

小白菊内酯增强伏立诺他抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的机制

王玉青, 纪梦颖, 郭乔如, 韦 荣, 高 玥, 陶移文, 张建业*

(广州医科大学药学院, 广东省分子靶标与临床药理学重点实验室, 广东 广州 511436)

摘要: 本研究考察了小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 与组蛋白去乙酰化酶抑制剂伏立诺他 (vorinostat, suberoyl-anilide hydroxamic acid, SAHA) 对非小细胞肺癌 A549 增殖的协同作用及作用机制。采用 CCK-8 (cell counting kit-8) 和集落形成实验检测 PTL 和 SAHA 的协同作用和细胞增殖情况; 细胞划痕实验检测 A549 细胞的迁移能力; Annexin V-FITC/PI (fluorescein isothiocyanate isomer/propidium iodide) 流式细胞术实验和 Western blot 实验检测细胞凋亡情况并探索抗肿瘤作用机制。结果表明, PTL 和 SAHA 通过协同作用增强了对 A549 细胞的增殖和迁移的抑制作用, 且联合用药组抑制作用明显强于单药组。PTL 协同 SAHA 通过调节 p53 和 c-myc 通路诱导细胞凋亡, 影响凋亡相关蛋白 PARP (poly ADP-ribose polymerase)、caspase-9 (cysteiny l aspartate specific proteinase-9) 和 caspase-3 的表达。上述研究结果表明, PTL 与 SAHA 联合用药具有协同作用, 可诱导 A549 细胞凋亡并抑制细胞的增殖, 对非小细胞肺癌治疗新方法的研究具有潜在价值。

关键词: 小白菊内酯; 伏立诺他; 协同作用; 非小细胞肺癌; 机制

中图分类号: R962 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)09-2151-06

The mechanism of parthenolide strengthen vorinostat on inhibiting the proliferation of A549 non-small cell lung cancer cells

WANG Yu-qing, JI Meng-ying, GUO Qiao-ru, WEI Rong, GAO Yue, TAO Yi-wen, ZHANG Jian-ye*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Molecular Target and Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China)

Abstract: This research explored the synergistic effects and the mechanism of parthenolide (PTL) and vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) on the proliferation of A549 non-small cell lung cancer cells. The combination effect of PTL and SAHA was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) and colony formation assays. Scratch test was performed to detect cell migration. Annexin V-fluorescein isothiocyanate isomer/propidium iodide (FITC/PI) flow cytometry and Western blot analyses were used to determine cell apoptosis and its mechanism. The results showed that combination of PTL and SAHA inhibited the proliferation and migration of A549 with a synergistic effect compared to the single-drug groups. The combination of PTL and SAHA had synergistic effect to induce cell apoptosis by regulating p53 and c-myc pathways, and affected the expression levels of poly ADP-ribose polymerase (PARP), cysteinyl aspartate specific proteinase (caspase)-9, and caspase-3. Taken together, this study shows that combination of PTL and SAHA has synergistic effect, induces cell apoptosis and inhibits A549 proliferation, which is likely to be a novel strategy for the treatment of non-small cell lung cancer.

Key words: parthenolide; vorinostat; synergistic effect; non-small cell lung cancer; mechanism

收稿日期: 2020-06-19; 修回日期: 2020-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903467); 广州市科技计划项目 (202002030410); 广州医科大学 2020 年度大学生实验室开放项目 (PX-1020418).

*通讯作者 Tel: 86-20-37103631, E-mail: jianyez@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1034

