

铁皮石斛提取物对胃癌癌变的抑制作用及机制研究

赵 益, 刘 燕, 蓝希明, 徐国良, 刘红宁*

1. 江西中医药大学 中医基础理论分化发展中心, 江西 南昌 330004

2. 江西省中医病因生物学重点实验室, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 考察铁皮石斛提取物(DOE)对胃癌癌变的抑制作用及相关机制。方法 动物随机分为对照组, 模型组, 阳性药组, DOE高、低剂量组。采用大鼠ig给予甲基硝基亚硝基胍(MNNG)200 mg/kg, 每10天ig1次, 持续3个月诱导胃癌癌变模型, 造模同时给予DOE, 对照组给予生理盐水; 实验结束后HE染色分析胃组织癌变程度, 计算癌变率; RT-PCR测定胃组织中表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、Bax、Bcl-2 mRNA表达情况; TUNEL法测定胃组织中细胞凋亡; ELISA测定血浆中EGF、EGFR的量。结果 DOE高剂量能够明显抑制胃癌癌变, 与模型组比较差异显著($P < 0.01$); DOE能显著降低胃组织中EGF、EGFR mRNA以及血浆中EGF、EGFR的表达, 与模型组比较差异显著($P < 0.05$ 、 0.01); 并能够明显升高Bax mRNA表达、降低Bcl-2 mRNA的表达, 与模型组比较差异显著($P < 0.05$ 、 0.01), TUNEL法显示其具有诱导细胞凋亡的作用。结论 DOE能够抑制大鼠胃癌癌变, 其机制可能与降低组织中EGF、EGFR mRNA表达与血浆中EGF、EGFR的量有关, 同时降低Bcl-2 mRNA、升高Bax mRNA表达, 诱导细胞发生凋亡。

关键词: 铁皮石斛提取物; 胃癌癌变; EGF/EGFR; Bax/Bcl-2; 细胞凋亡; 甲基硝基亚硝基胍

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)24-3704-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.24.016

Study on inhibition of *Dendrobium officinale* extract on gastric carcinogenesis

ZHAO Yi, LIU Yan, LAN Xi-ming, XU Guo-liang, LIU Hong-ning

1. Research Center for Differentiation and Development of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Jiangxi Province Key Laboratory of TCM Etiopathogenesis, Nanchang 330004, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effects of *Dendrobium officinale* extract (DOE) on gastric carcinogenesis and its related molecular mechanism. **Methods** The rats were randomly divided into normal group, model group, positive drug group, low-dose and high-dose DOE groups. The gastric carcinogenesis model was induced by ig giving 200 mg/kg *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) at doses of 200 mg/kg every 10 days for 3 months. Meanwhile, the rats in the treatment groups were given the corresponding doses of drug while the rats in the control group were given normal saline. At the end of the experiment, the degree of gastric tissue carcinogenesis was calculated by HE staining analysis. The expression levels of EGF, EGFR, Bax, and Bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR test in gastric tissue. The levels of EGF and EGFR in plasma were detected by ELISA. Apoptosis was detected by TUNEL assay. **Results** Compared with the model group, the high-dose DOE could inhibit the degree of carcinogenesis significantly ($P < 0.01$). Both high-dose and low-dose DOE could significantly reduce the levels of EGF, EGFR mRNA, and Bcl-2 mRNA, and increase the levels of Bax mRNA in gastric tissue, with statistical significance compared with the model group ($P < 0.05$, 0.01). In addition, they also reduced the levels of EGF and EGFR in plasma significantly and induced apoptosis. **Conclusion** DOE could inhibit the gastric carcinogenesis, which might be related to effects of decreasing the expression of EGF and EGFR mRNA in gastric tissue and EGF and EGFR in plasma and inducing the apoptosis through reducing the expression of Bcl-2 mRNA and increasing Bax mRNA.

