

## 达拉非尼联合曲美布单抗对黑色素瘤的治疗作用及机制研究

王晓松, 刘云娇, 周瑾, 张倩倩, 孟令杰

### Effect and mechanism of dabrafenib combined with tremelimumab on melanoma

WANG Xiaosong, LIU Yunjiao, ZHOU Jin, ZHANG Qianqian, MENG Lingjie

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.2097-2024.202504070>

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 基于UHPLC-Q/TOF-MS代谢组学策略的葛根-知母药对防治阿尔茨海默病的药效与作用机制研究

Study on the pharmacological effects and mechanism of Gegen-Zhimu herb pair in preventing and treating Alzheimer's disease by UHPLC-Q/TOF-MS metabolomics strategy

药学实践与服务. 2025, 43(1): 30-40 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202409035](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202409035)

#### 基于网络药理学和分子对接技术探究定清片活性成分治疗白血病的作用机制

Mechanism of effective ingredients of Dingqing tablets in the treatment of leukemia based on network pharmacology and molecular docking technology

药学实践与服务. 2024, 42(11): 479-486 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202401073](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202401073)

#### 小檗碱与氟康唑合用抗氟康唑耐受白念珠菌的研究

Study on the effect of berberine combined with fluconazole on fluconazole-tolerant *Candida albicans* strains

药学实践与服务. 2025, 43(2): 87-91 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202409047](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202409047)

#### 通便灵胶囊治疗便秘的药效与机制研究

Study on the efficacy and mechanism of Tongbianling capsule in the treatment of constipation

药学实践与服务. 2025, 43(1): 10-16 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202404008](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202404008)

#### ORM1促肝细胞增殖的作用及其机制探索

Exploration of the role and mechanism of ORM1 in promoting hepatocyte proliferation

药学实践与服务. 2025, 43(5): 222-227 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202410014](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202410014)

#### 新斯的明与山莨菪碱联合应用对肺型氧中毒的保护作用及其机制的研究

Protective effect and mechanisms of neostigmine in combination with anisodamine against pulmonary oxygen toxicity

药学实践与服务. 2024, 42(10): 433-438, 444 DOI: [10.12206/j.issn.2097-2024.202310049](https://doi.org/10.12206/j.issn.2097-2024.202310049)



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

## · 论著 ·

## 达拉非尼联合曲美布单抗对黑色素瘤的治疗作用及机制研究

王晓松<sup>1</sup>, 刘云娇<sup>2</sup>, 周瑾<sup>2</sup>, 张倩倩<sup>2</sup>, 孟令杰<sup>1</sup> (1. 遵义医科大学实验动物中心, 贵州 遵义 563006; 2. 上海市宝山区罗店医院药剂科, 上海 201900)

**【摘要】** 目的 探讨达拉非尼(DAB)联合曲美布单抗(TREM)在黑色素瘤治疗中的作用及机制。方法 通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法、乳酸脱氢酶(LDH)法和划痕实验, 评估 DAB 联合 TREM 对 A375 细胞生长活力、细胞毒性及迁移能力的影响, 同时检测活性氧(ROS)、三磷酸腺苷(ATP)、丙二醛(MDA)以及超氧化物歧化酶(SOD)水平, 评价联合用药对细胞氧化应激和能量代谢的影响。利用 A375 荷瘤裸鼠模型评估联合用药抑制体内肿瘤生长的效果, 并采用原位末端转移酶标记(TUNEL)法及增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化染色分析肿瘤组织细胞凋亡与细胞增殖的程度。结果 DAB 联合 TREM 显著抑制 A375 细胞生长活力与细胞迁移能力, 并增强细胞毒性作用; 显著提高 ROS 水平, 降低 ATP、MDA 和 SOD 水平; 有效抑制荷瘤裸鼠体内肿瘤生长, 提高肿瘤组织细胞凋亡率并抑制细胞增殖程度。结论 DAB 联合 TREM 可能通过增强氧化应激、抑制能量代谢和促进细胞凋亡等机制, 提高黑色素瘤治疗效果。该联合疗法可能为克服单一药物治疗的局限性提供一种新的治疗策略。