非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 是肺癌的一种, 约占肺癌发病的 85%, 分为腺癌、大细胞癌和鳞状细胞癌等^[1,2], 近年来发病率和死亡率均呈上升趋势, 严重威胁着人类健康。目前, 人们在治疗 NSCLC 方面已经取得重要进展, 靶向治疗和免疫治疗等方法明显提高了 5 年成活率, 但随着高复发率、转移和耐药等问题的出现^[3], 高效、廉价和低不良反应的新型治疗方案仍是迫切需要的。组蛋白去乙酰化酶抑制剂 (histone deacetylase inhibitor, HDACi) 可干扰组蛋白的去乙酰化功能, 使染色质松弛并影响转录因子的转录, 可以诱导肿瘤细胞的周期阻滞和细胞凋亡, 在肿瘤治疗中发挥着重要作用^[4,5]。伏立诺他 (vorinostat, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA), 化学名 *N*-羟基-*N'*-苯基辛二酰胺, 是最早上市的 HDACi, 最初用于治疗皮肤 T 淋巴细胞瘤^[6]。虽然研究表明 SAHA 可抑制多种肿瘤细胞增殖 (包括淋巴瘤、多发性骨髓瘤、白血病和非小细胞肺癌等), 但临床试验显示 HDACi 单药活性较低。为了增强 SAHA 的抗肿瘤活性, 将 SAHA 与其他药物联用已成为重要的恶性肿瘤治疗方案^[7-9]。

随着我国中药研究的逐渐深入, 从中药中提取的活性抗肿瘤成分具有多靶点治疗的优势, 逐步引起人们的重视。小白菊内酯 (parthenolide, PTL) 是从艾菊和小白菊等药用植物中提取分离到的倍半萜内脂类化合物, 具有抗炎、调节免疫、治疗头痛和风湿等功效^[10]。前期研究表明^[11,12], PTL 能够通过 NF- κ B (nuclear factor kappa-B) 和 c-myc 等通路抑制肿瘤细胞增殖与迁移, 诱导细胞凋亡。本研究主要探讨了 PTL 协同 SAHA 增强对非小细胞肺癌细胞 A549 的抑制活性及机制。

材料与方法

细胞系 人非小细胞肺癌细胞 A549 购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

药物与试剂 PTL (纯度 >98%, 南京春秋生物工程有限公司); 伏立诺他 (上海碧云天生物技术有限公司); DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 高糖培养基、胰酶和青链霉素 (杭州吉诺生物医药技术有限公司); 胎牛血清 (fetal bovine serum, 美国 Gibco 公司); 细胞增殖与毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8, 广州求真生物科技有限公司); 细胞凋亡试剂盒 (Annexin V-fluorescein isothiocyanate isomer/propidium iodide, AnnexinV-FITC/PI, 杭州联科生物技术有限公司); 结晶紫 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 抗体 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, CST-5174T)、p53 (CST-2527T)、c-myc (CST-18583)、PARP (poly ADP-ribose polymerase, CST-

9532T)、cleaved PARP (CST-5625T)、caspase-9 (cyste-inyl aspartate specific proteinase-9, CST-9508T)、cleaved caspase-9 (CST-7237T)、caspase-3 (CST-9668T) 和 cleaved caspase-3 (CST-9661S) (美国 Cell Signaling Technology 公司); 化学发光试剂盒 (武汉塞维尔生物科技有限公司); 其他试剂均为分析纯试剂。

主要仪器 CO₂ 细胞培养箱和 NanoDrop 1000 Spectrophotometer (美国 Thermo Scientific 公司); SW-CJ-2FD 洁净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); 台式低速离心机 (湖南星科科学仪器有限公司); XDS-2 倒置显微镜 (广州粤显光学仪器有限公司); 酶标仪 (BioTek 公司); CKX5 光学显微镜 (Olympus 公司); 凝胶成像仪 (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad 公司); CytoFLEX 流式细胞仪 (美国贝克曼库尔特有限公司)。

细胞培养与试剂配制 人非小细胞肺癌细胞 A549 培养于含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养基中, 培养于 37 °C、含 5% CO₂ 的饱和湿度细胞培养箱。PTL 和 SAHA 用 DMSO 溶解配制母液, 给药时用 DMEM 稀释成不同的浓度。

