

铁皮石斛抗肿瘤活性成分的探究

郑秋平¹, 邱道寿², 刘晓津², 蔡时可², 张蕾², 邓瑞云², 罗焕明², 张学武¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广东省农业科学院作物研究所, 广东广州 510640)

摘要: 为了探究铁皮石斛中的抗肿瘤活性成分, 本研究采用乙酸乙酯、95%乙醇、水三种不同极性的溶剂依次对铁皮石斛茎的干燥粉末进行了提取, 初步得到了三种提取物; 初提取物在 MTT 细胞增殖检测结果的指引下, 结合硅胶柱层析、TLC 薄层分析和凝胶柱层析进行分离纯化, 最终筛选出具有强抗肿瘤活性的组分。结果显示乙酸乙酯提取物经分离纯化后得到了最强抗肿瘤活性成分, 其对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖都有明显的抑制效果, 半抑制浓度 IC₅₀ 依次为: 0.45 μg/mL、0.36 μg/mL、0.34 μg/mL, 经波谱学数据鉴定, 该化合物为金钗石斛菲醌。金钗石斛菲醌首次分离自金钗石斛, 其抗肿瘤功效已经得到证实, 并引起了广泛的关注, 本研究成果对以铁皮石斛为原料的药品和保健食品的开发具有重要的指导意义。

关键词: 铁皮石斛; 分离; 纯化; 抗肿瘤活性; 金钗石斛菲醌

文章编号: 1673-9078(2014)5-12-17

Extraction of Anti-tumor Constituents Derived from *Dendrobium officinale*

ZHENG Qiu-ping¹, QIU Dao-shou², LIU Xiao-jin², CAI Shi-ke², ZHANG Lei², DENG Rui-yun²,
LUO Huan-ming², ZHANG Xue-wu¹

(1. College of Light Industry and Food Science, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To explore the anti-tumor constituents from *Dendrobium officinale*, the components extracted with three solvents (ethyl acetate, 95% ethanol and water) were separated and purified by silica gel column chromatography, TLC and Sephadex LH-20, and the whole process was guided by MTT method. Results showed that the strongest activity component named TD1 was achieved by the ethyl acetate extraction, the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2), human gastric carcinoma cell line (SGC 7901) and human breast cancer cell line (MCF-7) were significantly inhibited by TD1 and the IC₅₀ were 0.45 μg/mL, 0.36 μg/mL and 0.34 μg/mL, respectively. TD1 was identified as denbinobin by spectroscopic data. Denbinobin was first isolated from *Dendrobium nobile Lindl.* and its anti-tumor effect has been certified and widely noted in recent years, the results may provide references for the development of new medicine and health food by using *Dendrobium officinale* as raw materials.

Key words: *Dendrobium officinale*; separation; purification; anti-tumor activity; denbinobin

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 为兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生植物, 又名黑节草, 是一种名贵中药, 历代医著如《道藏》、《神农本草经》、《本草纲目拾遗》等均有记载, 被誉为中华九大仙草之首。2012 年版的《中华人民共和国药典》中记载铁皮石斛具有益胃生津、滋阴清热的疗效, 主要用于口干烦渴, 胃阴不足, 病后虚热不退, 阴虚火旺, 骨蒸劳热等症状^[1]。鉴于此, 市场上已经

收稿日期: 2014-01-05

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目 (2011B090400537, 2012B091100168)

作者简介: 郑秋平 (1987-), 男, 硕士, 主要从事抗癌功能食品研究

通讯作者: 张学武 (1963-), 男, 博士, 博导, 主要从事抗癌功能食品研究

有多种以铁皮石斛为原料的药品和保健食品出现。

近十几年来, 研究人员对铁皮石斛进行了大量的研究, 发现铁皮石斛中化学成分多样, 并拥有多种生物活性^[2]。现代医药研究又表明, 铁皮石斛具有抗肿瘤的作用: 马国祥等分析研究了一系列石斛, 发现铁皮石斛中含有毛兰素 (erianin) 和鼓槌菲 (chrysotoxene), 这两个化合物对肝癌和艾氏腹水癌细胞有抑制作用。其中毛兰素对小鼠肝癌的抑制作用最强, 抑瘤率可达到 50.82%; 鼓槌菲对艾氏腹水癌的抑制作用最强, 抑瘤率可达到 62.25%^[3]。李燕对分离纯化到的化合物进行了抗肿瘤活性的初步筛选, 发现联苳类化合物 4, 4'-二羟基-3, 5-二甲氧基联苳对人卵巢癌细胞株 (A2780) 有抑制效果, 4, 4'-二羟基-3, 3', 5-三甲氧基联苳对入胃