Key words: *Dendrobium officinale* extract; gastric carcinogenesis; EGF/EGFR; Bax/Bcl-2; apoptosis; *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine

收稿日期: 2015-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81260523); 江西省落地计划项目(KJLD12086); 江西省自然基金项目(20152ACB20021); 江西中医药大学校级课题(2014ZR001, 2014ZR042)

作者简介: 赵 益(1982—), 在读博士, 讲师, 研究方向为中医肿瘤病因学研究。Tel: (0791)87142858 E-mail: zhysyz2008@163.com

*通信作者 刘红宁, 博士, 教授, 研究方向为中医学与中药学。Tel: (0791)87142859 E-mail: lhn0791@139.com

胃癌是世界上第 4 类常见的恶性肿瘤，是癌症致死的第 2 大病因^[1]。大部分患者确诊时已处于晚期阶段，往往伴随着肿瘤的远处转移，导致患者的生存率低下。胃癌的发生与发展与表皮生长因子受体 (EGFR) 密切相关，表现为 EGFR 蛋白过表达和 EGFR 突变，高表达 EGFR 与肿瘤远处转移、治疗以及疾病自愈有显著相关性^[2-3]。在胃癌细胞中，EGFR 激活会促进胃癌细胞的增殖与分化，抑制 EGFR 的表达有利于抑制癌变^[4]。

石斛是我国传统名贵中药，自古以来就有“药中黄金”的美称。石斛首载于《神农本草经》，列为上品，谓“味甘，平，无毒，主伤中，除痹，下气，补五脏虚劳，强阴，就服厚肠胃，轻身，延年，长肌肉，逐皮肤邪热，瘕气，定志除惊”。以铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 为主药的铁皮枫斗晶、铁皮枫斗颗粒 (胶囊) 是临床常用的辅助治疗药物，能显著减轻放疗副反应^[5-6]。研究发现铁皮石斛具有调节免疫的作用^[7]，能提高非特异性免疫功能、特异性细胞免疫以及体液免疫功能^[8]；鲍丽娟等^[9]研究发现，4 种石斛 (霍山石斛、铁皮石斛、金钗石斛、马鞭石斛) 不同溶剂 (水、石油醚、醋酸乙酯及正丁醇) 提取物对体外人宫颈癌 HeLaS3 和肝癌细胞株 HepG2 具有抑制作用、可诱导细胞凋亡、抑制原癌基因 c-myc 的表达，且在所选浓度范围内呈剂量依赖性和时间依赖性。本实验考察铁皮石斛提取物 (*Dendrobium officinale* extract, DOE) 对大鼠胃癌癌变的抑制作用，以及对 EGF/EGFR、Bax/Bcl-2 表达的调节作用，以期阐明 DOE 预防胃癌癌变的作用及机制，为临床用药提供科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

DOE (含多糖 45%，金华寿仙药业有限公司，批号 SXG 131208)；维 A 酸片 (山东良福制药有限公司，批号 140101)；甲基硝基亚硝基胍 (MNNG，日本 TCI，批号 MV340RC)；TUNEL System、Easstep 通用型总 RNA 提取试剂盒、GoScriptTM Reverse Transcription System (美国 Promega 公司)；FastStart Essential DNA Green Master (Roche)；EGF、EGFR ELISA 试剂盒 (武汉优尔生科技股份有限公司)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 动物

Wistar 大鼠，雄性，体质量 130~150 g，清洁级，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，合

格证号 SGXK (京) 2012-0001。

1.3 仪器

VeritiTM 96 梯度 PCR 仪 (ABI)；LightCycler96 荧光定量 PCR 仪 (Roche)；Nano Drop2000 分光光度计 (Thermo Scientific)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

Wistar 大鼠随机分为 5 组：对照组，模型组，DOE 高、低剂量组，阳性药 (维 A 酸片) 组，每组 13 只。模型组与给药组每 10 天 ig MNNG 200 mg/kg (1 次)，持续 3 个月，诱导胃癌癌变模型^[10]。造模同时 ig 给予 DOE 4.8、2.4 g/kg，维 A 酸片 0.012 g/kg，每天给药 1 次，连续给药 3 个月，对照组和模型组给予等体积的生理盐水。

2.2 样本采集及处理

给药结束后，大鼠 ip 给予 2%戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 麻醉，腹主动脉取血，肝素钠抗凝，3 000 r/min 离心 20 min 后取血浆，用于测定 EGF、EGFR 蛋白表达。同时取胃组织，沿胃大弯切开，沿大、小弯方向将前胃切成 2 mm 宽的长条，生理盐水冲洗干净后，分成 2 部分，一部分放入 4%多聚甲醛溶液中固定，用于 HE 染色与 TUNEL 检测；另一部分放入 -80℃ 保存，用于提取 RNA。