CCK-8 法检测细胞存活率 将处于对数生长期的 A549 细胞以每孔 4 000 个接种于 96 孔板中, 置于 37 °C、5% 的 CO₂ 环境中培养过夜, 加入不同浓度的 PTL 和 SAHA, 分别培养 24、48 和 72 h。向每孔中加入 100 μ L 含有 10% CCK-8 的细胞培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱孵育 2 h, 酶标仪测试各孔 450 nm 处的吸光度 (*A*), 计算细胞存活率; 细胞存活率 (cell viability rate) = (*A*_{用药组} - *A*_{空白组}) / (*A*_{对照组} - *A*_{空白组}) \times 100%。

集落形成实验检测 A549 细胞的克隆形成能力 将对数生长期的 A549 细胞以每皿 1 000 个接种于细胞 35 mm 培养皿中, 细胞贴壁后加入不同浓度的 PTL 和 SAHA, 置于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养 14 天后, 弃去培养液, 向每皿中加入 4% 多聚甲醛固定液, 随后加入 0.1% 的结晶紫染色液, 晾干、拍照、计算细胞集落形成数目。

细胞划痕实验检测 A549 细胞的迁移能力 将对数生长期的 A549 细胞以每孔 20 万个接种于 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养至细胞融合度达到约 85% 时, 10 μ L 移液器吸头对培养板底部均匀划痕, 用无血清培养液洗去被划下的细胞。随后在 6 孔板中加入溶解有不同浓度 PTL 和 SAHA 的无血清培养液, 记为 0 h, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱继续培养, 并用显微镜观察和拍摄各组细胞在 0、24、48 和 72 h 细胞划痕的状态, 计算划痕愈合率 (migration rate%) = (1 - 某一时间点划痕面积 / 0 h 划痕面积) \times 100%。

流式细胞术检测细胞凋亡 将处于对数生长期的

A549 细胞以每孔 20 万个接种于 6 孔板中, 置于 37 °C、5% CO₂ 环境中培养过夜, 加入不同浓度的 PTL 和 SAHA 培养 48 h 后, 用胰酶消化细胞, 离心, 弃去上清, 用磷酸盐缓冲液重悬洗涤, 加入 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒染料, 避光孵育 20 min, 使用流式细胞仪分析细胞凋亡。

Western blot 法检测相关蛋白表达 将处于对数生长期的 A549 细胞接种于 6 孔板中, 接种密度为每孔 20 万个, 置于 37 °C、5% 的 CO₂ 环境中培养使细胞完全贴壁后, 加入溶解有 PTL 和 SAHA 细胞培养液, 继续培养 48 h 后, 用胰酶消化离心收集细胞, 加入蛋白酶抑制剂和 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液, 冰浴裂解 30 min, 提取细胞总蛋白。测定蛋白含量后, 取 20 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转膜, 5% 牛血清白蛋白 (用含 0.1% Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液稀释) 封闭 1 h, 分别加入一抗 GAPDH (1:2 000)、p53 (1:1 000)、c-myc (1:1 000)、PARP (1:1 000)、cleaved PARP (1:1 000)、caspase-9 (1:1 000)、cleaved caspase-9 (1:1 000)、caspase-3 (1:1 000) 和 cleaved caspase-3 (1:1 000) 于 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 分别加入对应的辣根过氧化物酶标记二抗 (1:10 000) 2 h, TBST 洗膜 3 次, 化学发光法显影后, 得到蛋白免疫印迹条带。以 GAPDH 蛋白条带作为参照。

统计学分析 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 每项实验至少重复 3 次。使用 GraphPad Prism 5.0 统计软件进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

1 SAHA 和 PTL 对 A549 细胞增殖的影响

如 CCK-8 实验结果所示 (图 1), 与对照组相比, SAHA 和 PTL 对体外培养的 A549 细胞的增殖均具有抑制作用, 且具有浓度依赖性和时间依赖性。SAHA 作用于 A549 细胞 24、48 和 72 h 的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 分别为 24.3、9.2 和 3.9 μmol·L⁻¹; PTL 作用于 A549 细胞 24、48 和 72 h 的 IC₅₀ 分别为 59.5、16.7 和 8.6 μmol·L⁻¹。