癌细胞株 (BGC-823) 和人卵巢癌细胞株 (A2780) 有抑制效果^[4]。上述研究成果大多是采取先分离后筛选活性的技术路线得到的, 缺乏针对铁皮石斛抗肿瘤功效的更为直接深入的研究。本文针对这一不足, 将抗肿瘤活性的筛选和鉴定贯穿实验始终, 即每一步分离纯化后都进行活性筛选, 选取活性最强的组分进行后续分离纯化, 从而确保最终得到抗肿瘤活性最强的组分。本研究成果对以铁皮石斛为原料的药品和保健品的开发具有重要的指导意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

铁皮石斛, 由广东省农科院作物研究所南药室提供; 肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7, 购于中山大学动物细胞实验室。

1.2 主要试剂和仪器设备

1.2.1 实验试剂

石油醚、乙酸乙酯、甲醇、氯仿均为分析纯, 为天津市富宇精细化工有限公司产品; 硅胶 (100~200 目, 200~300 目)、薄层层析板 (GF254), 为青岛海洋化工工厂产品; Sephadex LH-20, 为 Pharmacia 公司产品; DMEM 培养基 (高糖)、新生小牛血清、青霉素、链霉素为美国 Gibco 公司产品; 二甲基亚砜 (DMSO)、MTT (四甲基偶氮唑蓝), 为美国 Amresco 公司产品; 胰蛋白酶, 为美国 Bio Basic Unit 公司产品; 5-氟尿嘧啶, 为上海汉博生物科技有限公司产品。

1.2.2 仪器设备

EYELA 旋转蒸发仪, 托普仪器有限公司; MCO-17AC CO₂ 培养箱, 日本 Sanyo 公司; Sunrise 酶联免疫检测仪, Sunrise 公司; MDF -382E 超低温冰箱, 日本 Sanyo 公司; Allegra X-22R 高速冷冻离心机, 美国 Beckman Coulter 公司; SW-TJ 水平流净化工作台, 苏州市净化设备总厂; LDZX-40BI 自动高压灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; DHG-9075A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海益恒实验仪器有限公司; CK41 倒置显微镜, Olympus 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 溶剂提取

用乙酸乙酯、95%乙醇、水依次对铁皮石斛的原料进行提取, 旋转蒸发浓缩、真空干燥后制成初提物。

1.3.2 分离纯化

硅胶柱层析: 第一次层析选用 100~200 目的硅胶,

柱体积为 750 mL, 上样量为 10 g, 流动相为石油醚-乙酸乙酯-甲醇梯度洗脱。第二次层析选用 200~300 目的硅胶, 柱体积为 400 mL, 上样量为 2 g, 流动相为石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱。第三次层析选用 200~300 目的硅胶, 柱体积为 250 mL, 上样量为 0.7 g, 流动相为氯仿-甲醇梯度洗脱。

Sephadex LH-20 柱层析: 主要用于对单体化合物的进一步纯化, 柱体积为 150 mL, 上样量为 0.2 g, 流动相为甲醇-水梯度洗脱。

TLC 薄层分析: 每次硅胶柱层析后得到的流份都要用 TLC 薄层分析来鉴定结果, 根据分析结果来合并组分相同的流份并为后续分离纯化中流动相的选择提供参考依据。

1.3.3 癌细胞抑制活性检测 (MTT 法)

取对数生长期的细胞, 经胰酶消化后, 调整细胞至 5×10^4 个/mL, 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养; 24 h 后弃去旧培养液, 加 200 μ L 含有不同浓度提取物和分离产物的新鲜培养基, 以 PBS (0.5% DMSO) 为阴性对照, 重复 5 次; 48 h 后吸出药液, 用 PBS 液洗 2 遍, 加入 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L 和新鲜培养基 180 μ L; 继续培养 4 h, 弃去含有 MTT 的培养液, 加入 DMSO 150 μ L 后振荡 15 min, 在 490 nm 处测 OD 值。计算抑制率:

$$\text{癌细胞生长抑制率}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}}) - (\text{OD}_{\text{给药}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})} \times 100$$