2.3 HE 染色

取 4%多聚甲醛固定的胃组织，常规石蜡包埋，切片，HE 染色，光镜下观察前胃黏膜组织学变化。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡率

取 4%多聚甲醛固定的胃组织切片，按照 TUNEL 试剂盒所示步骤进行染色，荧光显微镜观察。凋亡图片用 Image J 程序分析处理。每张图片在高倍镜下随机取 10 个视野，计算阳性细胞数和总细胞数比值，即为凋亡率。

2.5 血浆 EGF、EGFR 蛋白水平检测

取血浆，按照 ELISA 试剂盒说明书检测血浆中 EGF、EGFR 蛋白水平。

2.6 胃组织 EGF、EGFR、Bax、Bcl-2 mRNA 水平检测

RNA 提取按照试剂盒说明书完成，电泳分析纯度，分光光度计测定浓度。按照试剂盒说明书进行 RNA 的逆转录及荧光定量。引物序列见表 1。

2.7 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS 20.0 软件进行组间 *t* 检验。组间癌变率比较采用 Fisher 检验。

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Real time qPCR primers

引物名称	引物序列 (5'-3')
EGFR 正向	CTCGTGGAACCTCTCACACC
	AAATGCTCCTGAACCCAGAA
EGF 正向	AGGGATGTGGGGGACTTACT
	CATTCTTGGGCTGTTGGTGT
Bax 正向	CCGATTTCATCTACCCTGCTG
	TGAGCAATTCCAGAGGCAGTT
Bcl-2 正向	GGTGGACAACATCGCTCTG
	CAGCCAGGAGAAATCAAACA
β -actin 正向	CCCATCTATGAGGGTTACGC
	TTTAATGTCACGCACGATTTC

3 结果

3.1 一般症状观察与体质量变化

造模后各组大鼠体质量均有下降,模型组和DOE组相差不大,而阳性药组体质量下降明显。在造模过程中,模型组大鼠死亡1只,DOE高剂量组死亡1只,死亡大鼠腹部胀满,尸检发现,大鼠胃胀明显,食物残留较多。研究表明MNNG会导致大鼠全消化道胀气,增加动物死亡率^[11]。阳性药组大鼠死亡5只,尸检发现大鼠肝脏发白,根据文献报道^[12]全反式维A酸片10 mg/kg给药4周出现肝脏系数明显升高,说明阳性药有一定的肝毒性。

3.2 对胃癌癌变程度以及病理变化的改善作用

对照组大鼠胃黏膜无淋巴细胞;模型组大鼠胃

黏膜鳞状上皮破坏,层次和极性紊乱,肿瘤细胞有异型性,胞核增大,核染色质增粗,浸润性生长,呈癌变特征,同时还有间质纤维母细胞增生;阳性药组,胃黏膜鳞状细胞乳头状瘤伴轻度异型增生,鳞状上皮呈乳头状排列,细胞有轻度异型性,层次增多,乳头中央有纤维脉管束;DOE高剂量组,细胞乳头状瘤,鳞状上皮呈乳头状排列,细胞无异型性,但层次增多;DOE低剂量组,鳞状细胞乳头状增生,有轻度异型性及角化不全。可见高剂量DOE能够明显抑制胃癌癌变,主要使乳头状瘤未发生癌变。结果见图1。

3.3 对胃癌癌变率的影响

MNNG诱导的胃癌癌变病理过程是异型增生→鳞状细胞瘤→乳头状瘤→癌变。模型组的癌变发生率为41%。经Fisher精确检验,DOE高剂量组与模型组比较,能够显著抑制癌变($P<0.01$)。结果见表2。

3.4 对胃组织中EGF、EGFR mRNA及血浆中EGF、EGFR蛋白水平的影响

MNNG诱导后,模型组大鼠胃组织中EGF、EGFR mRNA表达与血浆中EGF、EGFR蛋白水平均明显升高,与对照组比较差异显著($P<0.05$),给予DOE后,高、低剂量都能显著降低EGF、EGFR表达,与模型组比较差异显著($P<0.05$ 、 0.01),结果见表3。