**【关键词】** 达拉非尼; 曲美布单抗; 黑色素瘤; 联合用药; 作用机制

**【文章编号】** 2097-2024(2025)10-0496-07

**【DOI】** 10.12206/j.issn.2097-2024.202504070

## Effect and mechanism of dabrafenib combined with tremelimumab on melanoma

WANG Xiaosong<sup>1</sup>, LIU Yunjiao<sup>2</sup>, ZHOU Jin<sup>2</sup>, ZHANG Qianqian<sup>2</sup>, MENG Lingjie<sup>1</sup> (1. Experimental Animal Center, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, China; 2. Department of Pharmacy, Luodian Hospital of Baoshan District, Shanghai 201900, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect and mechanism of dabrafenib (DAB) combined with tremelimumab (TREM) on melanoma. **Methods** The effects of DAB combined with TREM on cell viability, cytotoxicity and cell migration of A375 cells were evaluated by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) method, lactate dehydrogenase (LDH) method and scratch assay. The levels of reactive oxygen species (ROS), adenosine triphosphate (ATP), malondialdehyde (MDA), and superoxide dismutase (SOD) were detected to evaluate the effects of combined drugs on oxidative stress and energy metabolism. In addition, A375 tumor-bearing nude mice model was used to evaluate the inhibitory effect of the combined treatment on tumor growth *in vivo*, and the degree of cell apoptosis and cell proliferation in tumor tissues were analyzed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick end labeling (TUNEL) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunohistochemical staining. **Results** The combined treatment significantly inhibited the survival rate and migration ability of A375 cells and enhanced the cytotoxicity. The combined intervention also significantly increased ROS level, decreased ATP, SOD and MDA levels. It effectively inhibited tumor growth in tumor-bearing nude mice, increased the apoptosis rate of tumor cells and inhibited cell proliferation. **Conclusion** DAB combined with TREM may improve the therapeutic effect of melanoma by enhancing oxidative stress, inhibiting energy metabolism, and promoting cell apoptosis. This combination therapy may provide a new therapeutic strategy to overcome the limitations of singledrug therapy.

**【Key words】** dabrafenib; tremelimumab; melanoma; combination therapy; mechanism

黑色素瘤是一种源自皮肤色素细胞(黑色素细

胞)的恶性肿瘤,其恶性程度高、转移速度快,是导致皮肤癌相关死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。近年来,随着免疫治疗和靶向治疗的发展,黑色素瘤的治疗方法逐渐取得了显著进展。免疫检查点抑制剂如曲美布单抗(TREM)和靶向治疗药物如达拉非尼(DAB)已成为黑色素瘤治疗的主要选择之一<sup>[2-4]</sup>。然而,尽管这些治疗方法取得了较好的临床效果,

**【基金项目】** 遵义市科技计划项目 [遵市科合 HZ 字(2024)322 号]

**【作者简介】** 王晓松, 本科, 助理实验师, Tel: 18585228533, Email: 1424398612@qq.com

**【通信作者】** 孟令杰, 博士, 高级实验师, 硕士生导师, 研究方向: 联合用药策略在肿瘤、肝纤维化及衰老防治中的研究, Email: menglj718@126.com

仍然存在部分患者耐药或治疗反应不佳的情况,使得联合治疗成为一种有前景的治疗策略<sup>[5]</sup>。

TREM 是一种抗 CTLA-4 单克隆抗体,通过解除对 T 细胞的抑制,增强免疫系统对肿瘤细胞的识别与清除作用<sup>[6]</sup>。DAB 则是一种针对 B-型 RAF 蛋白激酶(BRAF)突变的靶向药物,通过抑制 BRAF 突变引发的细胞增殖信号,从而抑制黑色素瘤细胞的增殖<sup>[7]</sup>。近年来的研究表明,免疫治疗与靶向治疗的联合使用能够通过相互作用提高治疗效果,并可能克服单一疗法的局限性<sup>[8-9]</sup>。然而,联合治疗是否能够有效提高黑色素瘤治疗效果及相关作用机制,尚未完全明确。

氧化应激在肿瘤的发生发展中发挥着重要作用<sup>[10-11]</sup>。肿瘤细胞通过调整其氧化还原状态来适应恶劣的微环境,并促进其生长、迁移和耐药性<sup>[12-14]</sup>。研究表明,黑色素瘤细胞常通过产生过量的活性氧(ROS)来推动其增殖及转移,而抑制这些 ROS 的生成或增强抗氧化机制的作用,可能成为癌症治疗的新策略<sup>[15-17]</sup>。此外,三磷酸腺苷(ATP)作为细胞的能量货币,对于维持细胞的基本功能和生存至关重要<sup>[18-19]</sup>。肿瘤细胞通常通过改变其能量代谢途径(如从有氧呼吸转向无氧糖酵解)来支持快速增殖<sup>[20-21]</sup>。因此,调控肿瘤细胞的能量代谢状态对于改善治疗效果和克服耐药性具有潜在意义<sup>[22]</sup>。

尽管已有研究探讨了单一药物(达拉非尼或曲美布单抗)在黑色素瘤中的疗效,但两者联合在黑色素瘤治疗中的作用及相关机制研究有限。因此,本研究旨在通过体内外实验,探索达拉非尼联合曲美布单抗通过调控氧化应激反应和能量代谢提高黑色素瘤的治疗效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

DAB(批号:HY-14660)、TREM(批号:HY-B0380)(美国 MCE 公司);胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶、青霉素-链霉素(上海索莱宝公司);CCK-8、ROS、SOD 和 MDA 检测试剂盒(上海碧云天生物科技公司);乳酸脱氢酶(LDH)、ATP 检测试剂盒(南京建成生物科技公司);抗 PCNA 的抗体(武汉三鹰生物科技公司);荧光过氧化物酶 FITC 标记的二抗(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);酶标仪(型号:Multiskan skyHigh, Thermo Fisher 公司);倒置显微镜(型号:DMI1, Leica 公司);分光光度计(型号:Genesys 10S UV-Vis, Thermo Scientific 公司)。