2 PTL 协同 SAHA 抑制 A549 细胞增殖

如 CCK-8 实验结果所示 (图 2A), 与单用 SAHA 组相比, SAHA 与 2、4 和 8 μmol·L⁻¹ 的 PTL 联用, 能够明显增强 SAHA 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的能力。为了进一步明确 PTL 与 SAHA 的协同作用, 应用 CompuSyn 软件计算各实验组的联合指数 (combination index, CI), 当 CI < 0.9 时, 具有协同效应; 当 CI 介于 0.9~1.1 时, 具有叠加作用。如表 1 和图 2B 所示, 在 A549 细胞中 PTL 与 SAHA 联用, 大部分 CI < 0.9, 因此 PTL 与 SAHA 联用能够协同抑制 A549 细胞的增殖, 其中给药浓度为 SAHA 4 μmol·L⁻¹ 和 PTL 8 μmol·L⁻¹ 时, 协同效率最高。

3 PTL 协同 SAHA 对 A549 细胞集落形成的影响

细胞集落形成实验结果表明 (图 3), PTL (8 μmol·L⁻¹) 和 SAHA (4 μmol·L⁻¹) 协同作用, 能够显著降低 A549 细胞集落数量, 说明 PTL 协同 SAHA 可以抑制 A549 细胞的集落形成能力。

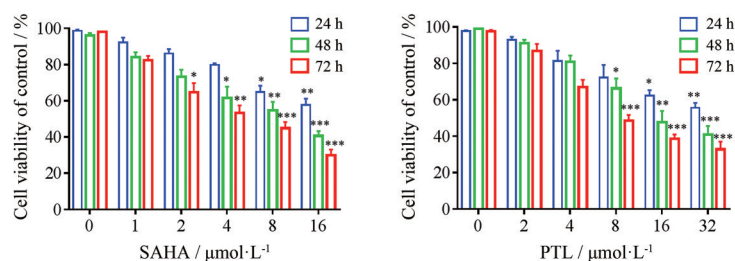


Figure 1 The proliferation of A549 cells after treated by SAHA or PTL in 24, 48, or 72 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group. SAHA: Vorinostat, suberoylanilide hydroxamic acid; PTL: Parthenolide

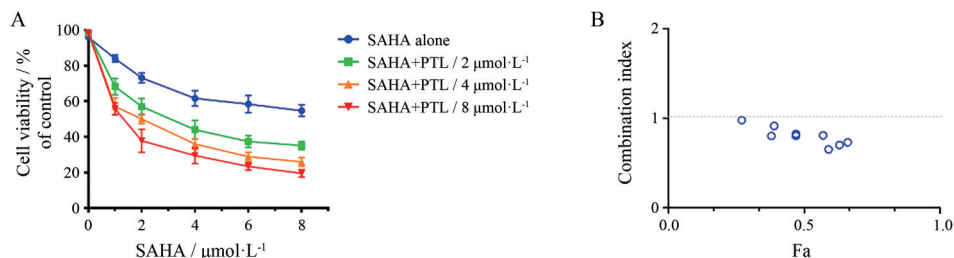


Figure 2 The synergistic effects of PTL and SAHA on the proliferation of A549 non-small cell lung cancer cells. A: Effects of different concentrations of PTL combined with SAHA on the proliferation of A549 cells; B: The combination index (CI) values of PTL and SAHA in A549 cells

Table 1 The CI values of PTL and SAHA in A549 cells

PTL/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SAHA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CI
2.0	2.0	0.979 \pm 0.022
2.0	4.0	0.914 \pm 0.021
2.0	8.0	0.878 \pm 0.030
4.0	2.0	0.871 \pm 0.014
4.0	4.0	0.864 \pm 0.027
4.0	8.0	0.802 \pm 0.035
8.0	2.0	0.893 \pm 0.016
8.0	4.0	0.782 \pm 0.045
8.0	8.0	0.830 \pm 0.031