1.3.4 统计学方法

采用 Bliss 法计算分离纯化产物对 3 种癌细胞的半数抑制浓度 IC₅₀ 及 95% 的可信线。

2 结果与分析

铁皮石斛原料依次用乙酸乙酯、95%乙醇、水提取得到三种初提物, 根据提取物和分离物对肿瘤细胞增殖的抑制效果, 选择活性较强的组分采用硅胶柱层析和 Sephadex LH-20 进行分离纯化, 从中筛选出强抗肿瘤活性组分。

2.1 初提取物对癌细胞的抑制活性

铁皮石斛的三种初提取物对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制效果如图 1 所示。

由图 1 可知, 三种提取物对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 均表现出抑制活性, 且随着药物浓度的增加, 抑制率也随之增加, 呈现出量效关系。尤其是乙酸乙酯提取物的抗肿瘤活性明显高于其它两种提取物, 对三种癌细胞均表现出

较强的抑制作用。在浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制率分别为: 93%、89%、86%, 而且在低浓度时, 已表现出显著的抑制效果, 表明: 铁皮石斛的乙酸乙酯提取物中含有抗肿瘤活性较强的成分。因此, 选择乙酸乙酯提取物进行下一步分离纯化。乙酸乙酯提取物对三种癌细胞的抑制效果没有明显差异, 但由于在低浓度时即可对胃癌细胞 SGC-7901 表现出明显的抑制作用, 因此本文选取 SGC-7901 作为后续活性筛选的细胞株。

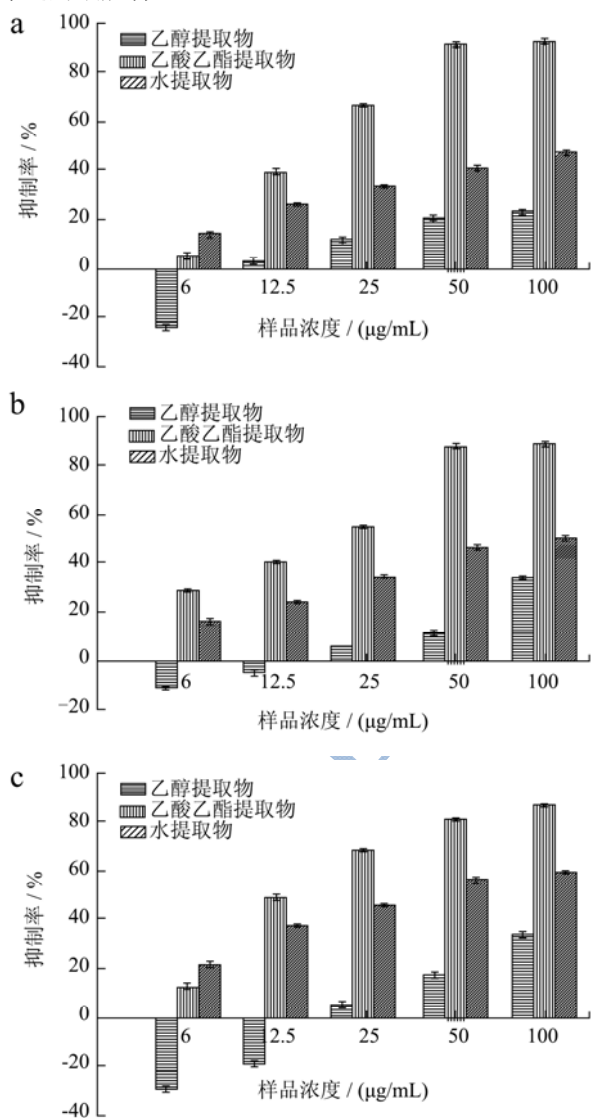


图1 铁皮石斛初提物对 HepG-2(a)、SGC-7901(b) 和 MCF-7(c) 的抑制效果

Fig 1 Anti-proliferation effects of *Dendrobium officinale* extractions on HepG-2(a), SGC-7901(b) and MCF-7(c)

2.2 乙酸乙酯提取物的柱层析产物对癌细胞的抑制活性

乙酸乙酯提取物经过硅胶柱层析, 得到 11 个流份, 再经 TLC 薄层分析后合并成 T1、T2、T3、T4、T5、T6 共六个组分。T1、T2、T3、T4、T5、T6 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制效果如图 2 所示。