### 1.2 实验细胞与动物

A375 细胞(具有 BRAF 突变的黑色素瘤细胞系,上海富衡生物科技有限公司);BALB/c Nude 雄性裸鼠,4~5 周龄[实验动物生产许可证号:SYXK(渝)2024-0001,重庆吉立辉生物科技有限公司]。

### 1.3 细胞培养

选择 A375 细胞作为研究对象,使用含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养,并置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中。每隔 2 d 更换一次培养液,待细胞生长至 80%~90% 时,使用 0.25% 胰蛋白酶进行传代。

### 1.4 CCK8 法检测细胞存活率

采用 CCK-8 法测定 DAB 联合 TREM 对 A375 细胞生长活力的影响。取对数生长期的 A375 细胞,以  $1.0 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中。培养 24 h 后,分别加入 DAB(1 μmol/L)、TREM(5 μg/ml)和 DAB(1 μmol/L)+TREM(5 μg/ml),同时设置空白组和溶剂对照组(0.1% DMSO)。药物处理 24 h 后,将原培养基换成新鲜培养基,每孔加入 10 μl CCK-8 溶液,继续孵育 1 h。孵育结束后,使用酶标仪在 450 nm 处测定各组的吸光度(A 值),并计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组平均 A 值-空白组平均 A 值)/(溶剂对照组平均 A 值-空白组平均 A 值)。

### 1.5 LDH 法检测细胞毒性

采用测定 LDH 活性法评估药物对 A375 细胞的细胞毒性作用。细胞分组及处理过程同 1.4 项,药物处理后,收集每孔的培养基,加入 LDH 反应液,孵育 1 h 后,使用酶标仪于 490 nm 处测定 A 值。根据 A 值计算细胞死亡率,使用溶剂对照组和最大释放组作为参考,最终得出不同药物处理组的细胞毒性情况。

### 1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

将对数生长期的 A375 细胞( $1.0 \times 10^5$  个/孔)接种于 6 孔板中,待细胞贴壁生长至整个底部时,使用 200 μl 无菌移液枪枪头在板表面划出一条等宽的线,用 PBS 洗涤 2 次去除划痕区域的细胞碎片。分别加入 DAB(1 μmol/L)、TREM(5 μg/ml)和 DAB(1 μmol/L)+TREM(5 μg/ml),并设置溶剂对照组,继续培养 24 h。在划痕后 0、24 h 于倒置显微镜下观察并拍摄划痕区域,使用 Image J 软件定量分析划痕宽度的变化,并计算划痕愈合率:划痕愈合率(%)=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度×100%。



### 1.7 细胞内 ROS 水平检测

取对数生长期的 A375 细胞,以  $1.0 \times 10^4$  个/孔接种至 96 孔板中,培养 24 h。分别加入 DAB ( $1 \mu\text{mol/L}$ )、TREM( $5 \mu\text{g/ml}$ )和 DAB( $1 \mu\text{mol/L}$ )+TREM( $5 \mu\text{g/ml}$ )进行处理,并设置溶剂对照组。药物处理 2 h 后,加入 DCFH-DA 探针溶液( $10 \mu\text{mol/L}$ ),孵育 30 ~ 60 min,使细胞摄取并与细胞内的 ROS 反应,生成具有荧光特性的 DCF 产物。用 PBS 溶液洗涤 3 次后,加入适量 PBS,使用酶标仪在 530 nm 波长处测定每孔的荧光强度。

### 1.8 细胞内 ATP、MDA 及 SOD 水平检测

取对数生长期的 A375 细胞,以  $1.0 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中,培养 24 h。分别加入 DAB ( $1 \mu\text{mol/L}$ )、TREM( $5 \mu\text{mol/L}$ )和 DAB( $1 \mu\text{mol/L}$ )+TREM( $5 \mu\text{g/ml}$ )进行处理,并设置溶剂对照组。药物处理 24 h 后,使用细胞裂解液将细胞裂解。

收集各组处理后的 A375 细胞裂解液,并转移至 96 孔板中,加入适量的 ATP 检测试剂,反应完成后,通过酶标仪测定每孔的吸光度值,并计算各组样品中 ATP 水平。

分别取 50  $\mu\text{l}$  各组处理后的 A375 细胞裂解液到新的离心管中,加入适量的硫代巴比妥酸(TBA)试剂。将试剂和样本混合后,放入  $95^\circ\text{C}$  的水浴中加热 0.5 h,在此过程中,MDA 与 TBA 反应生成红色的复合物。反应结束后,将样本从水浴中取出,冷却至室温,10 000 r/min 离心 5 min,去除可能存在的沉淀。最后,使用分光光度计在 532 nm 处测定样本的吸光度,根据标准曲线计算样品中 MDA 水平。