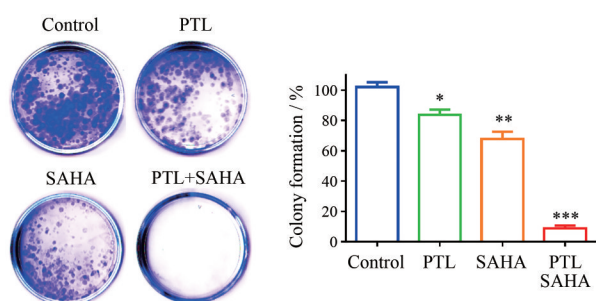


Figure 3 PTL combined with SAHA inhibit the colony formation of A549 cells *in vitro*. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

4 PTL协同SAHA对A549细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示(图4),空白对照组在24、48和72 h细胞划痕面积逐渐减小,至72 h时,划痕基本愈合;SAHA和PTL单独用药对划痕的愈合有一定

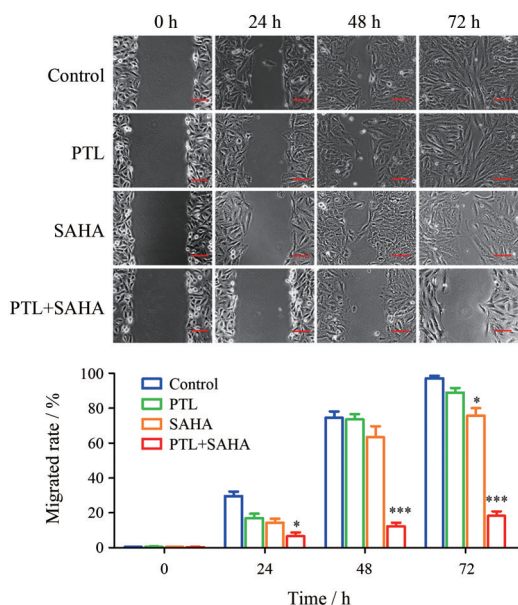


Figure 4 PTL combined with SAHA could decrease the migrative ability of A549 cells *in vitro*. Cells were damaged by mechanical scraping. Representative monolayer images of cell migration in the wound scrape model at 0, 24, 48, and 72 h are shown. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group. Scale bar: 100 μm

的抑制作用;PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)协同作用时,细胞划痕的愈合能力明显减弱,说明PTL和SAHA协同作用能有效抑制A549细胞的迁移能力。

5 PTL协同SAHA对p53和c-myc蛋白表达水平的影响

通过Western blot法检测PTL与SAHA联合用药对p53和c-myc表达的影响,研究PTL与SAHA联合用药抑制A549细胞增殖的作用机制。结果显示(图5),PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)以及PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理A549细胞后,PTL或SAHA单独给药后,p53的表达水平少量增加,c-myc的表达水平基本不变;PTL与SAHA联合用药显著增加了p53的表达水平,显著降低了c-myc的表达水平。

6 PTL增强了SAHA诱导A549细胞凋亡

流式细胞实验结果显示(图6),与空白对照组相比,SAHA和PTL单独用药可少量诱导A549细胞凋亡;PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)协同作用时,凋

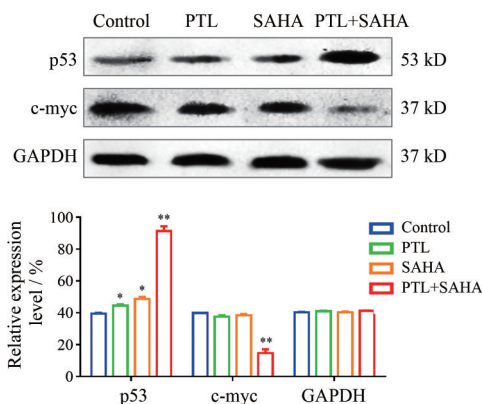


Figure 5 Effects of PTL combined with SAHA on protein expression levels of p53 and c-myc in A549 cells, which were quantitatively analyzed. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

