-212.