收集各组处理后的 A375 细胞裂解液,并转移至 96 孔板中,加入适量的 SOD 底物溶液。反应完成后,使用酶标仪在 450 nm 处测定每孔的吸光度,计算各组样品中 SOD 水平。

### 1.9 荷瘤小鼠肿瘤生长情况的比较

收集对数生长期的 A375 细胞,用 PBS 重悬细胞,加入等量 Matrigel 基质胶,调整细胞密度( $1.0 \times 10^7$  个/ml),混匀后置于冰上。将 100  $\mu\text{l}$  细胞悬液注射于裸鼠右侧腋窝皮下,1 周后,在裸鼠皮下可见实体瘤形成。当肿瘤长至 100  $\text{mm}^3$  (肿瘤体积= $1/2 \times \text{长径} \times \text{短径}^2$ )时,将裸鼠随机分为 DAB (30 mg/kg)组、TREM( $10 \mu\text{g/kg}$ )组、DAB (30 mg/kg)+TREM( $10 \mu\text{g/kg}$ )组和溶剂对照组(含 5% DMSO 及 20% PEG<sub>400</sub> 的生理盐水),每组 6 只,每 2 d 尾静脉注射给药 1 次,共给药 21 d。21 d 后脱颈处死裸鼠,剥离肿瘤组织并称量肿瘤质量。

### 1.10 TUNEL 和 PCNA 免疫组化染色分析

将剥离的肿瘤组织经 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,进行石蜡包埋,切片厚度为 4  $\mu\text{m}$ 。切片经二甲苯脱蜡 2 次,每次 5 ~ 10 min,依次经无水乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇及蒸馏水梯度水化。滴加 20  $\mu\text{g/ml}$  无 DNA 酶污染的蛋白酶 K,  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min 进行抗原修复, PBS 冲洗 3 次。对于 TUNEL 实验,使用 TUNEL 试剂盒按照说明书操作。具体步骤为:切片经过 PBS 洗涤后,加入 TUNEL 反应试剂,于  $37^\circ\text{C}$  孵育 60 min,加入核染色剂后继续孵育 5 min。染色后,使用显微镜观察细胞凋亡信号的标记, TUNEL 阳性细胞核呈棕黄色,非凋亡细胞核呈蓝色,并计算 TUNEL 阳性率:阳性率(%)=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ ,以定量评估细胞凋亡。对于 PCNA 免疫组化,切片经过脱蜡、水合后,采用 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,随后加入针对 PCNA 的特异性一抗,  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日,加入二抗,室温下孵育 1 h,最后使用 DAB 显色试剂盒显色,并用苏木素复染。切片脱水后封片,通过显微镜观察 PCNA 阳性细胞(细胞核出现棕黄色颗粒沉着)的分布与表达,并计算 PCNA 阳性率:阳性率(%)=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ ,以定量评估细胞增殖。

### 1.11 统计学处理

数据统计和分析均采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件进行,数据以 ( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用 Student's *t* test 和单因素方差分析进行组间差异的比较,  $P < 0.05$  说明差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物对 A375 细胞生长活力及细胞毒性的影响

采用 CCK8 法检测单独给药及 DAB 联合 TREM 对 A375 细胞生长活力的影响。结果如图 1A 所示,与对照组相比,单独给药组及联合给药组的细胞存活率均显著降低,提示 DAB 和 TREM 对 A375 细胞均具有细胞增殖抑制作用;且与单药组相比,联合给药组的细胞存活率显著降低,分别为 ( $75.76 \pm 0.79$ )%、( $69.64 \pm 8.34$ )% 和 ( $55.88 \pm 3.01$ )%,提示这两种药物可能通过协同作用增强治疗效果。

为了进一步检测各组对 A375 细胞的毒性作用,采用测定生长介质中由受损细胞释放的 LDH 活性的方法。结果如图 1B 所示,与对照组相比,单独给药组及联合给药组的细胞毒性均显著提高,表明这两种单药对 A375 细胞具有一定的毒性作用;DAB 联合 TREM 组的细胞毒性显著高于单独给药