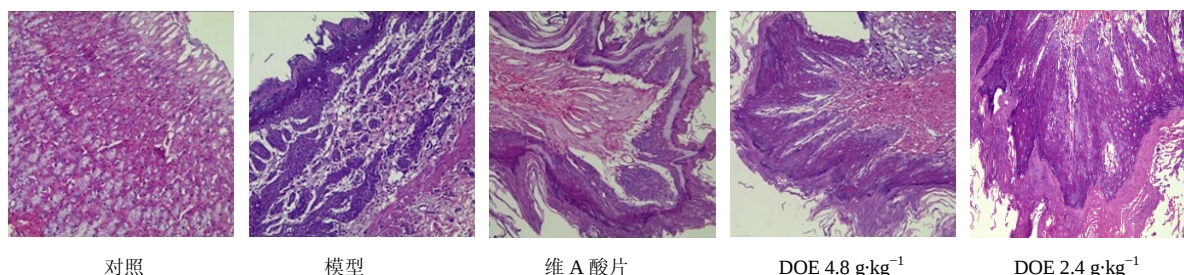


图1 各组大鼠胃组织癌变病理学改善情况

Fig. 1 Pathological improvement of gastric carcinogenesis in rats

表2 DOE对胃癌大鼠癌变率的影响

Table 2 Effects of DOE on regulating rate of carcinogenesis in rats

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	n	胃癌癌变病理变化过程/只(%)				χ^2 值	P 值
			癌变	乳头状瘤	鳞状细胞瘤	异型增生		
模型	—	12	5 (41%)	6 (50%)	1 (9%)	0	—	—
维A酸片	0.012	8	0	3 (38%)	0	5 (62.5%)	5.702	0.097
DOE	4.8	12	0	3 (30%)	0	7 (42.8%)	13.534	0.001 ^{##}
	2.4	13	1 (0.8%)	9 (69%)	3 (23%)	0	3.969	0.172

与模型组比较: ^{##} $P<0.01$, 下同

^{###} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 3 DOE 对大鼠胃组织 EGF、EGFR mRNA 以及血浆中 EGF、EGFR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of DOE on expression of EGF and EGFR mRNA in gastric tissue and protein expression of EGF and EGFR in plasma of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	n	胃组织 mRNA 水平		血浆蛋白水平	
			EGF	EGFR	EGF	EGFR
对照	—	13	1.256±0.886	0.966±0.386	6.545±2.787	1.846±0.987
模型	—	12	4.342±1.004*	3.836±1.091*	16.693±4.263*	5.504±2.011*
维 A 酸片	0.012	8	3.491±1.006	1.420±0.630 [#]	2.940±1.736 ^{##}	3.058±0.955
DOE	2.4	12	0.813±0.277 ^{##}	0.550±0.219 [#]	1.614±0.591 ^{##}	2.279±0.948 [#]
	4.8	13	0.762±0.268 ^{##}	0.481±0.301 [#]	0.623±0.311 ^{##}	1.650±1.206 ^{##}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$, 下同

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group, same as below

3.5 对胃组织中 Bax、Bcl-2 基因表达以及细胞凋亡的影响

模型组大鼠胃组织中促凋亡基因 Bax 表达下降、抗凋亡基因 Bcl-2 表达升高 ($P<0.05$), 给予维 A 酸片和 DOE 后, 都能够得到改善, DOE 高剂量组效果最明显, 与模型组比较差异显著 ($P<0.01$)。TUNEL 法检测细胞凋亡, 对照组、模型组

只有少数细胞发生凋亡, 凋亡率分别为 (3.56 ± 0.60)%、(4.73 ± 1.25)%, 各给药组都能观察到凋亡细胞增多, 阳性药组及 DOE 高、低剂量组的凋亡率分别为 (10.12 ± 1.34)%、(32.89 ± 2.24)%、(12.23 ± 1.58)%, 与模型组比较差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。说明 DOE 具有明显诱导细胞凋亡的作用。结果见表 4、图 2。

表 4 DOE 对大鼠胃组织 Bax、Bcl-2 mRNA 表达以及细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects of DOE on expression of Bax, Bcl-2 mRNA and apoptotic rate in gastric tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	Bax	Bcl-2	凋亡率/%
对照	—	13	1.126±0.350	0.432±0.124	3.56±0.60
模型	—	12	0.511±0.150*	0.709±0.158*	4.73±1.25
维 A 酸片	0.012	8	1.050±0.168 ^{##}	0.298±0.087 ^{##}	10.12±1.34 [#]
DOE	2.4	12	1.048±0.223 ^{##}	0.341±0.136 [#]	12.23±1.58 [#]
	4.8	13	1.653±0.286 ^{##}	0.524±0.191 ^{##}	32.89±2.24 ^{##}