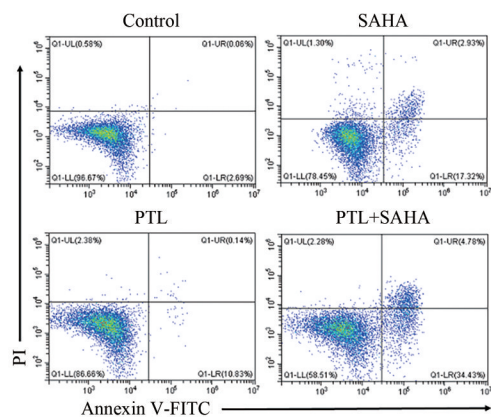


Figure 6 PTL combined with SAHA induces apoptosis of A549 cells *in vitro*. PI: Propidium iodide; Annexin V-FITC: Annexin V-fluorescein isothiocyanate isomer

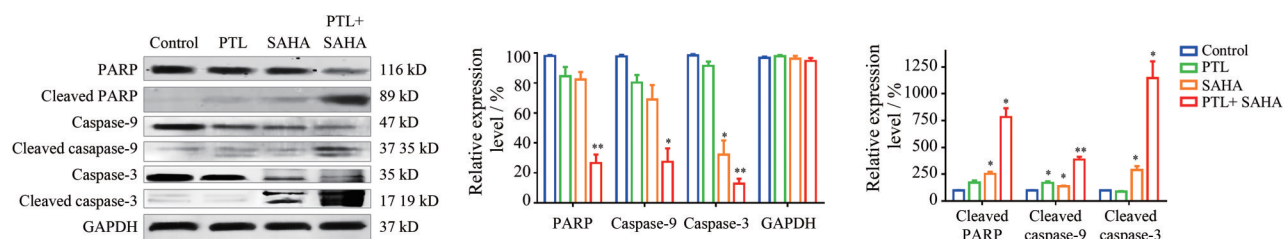


Figure 7 Effects of PTL combined with SAHA on the expression of PARP, cleaved PARP, caspase-9, cleaved caspase-9, caspase-3, and cleaved caspase-3 in A549 cells. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

亡细胞百分比达到39.21%,说明PTL和SAHA联用能够明显增强SAHA诱导A549细胞凋亡。

Western blot法检测PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)以及PTL ($8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)联合SAHA ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后,A549细胞中PARP、cleaved PARP、caspase-9、cleaved caspase-9、caspase-3和cleaved caspase-3蛋白的表达情况。结果显示(图7),PTL联合SAHA作用于A549细胞显著下调了凋亡相关蛋白PARP、caspase-9和caspase-3蛋白的表达,激活了cleaved PARP、cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白的表达。

讨论

肺癌已成为全球新发癌症中发病率最高的疾病,且逐渐向年轻人群发展,在临床治疗上随着治疗的推进,现有治疗方法会出现耐药和预后效果差等问题。因此,人们一直在探索肺癌治疗的新药物和新方法。伏立诺他作为最早上市的HDACi,有研究表明SAHA的单药活性较低且具有明显不良反应,为了增强SAHA的抗肿瘤活性,将SAHA与其他药物联用已经成为重要的恶性肿瘤治疗方案^[7-9],如SAHA与紫杉醇联用可以增加对A549细胞的抑制作用^[13]。

在肺癌的发病机制中,细胞凋亡起着重要作用,细胞凋亡与增殖之间的失衡会导致肿瘤的发生^[14,15]。肿瘤细胞凋亡的启动主要依赖凋亡受体通路或线粒体通路两种途径,可能会受到Bcl-2、p53、c-myc或caspase家族蛋白的调控。其中,caspase家族扮演着重要的角色,caspase蛋白可以直接诱导细胞凋亡,也可以再次激活细胞内第二信使,影响细胞内Bax和c-myc的表达并作用于线粒体再诱导细胞凋亡^[16]。本研究结果表明,PTL与组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA的联合用药调控了A549细胞中的p53和c-myc信号通路,进而激活caspase凋亡途径并促进细胞凋亡。

中药现代化研究发现,中药辅助疗法是肿瘤治疗的有效途径之一^[17]。多项研究表明,中药活性成分或提取物能够抑制肿瘤细胞增殖,部分中药活性成分与目前药物联合使用具有协同作用^[18-20],一些补气益气