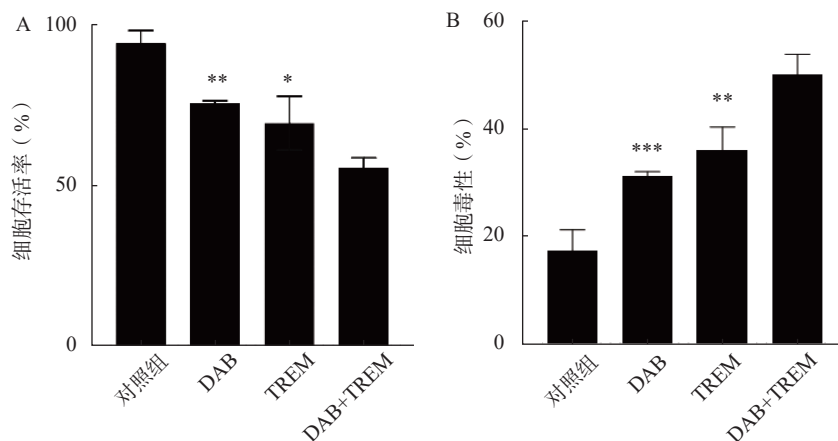


图 1 药物对 A375 细胞生长活力及细胞毒性的影响

A. 不同处理条件下的细胞存活率(%); B. 不同处理条件下的细胞凋亡率(%)

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与 DAB+TREM 组比较。

组,分别为(31.24±0.82)%、(35.93±4.43)% 和(50.00±3.83)%,提示联合给药对 A375 细胞的毒性效果更为显著。

## 2.2 药物对 A375 细胞迁移能力的影响

为了评估各组对 A375 细胞迁移能力及细胞愈合抑制作用,进行了细胞划痕实验。结果如图 2A 所示,0 h 时所有组的 A375 细胞表面均可观察到明显的划痕,且细胞状态差异不大。经过 24 h 处理后,对照组的细胞成功愈合了大部分划痕,愈合速

度较快。相比之下,DAB、TREM 和 DAB 联合 TREM 组的细胞愈合速度较慢,其中,联合给药组的愈合速度最慢,表现出明显的愈合抑制作用。通过量化划痕愈合率,如图 2B 所示,与对照组相比,单独给药组未显示显著性差异,愈合率分别为(41.95±4.76)%、(32.35±2.22)% 和 (32.28±5.40)%;联合给药组的愈合率为(16.25±2.68)%,与其他组相比显著降低,提示联合给药在细胞迁移和愈合过程中产生了较强的抑制作用。

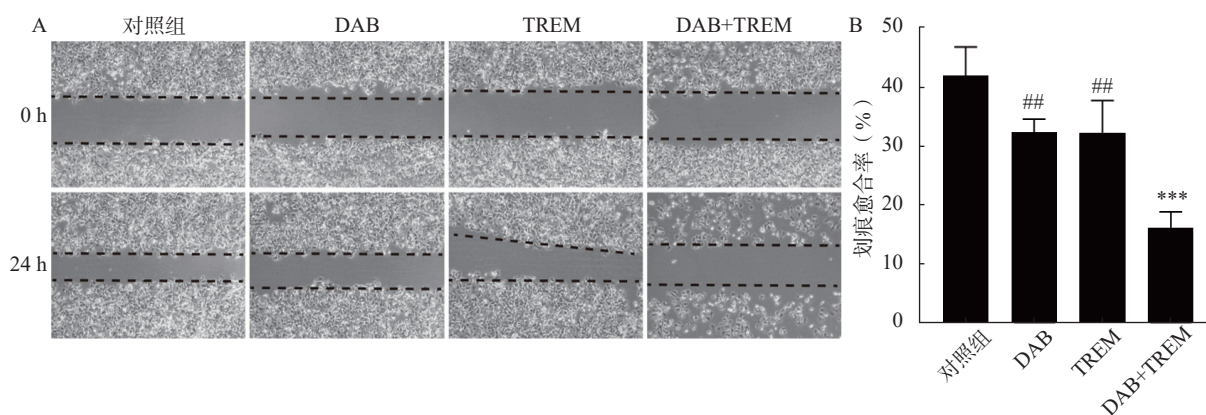


图 2 药物对 A375 细胞迁移能力的影响

A.0 h 和 24 h 的细胞迁移情况(×10); B.划痕愈合率(%)

\*\*\* $P<0.001$ ,与对照组比较,## $P<0.01$ ,与 DAB+TREM 组比较。

## 2.3 药物对 A375 细胞 ROS、ATP 生成水平的影响

结果如图 3A 所示,与对照组相比,单独给药组的 ROS 水平有所增加,但差异不显著;而 DAB 联合 TREM 组的 ROS 水平较对照组及单独给药组显著增高,提示联合用药可能通过促进肿瘤细胞内 ROS 的积累及氧化应激反应而增强抗肿瘤作用。