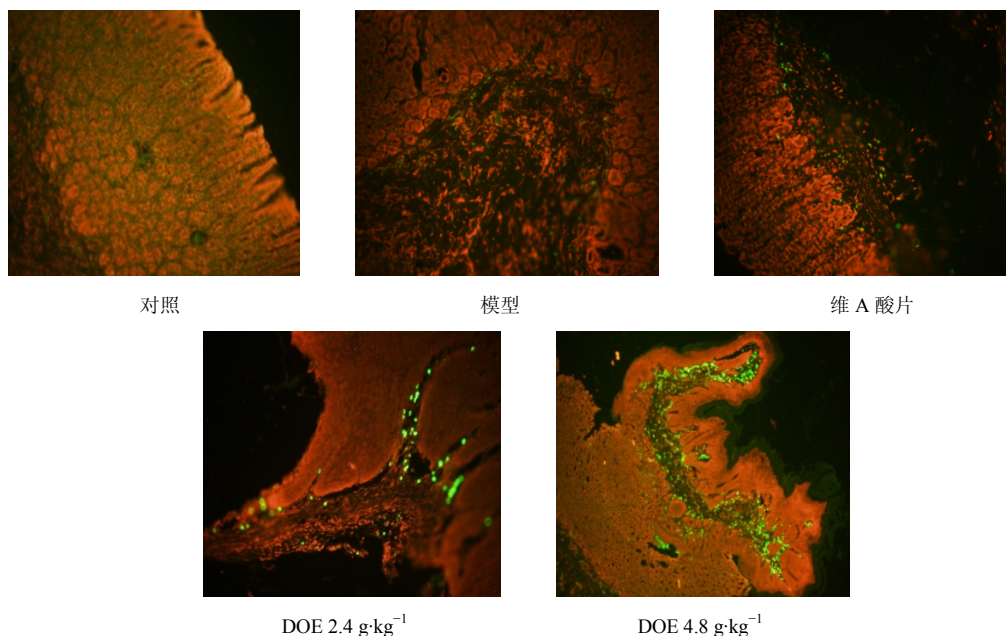


图 2 TUNEL 法检测 DOE 诱导细胞凋亡的作用

Fig. 2 Induction of DOE on apoptosis in each group by TUNEL

4 讨论

胃癌动物模型所用的 MNNG 具有很强的致癌力, 直接破坏 DNA, 易渗透胃幽门部和胃底黏膜, 且胃对其转化失活能力最差, 因而其诱发胃癌具有特异性。徐晶莹等^[13]以 100 mg/mL MNNG 的 5% 的酒精水溶液作为 Wistar 雄性大鼠常规饮用水 24 周, 之后加在饲料中至 28 周, 成功直接诱发大鼠胃腺癌。此法操作简便, 排除了对胃的某些非特异性损伤, 模型与人胃癌的自然发生机制相似, 但饮用剂量难以精确掌握, 而且周期长, 所以本实验参考文献中单因素造模方法^[10,14], ig 给予 200 mg/kg MNNG, 每隔 10 d 一次, 持续 3 个月, 成功造成胃癌模型。

胃癌发生发展的过程很少直接从胃黏膜上皮产生, 而是由多基因异常引起的渐进性变化, 在癌变前多数经历了较长的演变, 即由正常胃黏膜转变成癌前病变, 部分发展成胃癌。EGFR 家族是受体酪氨酸激酶中研究得最为透彻的信号通路, 在很多恶性肿瘤如乳腺癌、非小细胞肺癌中, 均发现 EGFR 家族有过度表达, 这些受体的激活引起肿瘤细胞增殖、血管生成、肿瘤转移、阻滞凋亡, 以 EGFR 家族为靶点的药物研发成为研究的热点。胃癌的发生与发展与 EGFR 具有密切的关系, 表现为 EGFR 蛋白过表达和 EGFR 突变。陈斌等^[15]在胃癌组织中测定 EGFR 蛋白的阳性表达率为 42.7% (44/103), 在胃对照组织中无表达。Kim 等^[16]也发现 EGFR 在胃癌组织中的阳性表达率为 5%~25%, Hirao 等^[17]发现 EGFR 反义转染后 MKN28 胃癌细胞体内、体外生长受到抑制。进而认为 EGFR 可能成为判断胃癌发生、发展、预后的标志物^[18-19]。更有趣的是 MNNG 可以引起 EGFR 和肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 等膜受体聚簇, 以及下游信号分子 NF- κ B 的活化^[20-21]。本实验模型组可见 EGFR 大量表达, DOE 能够有效减少 EGF、EGFR mRNA 的表达, 抑制胃癌癌变, 具体怎样诱导细胞凋亡的发生, 可能与抑制 EGF/EGFR 下游通路的表达有关。