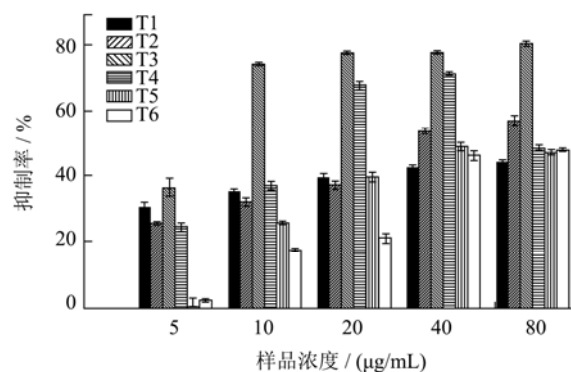


图2 T1、T2、T3、T4、T5、T6 对 SGC-7901 的抑制效果

Fig.2 Anti-proliferation effects of T1, T2, T3, T4, T5 and T6 on SGC-7901 cells

由图 2 可知, T1 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用随着药物浓度的增加没有显著增加, 在 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率为 30%; 在 80 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率为 44%; T2 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用在低浓度 (5 $\mu\text{g/mL}$ ~20 $\mu\text{g/mL}$) 时没有明显变化, 但是在浓度达到 40 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率有了显著提高, 达到 54%; T3 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用显著高于其它组分, 而且在 10 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率就达到了 74%, 说明 T3 中有较强抗肿瘤活性物质存在; T4 也表现出了较强的抗肿瘤活性, 在 40 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率达到最大, 为 71%, 但是随后抑制率便开始下降, 说明 T4 中可能含有促进细胞增殖的成分, 在较高浓度时一定程度上促进了癌细胞的生长; T5 和 T6 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用随浓度的增加均有显著增加, 但是最大抑制率分别为: 49%、48%, 抑制效果不显著。经过分析, 选择 T3 继续进行分离纯化, 以进一步分离得到抗肿瘤活性成分。

2.3 T3 柱层析产物对癌细胞的抑制作用

T3 经过进一步硅胶柱层析得到 T3-1、T3-2、T3-3 共三个组分。T3-1、T3-2、T3-3 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用如图 3 所示。

由图 3 可知, T3-3 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用要明显强于 T3-1 和 T3-2, 当浓度为 16 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率可达 93%。经过计算可知, T3-1、T3-2、T3-3 对胃癌细胞 SGC-7901 的半抑制浓度 IC_{50} 分别为: 14.22 $\mu\text{g/mL}$ 、15.86 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.70 $\mu\text{g/mL}$, 表明 T3-3 中含有强抗肿瘤活性成分。因此, 选择 T3-3 进行下一步分离纯化, 以期得到具有强抗肿瘤活性的化合物。

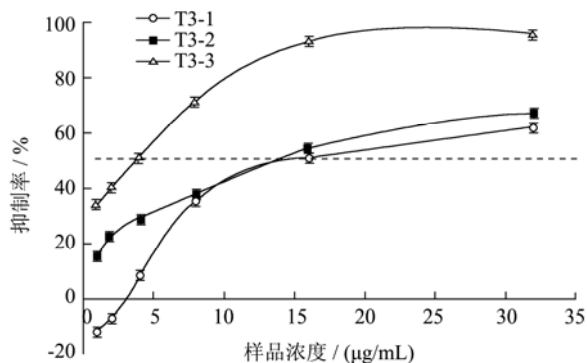


图3 T3-1、T3-2、T3-3对胃癌细胞SGC-7901的抑制效果

Fig 3 Anti-proliferation effect of T3-1, T3-2 and T3-3 on SGC-7901 cells

2.4 T3-3 柱层析产物对癌细胞的抑制作用

T3-3 经过硅胶柱分离, 再经 Sephadex LH-20 纯

化, 得到 TD1 和 TD2 两个组分, TD1 为黑红色片状晶体, TD2 为淡黄色晶体。TD1 和 TD2 对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制效果如表 1 和表 2 所示。采用 Bliss 法计算了 TD1 和 TD2 对三种癌细胞的半抑制浓度 IC₅₀, 结果如表 3 所示。