如图 3B 所示,与对照组相比,单独给药组及联合给药组的 ATP 水平均显著降低,且联合用药组

的 ATP 水平显著低于单独给药组。结果表明,DAB 联合 TREM 可能通过抑制细胞的能量代谢而增强抗肿瘤作用。

## 2.4 药物对 A375 细胞 MDA 和 SOD 生成水平的影响

MDA 含量测定可评价脂质过氧化水平,SOD 活性测定反映细胞抗氧化能力。如图 4 所示,在 MDA 和 SOD 水平测定中,单独给药组及联合给药

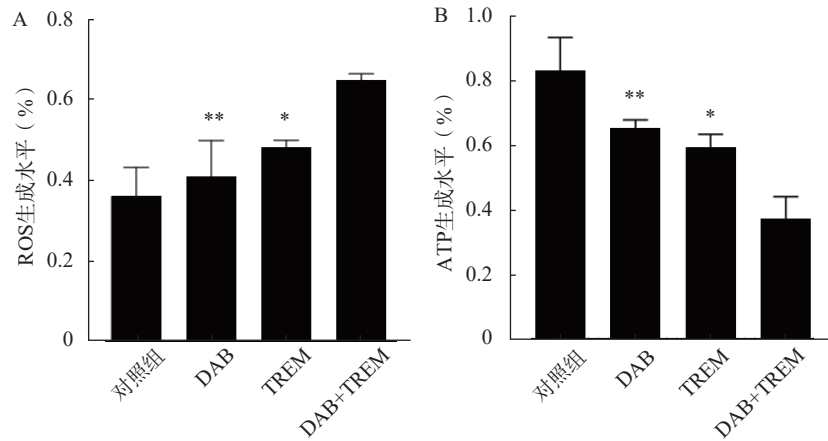


图3 药物对 A375 细胞 ROS 和 ATP 生成水平的影响

A. 药物对 A375 细胞 ROS 生成水平的影响; B. 药物对 A375 细胞 ATP 生成水平的影响  
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与 DAB+TREM 组比较。

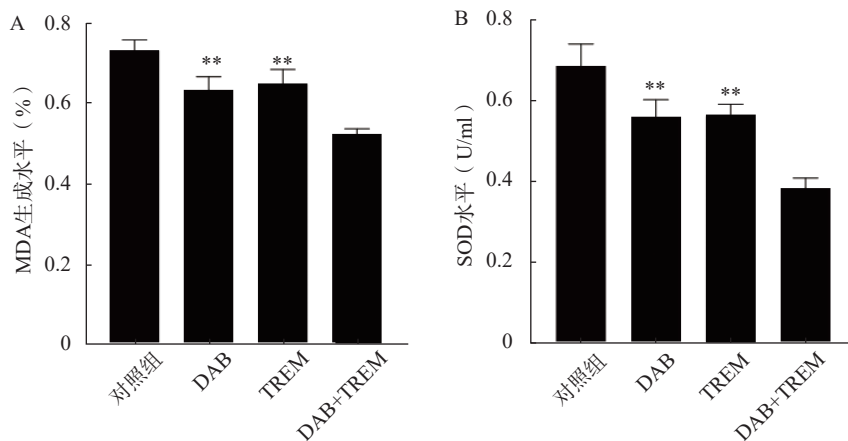


图4 药物对 A375 细胞 MDA 及 SOD 生成水平的影响

A. 药物对 A375 细胞 MDA 生成水平的影响; B. 药物对 A375 细胞 SOD 生成水平的影响  
\*\* $P<0.01$ , 与 DAB+TREM 组比较。

组的 MDA 和 SOD 水平较对照组均显著降低; 且联合给药组的 MDA 和 SOD 水平显著低于单独给药组, 提示 DAB 联合 TREM 可能通过增强氧化应激反应, 降低细胞抗氧化能力, 从而增强抗肿瘤效果。

## 2.5 药物对荷瘤裸鼠肿瘤生长情况的影响

通过在裸鼠皮下注射 A375 黑色素瘤细胞建立了皮下移植瘤模型。结果如图 5 所示, 与对照组相比, 单独给药组及 DAB 联合 TREM 组均显著抑制了肿瘤生长, 肿瘤质量分别为  $(0.62\pm0.12)$  g、 $(0.47\pm0.07)$  g、 $(0.43\pm0.06)$  g 和  $(0.29\pm0.09)$  g; 且联合给药的肿瘤质量较单独给药组显著降低, 证实 DAB 联合 TREM 能有效抑制体内黑色素瘤的生长, 具有更强的抗肿瘤效果。

## 2.6 药物对肿瘤组织细胞凋亡和 PCNA 蛋白表达的影响

采用 TUNEL 凋亡染色法评价各组肿瘤组织细胞凋亡情况。结果如图 6A 和 6B 所示, 与对照

组相比, 单独给药组的 TUNEL 阳性率有所提高, 分别为  $(17.11\pm7.83)\%$ 、 $(25.94\pm2.59)\%$  和  $(26.72\pm5.17)\%$ , 但差异并不显著; 联合给药的阳性率为  $(40.91\pm2.34)\%$ , 显著高于其他组, 表明 DAB 与 TREM