EGF 与 EGFR 结合后, 将外界各种信号转导至胞内^[22], 主要通过 2 条途径将信号传递入核: 一条是 Ras-Raf-MEK-ERK 途径, 这个级联反应通路主要受一些生长因子的刺激而激活。ERK 活化后进入核内, 在核内磷酸化转录因子, 从而激活早期快反应基因, 进而调节基因转录, 促进细胞有丝分裂和增殖^[23]。ERK 的活化能上调 EGFR 的表达, 从而形

成了对肿瘤细胞生长起关键作用的自分泌环^[24]。另一条是 PI3K/Akt, PI3K/Akt 通路能够调节许多细胞功能, 例如细胞生长、增殖、分化以及细胞粘附能力和迁移性。当 Akt 被激活后, 能够磷酸化抑癌基因 p21 以及促凋亡基因 Bad、Caspase-9 和 NF- κ B 从而阻止凋亡和促进上皮细胞存活^[25]。本实验发现胃癌癌变组促凋亡基因 Bax mRNA 表达下降、抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 表达升高, 能够抑制胃组织的细胞凋亡, 给予 DOE 后能够促进凋亡, 推测可能与 PI3K/Akt 通路的活化有关, 将在后续的实验中进一步去探索。

铁皮石斛有效成分为多糖、生物碱、萜类化合物、氨基酸以及微量元素^[26]。铁皮石斛多糖是抗肿瘤的主要有效成分^[27], 刘亚娟等^[28-29]证实铁皮石斛多糖可以提高小鼠胚胎干细胞的克隆形成率, 促进其增殖, 同时又不影响其多潜能性的维持和表达; 而且铁皮石斛多糖可以抑制 HepG2、A549、NCCIT 及 F9 的生长, 具有一定的抗癌活性。葛颖华等^[30]证实鲜铁皮石斛多糖对 Lewis 肺癌小鼠有明显的免疫调节作用。王杰等^[31]证实鲜铁皮石斛多糖提取物对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤有明显的抑制作用, 其作用机制可能与提高脾脏指数、调节血清中 TNF- α 、IL-2 水平有关。本研究中, DOE 明显抑制胃癌癌变, 降低胃组织中 EGF、EGFR mRNA 以及血浆中 EGF、EGFR 蛋白水平, 明显升高 Bax mRNA 表达、降低 Bcl-2 mRNA 的表达, 诱导细胞凋亡。DOE 中多糖质量分数达到 45%, 其抑制胃癌癌变的作用, 可能和多糖有关, 但否是多糖起主要作用, 还需进一步证实。

参考文献

- [1] Foulkakis T, Lundell L, Gubanski M, *et al.* Advances in the treatment of patients with gastric adenocarcinoma [J]. *Acta Oncol*, 2007, 46(3): 277-285.
- [2] Inokuchi M, Murayama T, Hayashi M, *et al.* Prognostic value of co-expression of STAT3, mTOR and EGFR in gastric cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2011, 2(2): 251-256.
- [3] Lieto E, Ferraraccio F, Orditura M, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) is an independent prognostic indicator of worse outcome in gastric cancer patients [J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(1): 69-79.
- [4] Sakamoto N, Oue N, Sentani K, *et al.* Liver-intestine cadherin induction by epidermal growth factor receptor is associated with intestinal differentiation of gastric cancer