中药联合化疗可延长晚期NSCLC患者的生存期^[21]。从栀子中提取的天然产物京尼平(genipin)通过自噬增加奥沙利铂诱导的胃癌细胞死亡^[16]。天然的黄酮苷柚皮苷可以抑制氧化应激和炎症反应,与阿托伐他汀联合用药抑制前列腺癌的发展^[22]。人参皂苷的苷元20(S)-原菑甲酚和表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)联合用药,通过减少硬脂酰辅酶A脱氢酶1(stearoyl-CoA desaturase 1, SCD1)诱导的脂质积累,克服了非小细胞肺癌细胞对EGFR-TKI的耐药性^[23]。黄酮类化合物槲皮素和伊立替康联合治疗可显著下调血管生成相关因子,在体内外抑制胃癌细胞的转移^[24]。本研究探讨了从小白菊中提取的PTL联合SAHA对非小细胞肺癌细胞的抑制作用。

PTL作为中药来源的活性小分子,对人体正常细胞的细胞毒性极弱,具有联合其他药物增强抗肿瘤活性的发展潜力。研究表明,PTL可以诱导多种肿瘤细胞增殖,如Li等^[25]研究结果显示,PTL可以通过ROS/4E-BP1(reactive oxygen species/4E binding protein 1)信号通路诱导自噬小体聚集,降低LC3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)和p62(sequestosome 1)蛋白的表达,最终抑制细胞增殖。Bai等^[26]研究结果表明,PTL通过PI3K/Akt(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B)信号通路,调节Bcl-2、Bax、caspase-3和MMP-9(matrix metalloproteinase 9)等的表达,抑制非小细胞肺癌细胞株H1975的增殖与侵袭。Ou等^[27]研究结果表明,PTL通过抑制NF- κ B水平,诱导食管鳞癌KYSE150细胞凋亡,并抑制细胞增殖和迁移。

本研究显示,PTL与组蛋白去乙酰化酶抑制剂SAHA联合用药,对非小细胞肺癌A549细胞的增殖抑制和凋亡具有协同效应,并探讨了其可能的作用机制为:PTL协同SAHA诱导p53上调,下调c-myc的表达,协同激活了PARP、caspase-9和caspase-3凋亡通路。综上所述,本研究为NSCLC治疗新方案的开发中PTL与SAHA的联合用药提供了实验依据。