由表 1 和表 2 可知, TD1 和 TD2 对三种癌细胞均有显著的抑制作用, 抑制率随浓度的增加而增大, 呈剂量依赖关系。由表 4 可知, TD1 对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的半抑制浓度 IC₅₀ 分别为: 0.45 μg/mL、0.36 μg/mL、0.34 μg/mL, 要明显强于阳性对照。TD2 对肝癌细胞 HepG-2 和乳腺癌细胞 MCF-7 的抑制效果比阳性对照略差, 对胃癌细胞 SGC-7901 的抑制效果比阳性对照要强。经过分析可知, TD1 就一直探究的强抗肿瘤活性物质。

表 1 TD1 对三种癌细胞的抑制效果 ($\bar{x} \pm s$, n=5) (%)

Table 1 The anti-proliferation effects of TD1 in 3 cell lines *in vitro*

浓度/(μg/mL)	阴性对照	0.2	0.5	1	2	4	8
HepG-2	0	-	49.93±0.028	67.13±0.003	78.42±0.014	87.11±0.012	91.27±0.008
SGC-7901	0	44.04±0.014	52.87±0.011	64.67±0.004	74.21±0.034	83.83±0.011	90.71±0.004
MCF-7	0	35.07±0.023	54.94±0.005	86.65±0.009	93.53±0.011	95.22±0.006	-

表 2 TD2 对三种癌细胞的抑制效果 ($\bar{x} \pm s$, n=5) (%)

Table 2 The anti-proliferation effects of TD2 in 3 cell lines *in vitro*

浓度/(μg/mL)	阴性对照	2	4	8	16	32
HepG-2	0	16.53±0.025	25.30±0.029	54.03±0.023	77.02±0.011	89.40±0.002
SGC-7901	0	22.71±0.007	34.04±0.027	42.21±0.018	71.64±0.012	84.82±0.006
MCF-7	0	24.40±0.009	45.01±0.012	65.02±0.007	79.20±0.008	91.80±0.005

表 3 5-氟尿嘧啶 (阳性对照) 对三种癌细胞的抑制效果 ($\bar{x} \pm s$, n=5) (%)

Table 3 The anti-proliferation effects of 5-Fluorouracil (positive control) in 3 cell lines *in vitro*

浓度/(μg/mL)	阴性对照	5	10	20	40	80
HepG-2	0	45.53±0.019	58.48±0.023	66.45±0.009	80.39±0.016	81.76±0.007
SGC-7901	0	-	44.24±0.032	54.01±0.054	60.43±0.021	-
MCF-7	0	61.38±0.022	64.63±0.052	71.54±0.047	91.86±0.009	-

表 4 TD1 和 TD2 对三种癌细胞的 IC₅₀

Table 4 The IC₅₀ Value (μg/mL) of TD1 and TD2 on 3 cell lines

	TD1		TD2		5-氟尿嘧啶 (阳性对照)	
	IC ₅₀	95%的可信限/(μg/mL)	IC ₅₀	95%的可信限/(μg/mL)	IC ₅₀	95%的可信限/(μg/mL)
HepG-2	0.45	0.26--0.64	7.24	6.24--8.37	6.19	3.41--8.94
SGC-7901	0.36	0.23--0.49	7.57	6.28--9.08	16.00	1.69--29.44
MCF-7	0.34	0.27--0.41	4.94	4.08--5.84	3.50	1.40--5.44

2.5 TD1 和 TD2 的结构鉴定

为进一步研究上述实验得到的抗肿瘤活性物质, 本文采用波谱学方法对两个化合物的结构进行了鉴定, 结果如下:

化合物 TD1: 黑红色片状晶体, ESI-MS m/z 307 (M+Na), ¹H-NMR (400MHz, in CDCl₃) δ:3.937 (3H, s, H-7-OMe), 3.965 (3H, s, H-3-OMe), 6.155 (1H, s, H-2), 6.822 (1H, s, H-8), 6.934 (1H, s, H-6) 8.073 (1H, d, J=8.5Hz, H-9), 8.138 (1H,

d, $J=8.5\text{Hz}$, H-10), 10.983 (1H, s, 5-OH)。经与文献[4]中的数据对照, 化合物 TD1 鉴定为金钗石斛菲醌 (denbinobin)。