- [J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(9): 1744-1750.
- [5] 陈晓萍, 张 萍, 朱娟如. 铁皮枫斗颗粒 (胶囊) 治疗肺癌放疗患者气阴两虚证的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(5): 394-397.
- [6] 姚庆华, 陈 超, 杨维乱. 铁皮枫斗颗粒干预肿瘤化疗患者阴虚证的临床研究 [J]. 浙江中医杂志, 2008, 43(10): 615-616.
- [7] 魏 胡, 杨晋翔, 李志钢, 等. *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍胃癌前病变大鼠造模联合因素的探讨 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(2): 111-112.
- [8] 李 板, 陈爱君, 张信岳. 铁皮石斛颗粒增强免疫功能作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2008, 24(1): 53-54.
- [9] 鲍丽娟. 四种石斛抗肿瘤活性的研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2007.
- [10] Bilici M, Cayir K, Tekin S B, *et al*. Effect of mirtazapine on MNNG-induced gastric adenocarcinoma in rats [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(10): 4897-4900.
- [11] Meng L Z, Lv G P, Hu D J, *et al*. Effects of polysaccharides from different species of *Dendrobium* (Shihu) on macrophage function [J]. *Molecules*, 2013, 18(5): 5779-5791.
- [12] 陈雁虹, 盖仁华, 吴洪海. 全反式维 A 酸给药 4 周对大鼠的毒性作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(2): 248-255.
- [13] 徐晶莹, 李益民, 李玉兰, 等. MNNG 诱导大鼠胃癌模型的建立 [J]. 哈尔滨工业大学学报, 2003, 2(2): 104-106.
- [14] Suleyman H, Cadirci E, Albayrak A, *et al*. Occurrence of anticancer activity of prednisolone via adrenalectomy and inhibition of adrenaline in rats [J]. *Int J Cancer*, 2010, 126(7): 1740-1748.
- [15] 陈 斌, 罗荣城, 陈健鹏, 等. EGFR 蛋白在人胃癌组织中的表达及其临床价值 [J]. 肿瘤防治研究, 2008, 35(2): 113-115.
- [16] Kim J W, Kim H P, Im S A, *et al*. The growth inhibitory effect of lapatinib, a dual inhibitor of EGFR and HER2 tyrosine kinase, in gastric cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2008, 272(2): 296-306.
- [17] Hirao T, Sawada H, Koyama F, *et al*. Antisense epidermal growth factor receptor delivered by adenoviral vector blocks tumor growth in human gastric cancer [J]. *Cancer Gene Ther*, 1999, 6(5): 423-427.
- [18] Theodore L, Nikolaos X, Dimosthenis Z, *et al*. EGFR as a prognostic marker for gastric cancer [J]. *World J Surg*, 2008, 32(6): 1225-1226.
- [19] 马 莹, 宋印利, 包 颖. EGFR、HER-2、VEGF 及 IGF-1R 在胃癌组织中的表达及其与临床病理参数相关性分析 [J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(3): 191-194.
- [20] Huang Y, Yang J, Shen J, *et al*. Sphingolipids are involved in *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine-induced epidermal growth factor receptor clustering [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 330(2): 430-438.
- [21] Wang Z, Wang G, Yang J, *et al*. Activation of protein kinase A and clustering of cell surface receptors by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine are independent of genomic DNA damage [J]. *Mutat Res*, 2003, 528(122): 29-36.
- [22] Olayioye M A, Neve R M, Lane H A, *et al*. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer [J]. *EMBO J*, 2000, 19(13): 3159-3167.
- [23] 王立辉, 杨静玉, 吴春福. 胃癌信号转导通路治疗靶点的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(2): 147-50.
- [24] Roberts P J, Der C J. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3291-3310.
- [25] Blume J P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling [J]. *Nature*, 2001, 411(6835): 355-365.
- [26] 周 佳, 周先丽, 梁成钦, 等. 铁皮石斛化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(9): 1292-1295.
- [27] 罗慧玲, 蔡体育, 陈巧伦, 等. 石斛多糖增强脐带血和肿瘤病人外周血 LAK 细胞体外杀伤作用的研究 [J]. 癌症, 2000, 19(12): 1124-1126.
- [28] 刘亚娟. 铁皮石斛多糖对小鼠胚胎干细胞生长的影响及抗癌免疫活性研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2014.
- [29] 刘亚娟, 王诗豪, 张 铭. 铁皮石斛多糖抗癌及免疫活性研究 [J]. 广州化工, 2014, 42(10): 58-60.
- [30] 葛颖华, 王 杰, 杨 锋, 等. 鲜铁皮石斛多糖对 Lewis 肺癌小鼠免疫功能的影响 [J]. 浙江中医杂志, 2014, 49(4): 29-33.
- [31] 王 杰, 葛颖华, 周 萃, 等. 鲜铁皮石斛提取物抗 Lewis 肺癌的机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(8): 953-957.