作者贡献:王玉青是本文的第一作者,负责实验设计、实

验的操作及论文初稿撰写;纪梦颖是本文的第二作者,负责肿瘤细胞的增殖抑制实验;郭乔如负责文献的调研及整理;韦荣和高玥负责实验中肿瘤细胞的培养和细胞划痕实验;陶移文负责论文初稿的修改;张建业为本文的通讯作者,负责实验设计和把关及稿件修改等工作。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] The Lancet. GLOBOCAN 2018: counting the toll of cancer [J]. Lancet, 2018, 392: 985.
- [2] Cagle PT, Allen TC, Olsen RJ. Lung cancer biomarkers: present status and future developments [J]. Arch Pathol Lab Med, 2013, 137: 1191-1198.
- [3] Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer [J]. Nature, 2018, 553: 446-454.
- [4] Tang F, Choy E, Tu C, et al. Therapeutic applications of histone deacetylase inhibitors in sarcoma [J]. Cancer Treat Rev, 2017, 59: 33-45.
- [5] Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, et al. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA [J]. Cell, 1993, 72: 73-84.
- [6] Duvic M, Talpur R, Ni X, et al. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) [J]. Blood, 2007, 109: 31-39.
- [7] Gray JE, Saltos A, Tanvetyanon T, et al. Phase I/II study of pembrolizumab plus vorinostat in advanced/metastatic non-small cell lung cancer [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25: 6623-6632.
- [8] Piro G, Roca MS, Bruzzese F, et al. Vorinostat potentiates 5-fluorouracil/cisplatin combination by inhibiting chemotherapy-induced EGFR nuclear translocation and increasing cisplatin uptake [J]. Mol Cancer Ther, 2019, 18: 1405-1417.
- [9] Teknos TN, Grecula J, Agrawal A, et al. A phase 1 trial of vorinostat in combination with concurrent chemoradiation therapy in the treatment of advanced staged head and neck squamous cell carcinoma [J]. Invest New Drugs, 2019, 37: 702-710.
- [10] Tsai TY, Chan P, Gong CL, et al. Parthenolide-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblasts involves oxidative stress [J]. Acta Cardiol Sin, 2015, 31: 33-41.
- [11] Dawood M, Ooko E, Efferth T. Collateral sensitivity of parthenolide *via* NF- κ B and HIF- α inhibition and epigenetic changes in drug-resistant cancer cell lines [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 542.
- [12] Lin MT, Bi H, Yan YY, et al. Parthenolide suppresses non-small cell lung cancer GLC-82 cells growth *via* B-Raf/MAPK/Erk pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8: 23436-23447.
- [13] Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, et al. Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells [J]. Int J Cancer, 2010, 126: 743-755.
- [14] Lin M, Tang S, Zhang C, et al. Euphorbia factor L2 induces apoptosis in A549 cells through the mitochondrial pathway [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7: 59-64.
- [15] Sha M, Mao G, Wang G, et al. DZNep inhibits the proliferation of colon cancer HCT116 cells by inducing senescence and apoptosis [J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5: 188-193.
- [16] Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in cell death, inflammation, and disease [J]. Immunity, 2019, 50: 1352-1364.
- [17] Yeh MH, Wu HC, Lin NW, et al. Long-term use of combined conventional medicine and Chinese herbal medicine decreases the mortality risk of patients with lung cancer [J]. Complement Ther Med, 2020, 52: 102427.
- [18] Kim BR, Jeong YA, Kim DY, et al. Genipin increases oxaliplatin-induced cell death through autophagy in gastric cancer [J]. J Cancer, 2020, 11: 460-467.
- [19] Liu Y, Lin F, Chen Y, et al. Cryptotanshinone inhibits bladder cancer cell proliferation and promotes apoptosis *via* the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. J Cancer, 2020, 11: 488-499.
- [20] Wang A, Jiang H, Liu Y, et al. Rhein induces liver cancer cells apoptosis *via* activating ROS-dependent JNK/Jun/caspase-3 signaling pathway [J]. J Cancer, 2020, 11: 500-507.
- [21] Gong Y, Xu Z, Jin C, et al. Treatment of advanced non-small-cell lung cancer with Qi-nourishing essence-replenishing Chinese herbal medicine combined with chemotherapy [J]. Biol Proced Online, 2018, 20: 9.
- [22] Wu X, Huang Z, Liu J, et al. Effects and mechanism of inhibition of naringin in combination with atorvastatin on prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. Phytochem Lett, 2019, 32: 168-176.
- [23] Huang Q, Wang Q, Li D, et al. Co-administration of 20(S)-protopanaxatriol (g-PPT) and EGFR-TKI overcomes EGFR-TKI resistance by decreasing SCD1 induced lipid accumulation in non-small cell lung cancer [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38: 129.
- [24] Lei CS, Hou YC, Pai MH, et al. Effects of quercetin combined with anticancer drugs on metastasis-associated factors of gastric cancer cells: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. J Nutr Biochem, 2018, 51: 105-113.
- [25] Li J, Kong LQ, Xiao B, et al. Effect of parthenolide on the proliferation and apoptosis in cervical cancer cells and its mechanism [J]. Cent South Pharm (中南药学), 2019, 17: 1596-1599.
- [26] Bai XJ, Zhu ML, Li BH, et al. Effect of parthenolide on apoptosis, invasion and migration of human non-small cell lung cancer H1975 cells [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2019, 35: 673-679.
- [27] Ou W, Long J, Jin D, et al. Effects of parthenolide on proliferation, invasion, migration and apoptosis of human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cell line [J]. Anti Tumor Pharm (肿瘤药), 2020, 10: 34-39, 72.