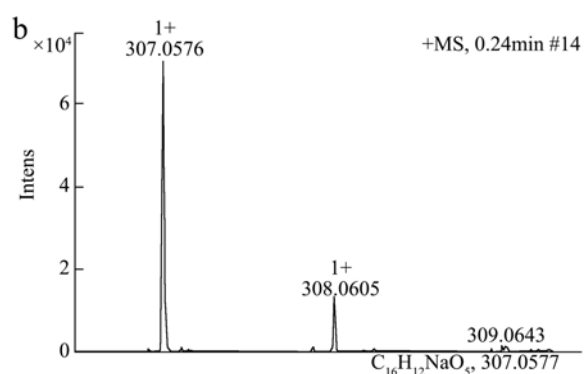
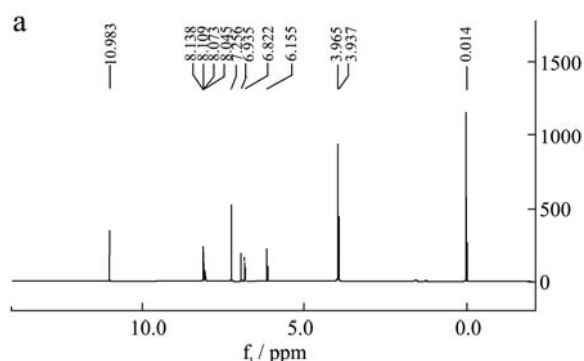


图4 化合物 TD1 的氢谱 (a) 和质谱数据 (b)

Fig 4 ¹H-NMR data (a) and MS data (b) of compounds TD1

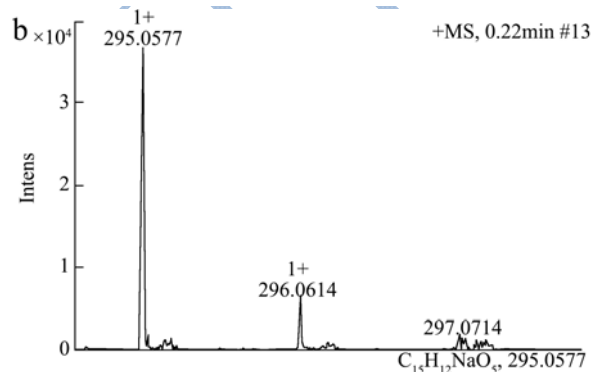
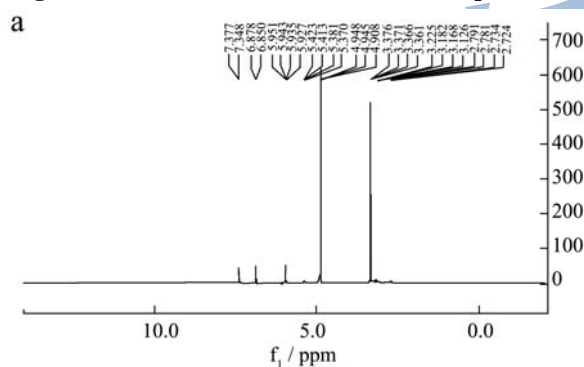


图5 化合物 TD2 的氢谱 (a) 和质谱数据 (b)

Fig 5 ¹H-NMR data (a) and MS data (b) of compounds TD2

化合物 TD2: 淡黄色晶体, ESI-MS m/z 295 (M+Na), ¹H-NMR (400MHz, inCD₃OD) δ :7.377

(2H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-2', 6'), 6.878 (2H, d, $J=8.5\text{Hz}$, H-3', 5'), 5.943 (1H, d, $J=2.2\text{Hz}$, H-8), 5.935 (1H, d, $J=2.2\text{Hz}$, H-6), 5.423 (1H, dd, $J=12.8, 3.0\text{Hz}$, H-2), 3.168 (1H, dd, $J=17.1, 12.8\text{Hz}$, H-3a), 2.781 (1H, dd, $J=17.0, 3.0\text{Hz}$, H-3e)。经与文献[4]中的数据对照, 化合物 TD2 鉴定为柚皮素 (naringenin)。