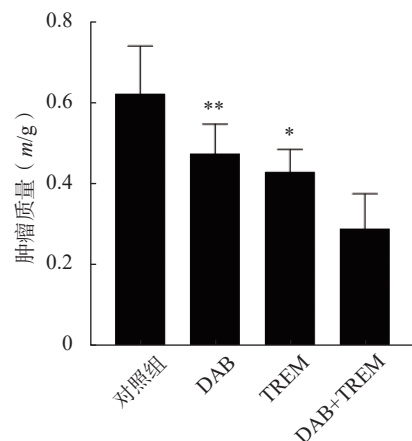


图5 各组荷瘤裸鼠肿瘤质量的对比

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与 DAB+TREM 组比较。



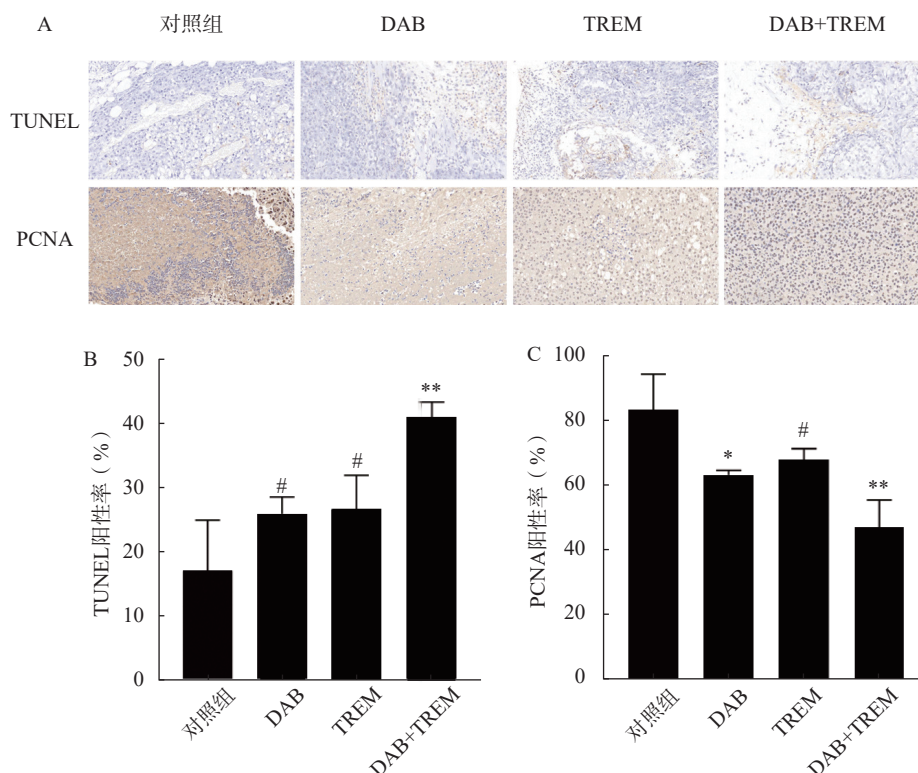


图 6 各组肿瘤组织细胞凋亡与 PCNA 蛋白表达情况

A. TUNEL 染色与 PCNA 免疫组织化学染色( $\times 10$ ); B. TUNEL 和 PCNA 阳性率  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; # $P < 0.05$ , 与 DAB+TREM 组比较。

联合应用时显著提高肿瘤细胞的凋亡率。

通过检测肿瘤组织内 PCNA 蛋白的表达, 评价各组肿瘤组织细胞增殖情况。结果如图 6A 和 6B 所示, 与对照组相比, 单独给药组及联合给药组的 PCNA 阳性率均降低, 分别为  $(83.091 \pm 11.00)\%$ 、 $(63.31 \pm 1.31)\%$ 、 $(68.00 \pm 3.25)\%$  和  $(47.05 \pm 8.48)\%$ 。其中, 联合给药组的 PCNA 阳性率降低最显著, 提示 DAB 联合 TREM 显著抑制细胞增殖。综上, DAB 联合 TREM 可能通过增强细胞凋亡及抑制细胞增殖而发挥更强的抗肿瘤效果。

### 3 讨论

黑色素瘤作为一种侵袭性极强的皮肤恶性肿瘤, 严重威胁人类健康。目前单一治疗手段(如达拉非尼、曲美布单抗)存在疗效有限、易耐药等问题, 而联合治疗可通过多靶点干预, 成为黑色素瘤治疗研究的热点。

氧化应激与能量代谢在黑色素瘤发生、发展、转移及耐药过程中发挥关键作用。氧化应激是细胞内 ROS 产生与抗氧化防御失衡的状态。调节氧化应激的治疗策略主要有: ①促氧化治疗: 通过进一步升高肿瘤细胞内 ROS 水平, 突破其耐受阈值, 诱导细胞死亡。②抑制抗氧化防御: 削弱黑色素瘤

细胞的抗氧化能力, 使其对氧化损伤更敏感。正常细胞主要依赖线粒体氧化磷酸化高效生成 ATP, 满足生理需求。而黑色素瘤细胞则呈现出显著的 ATP 代谢重编程。调节能量代谢疗法的核心, 在于精准干预黑色素瘤细胞异常的能量代谢模式, 切断其“能量供应”, 从而抑制肿瘤生长与扩散。调节能量代谢的治疗策略主要有靶向糖酵解途径、干预线粒体代谢和调控氨基酸与脂质代谢等途径。近年来, 研究发现联合治疗可通过协同调节这两大生理过程, 提高黑色素瘤治疗效果。

本研究表明, DAB 联合 TREM 显著抑制黑色素瘤细胞活力与细胞迁移能力, 并增强细胞毒性作用; 显著提高 ROS 水平, 降低 MDA、SOD 和 ATP 水平; 有效抑制荷瘤裸鼠体内肿瘤生长, 提高肿瘤组织细胞凋亡率且抑制细胞增殖, 证实联合用药可能通过增强氧化应激、抑制能量代谢和促进细胞凋亡的作用机制提高黑色素瘤治疗效果。这些发现表明, DAB 联合 TREM 能够克服单一药物的局限性, 为黑色素瘤提供一种新的治疗策略。然而, 未来的研究应进一步探索其分子作用机制, 并评估其临床应用的安全性和长期疗效。