3 结论

3.1 本研究通过体外抑制癌细胞增殖活性指引, 对铁皮石斛中的抗肿瘤活性成分进行了特异性的分离, 得到了一个具有较强抗肿瘤活性的化合物, 其对肝癌细胞 HepG-2、胃癌细胞 SGC-7901 和乳腺癌细胞 MCF-7 的半抑制浓度 IC₅₀ 分别为: 0.45 $\mu\text{g/mL}$ 、0.36 $\mu\text{g/mL}$ 、0.34 $\mu\text{g/mL}$, 显示了很好的抗肿瘤活性, 而且效果要比 5-氟尿嘧啶显著。经波谱学方法鉴定, 此化合物为金钗石斛菲醌 (denbinobin)。

3.2 金钗石斛菲醌 (denbinobin) 是一种可以有效抑制癌细胞增殖的化合物, 国内外许多学者通过体内和体外实验研究了其对人类胰腺癌 BxPC-3^[5]、结肠癌细胞 COLO 205^[6]、人类白血病细胞 K562^[7]、人类胃癌细胞 SNU-484^[8]、人类结肠直肠癌细胞 HCT-116^[9]、人类肺癌细胞 A549^[10]、人类多形性成胶质细胞瘤^[11]、乳腺癌^[12]的抑制作用, 并结合分子生物学技术对其导致细胞凋亡的机理进行了探究。由此可见, 金钗石斛菲醌 (denbinobin) 作为一种潜在的抗肿瘤药物, 已经引起了广泛的关注。本文的研究成果对以铁皮石斛为原料的药品和保健品的开发具有重要的指导意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012
Chinese pharmacopoeia commission. Pharmacopoeia of the people's republic of China (Volume 1) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2012
- [2] 李娟, 李顺祥, 黄丹, 等. 铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J]. 科技导报, 2011, 29(18): 74-79
LI Juan, LI Shun-xiang, HUANG Dan, et al. Advances in the of resources, constituents and pharmacological effects of dendrobium officinale [J]. Science & Technology Review. 2011, 29(18): 74-79
- [3] 马国祥, 徐国钧, 徐珞珊, 等. 鼓槌石斛及其化学成分的抗肿瘤活性作用[J]. 中国药科大学学报, 1994, 25(3): 188-189
MA Guo-xiang, XU Guo-jun, XU Luo-shan, et al. Anti-tumor effects of Dendrobium chrysotoxum and its chemical components [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 1994,

- 25(3): 188-189
- [4] 李燕. 铁皮石斛化学成分的研究[D]. 北京: 北京协和医学院中国医学科学院, 2009
- Li Yan. Studies on the chemical constituents of *dendrobium candidum* [D]. Beijing: Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, 2009
- [5] Yang C R, Guh J H, Teng C M, et al. Combined treatment with denbinobin and fas ligand has a synergistic cytotoxic effect in human pancreatic adenocarcinoma BxPC-3 cells [J]. *British journal of pharmacology*, 2009, 157(7): 1175-1185
- [6] Yang K C, Uen Y H, Suk F M, et al. Molecular mechanisms of denbinobin-induced anti-tumorigenesis effect in colon cancer cells [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(20): 30-40
- [7] Huang Y C, Guh J H, Teng C M. Denbinobin-mediated anticancer effect in human K562 leukemia cells: role in tubulin polymerization and Bcr-Abl activity [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2005, 12(1): 113-121
- [8] Song J I, Kang Y J, Yong H Y, et al. Denbinobin, a phenanthrene from *Dendrobium nobile*, inhibits invasion and induces apoptosis in SNU-484 human gastric cancer cells [J]. *Oncology Reports*, 2012, 27(3): 813-818
- [9] Chen T H, Pan S L, Guh J H, et al. Denbinobin induces apoptosis by apoptosis-inducing factor releasing and DNA damage in human colorectal cancer HCT-116 cells [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2008, 378(5): 447-457
- [10] Kuo C T, Hsu M J, Chen B C, et al. Denbinobin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells via Akt inactivation, bad activation, and mitochondrial dysfunction [J]. *Toxicology Letters*, 2008, 177(1): 48-58
- [11] Weng Hsing-Yu, Hsu Ming-Jen, Chen Chien-Chih, et al. Denbinobin induces human glioblastoma multiforme cell apoptosis through the IKK alpha-Akt-FKHR signaling cascade [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2013, 698(1): 103-109
- [12] Chen P H, Peng C Y, Pai H C, et al. Denbinobin suppresses breast cancer metastasis through the inhibition of Src-mediated signaling pathways [J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2011, 22(8): 732-740