### 【参考文献】

[1] SUN Y L, SHEN Y M, LIU Q, et al. Global trends in melanoma

- burden: a comprehensive analysis from the global burden of disease study, 1990–2021[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2025, 92(1): 100-107.
- [2] BOUFFET E, HANSFORD J R, GARRÈ M L, et al. Dabrafenib plus trametinib in pediatric glioma with *BRAF* V600 mutations[J]. *N Engl J Med*, 2023, 389(12): 1108-1120.
- [3] LAU G, ABOU-ALFA G K, CHENG A L, et al. Outcomes in the Asian subgroup of the phase III randomised HIMALAYA study of tremelimumab plus durvalumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2025, 82(2): 258-267.
- [4] PETERS S, CHO B C, LUFT A V, et al. Durvalumab with or without tremelimumab in combination with chemotherapy in first-line metastatic NSCLC: five-year overall survival outcomes from the phase 3 POSEIDON trial[J]. *J Thorac Oncol*, 2025, 20(1): 76-93.
- [5] ATKINS M B, LEE S J, CHMIELOWSKI B, et al. Combination dabrafenib and trametinib versus combination nivolumab and ipilimumab for patients with advanced *BRAF*-mutant melanoma: the DREAMseq trial-ECOG-ACRIN EA6134[J]. *J Clin Oncol*, 2023, 41(2): 186-197.
- [6] SANGRO B, CHAN S L, KELLEY R K, et al. Four-year overall survival update from the phase III HIMALAYA study of tremelimumab plus durvalumab in unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(5): 448-457.
- [7] HAMID O, HASSEL J C, SHOUSHARI A N, et al. Tebentafusp in combination with durvalumab and/or tremelimumab in patients with metastatic cutaneous melanoma: a phase I study[J]. *J Immunother Cancer*, 2023, 11(6): e006747.
- [8] COMIN-ANDUUX B, ESCUIN-ORDINAS H, IBARRONDO F J. Tremelimumab: research and clinical development[J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 9: 1767-1776.
- [9] SCHOENFELD J D, GIOBBIE-HURDER A, RANASINGHE S, et al. Durvalumab plus tremelimumab alone or in combination with low-dose or hypofractionated radiotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer refractory to previous PD(L)-1 therapy: an open-label, multicentre, randomised, phase 2 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(2): 279-291.
- [10] KUDRYAVTSEVA A V, KRASNOV G S, DMITRIEV A A, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 44879-44905.
- [11] JELIC M D, MANDIC A D, MARICIC S M, et al. Oxidative stress and its role in cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2021, 17(1): 22-28.
- [12] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(12): 931-947.
- [13] CHENG Y T, YANG C C, SHYUR L F. Phytomedicine-Modulating oxidative stress and the tumor microenvironment for cancer therapy[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 128-143.
- [14] DONOHOE C, SENGE M O, ARNAUT L G, et al. Cell death in photodynamic therapy: from oxidative stress to anti-tumor immunity[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2019, 1872(2): 188308.
- [15] OBRADOR E, LIU-SMITH F, DELLINGER R W, et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma[J]. *Biol Chem*, 2019, 400(5): 589-612.
- [16] DOUKI T. Oxidative stress and genotoxicity in melanoma induction: impact on repair rather than formation of DNA damage?[J]. *Photochem Photobiol*, 2020, 96(5): 962-972.
- [17] REMIGANTE A, SPINELLI S, MARINO A, et al. Oxidative stress and immune response in melanoma: ion channels as targets of therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(1): 887.
- [18] GANAPATHY-KANNIAPPAN S, GESCHWIND J H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 152.
- [19] ALVAREZ C L, TRONCOSO M F, ESPELT M V. Extracellular ATP and adenosine in tumor microenvironment: Roles in epithelial-mesenchymal transition, cell migration, and invasion[J]. *J Cell Physiol*, 2022, 237(1): 389-400.
- [20] LEI Y L, ZHOU X, ZHAO Y, et al. Effects of exogenous ATP on melanoma growth and tumor metabolism in C57BL/6 mice[J]. *Comp Med*, 2022, 72(2): 93-103.
- [21] BARTMAN C R, WEILANDT D R, SHEN Y H, et al. Slow TCA flux and ATP production in primary solid tumours but not metastases[J]. *Nature*, 2023, 614(7947): 349-357.
- [22] JIANG Y, ZHOU H M, ZHAO W J, et al. ATP-triggered drug release of self-assembled 3D DNA nanostructures for fluorescence imaging and tumor therapy[J]. *Anal Chem*, 2022, 94(18): 6771-6780.
- [收稿日期] 2025-04-16 [修回日期] 2025-07-29  
[本文编辑] 李睿旻