

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2025.09.009

· 临床研究 ·

帕比司他影响黑色素瘤生长和免疫原性机制的实验研究

梁安静^{1,2}, 程良³, 向苏^{1,2}, 侯爵¹, 袁榕^{1,2}, 陈竹^{1,2} (1. 川北医学院 基础医学与法医学院, 四川 南充 637000; 2. 首都医科大学附属北京安贞医院南充医院 组织工程与干细胞研究所, 四川 南充 637000; 3. 南充市中医医院 外二科, 四川 南充 637000)

[摘要] **目的:**探究组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂帕比司他对黑色素瘤生长和免疫性的影响及其机制。**方法:**常规培养黑色素瘤细胞B16F0,用不同浓度的帕比司他处理细胞, WB法检测帕比司他对B16F0细胞中HDAC表达的影响, CCK-8法、划痕愈合实验、Transwell实验和流式细胞术分别检测帕比司他对B16F0细胞增殖、迁移和侵袭能力, 以及细胞凋亡和周期的影响。转录组学检测帕比司他对B16F0细胞基因表达的影响, 用qPCR法加以验证。流式细胞术检测帕比司他对B16F0细胞表面MHC I/II类分子表达的影响, B16F0与骨髓来源树突状细胞(BMDC)共培养检测帕比司他对BMDC细胞表达CD11c、CD80和CD86的影响, B16F0细胞移植瘤实验检测帕比司他对移植瘤生长和裸鼠免疫功能的影响。**结果:**帕比司他促进B16F0细胞中组蛋白3(H3)和 α -微管蛋白(α -TUB)蛋白乙酰化($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$), 抑制B16F0细胞增殖、迁移和侵袭能力, 促进其凋亡, 并使细胞周期阻滞于G1期($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 或 $P < 0.0001$), 促进B16F0细胞表面表达MHC I/II类分子表达并促进共培养BMDC成熟(均 $P < 0.01$)。转录组学检测结果显示, 帕比司他促进B16F0细胞中E-cadherin和抗原提呈相关基因的表达, 抑制N-cadherin、vimentin、c-Myc和CDK1的表达, qPCR法验证了这些结果。帕比司他抑制裸鼠移植瘤的生长并增强荷瘤裸鼠的免疫功能($P < 0.05$, $P < 0.0001$)。**结论:**帕比司他可抑制B16F0细胞的恶性生物学行为, 促进其凋亡, 调控其免疫性, 增强荷瘤裸鼠的免疫功能。

[关键词] 黑色素瘤; 帕比司他; MHC I/II; 肿瘤免疫性

[中图分类号] R739.5; R392.12 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025)09-0957-11

Experimental study on the effects of panobinostat on melanoma growth and immunogenicity mechanisms

LIANG Anjing^{1,2}, CHENG Liang³, XIANG Su^{1,2}, HOU Jue¹, YUAN Rong^{1,2}, CHEN Zhu^{1,2} (1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China; 2. Institute of Tissue Engineering and Stem Cells, Nanchong Hospital Affiliated to Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Nanchong 63700, Sichuan, China; 3. Department of Surgery II, Nanchong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanchong 63700, Sichuan, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor panobinostat on melanoma growth, tumor immunity, and the underlying mechanisms. **Methods:** B16F0 melanoma cells were cultured and treated with different concentrations of panobinostat. The effect of panobinostat on HDAC expression in B16F0 cells was detected by WB. The effects of panobinostat on the proliferation, migration, invasion, apoptosis and cell cycle of B16F0 cells were detected by CCK-8 assay, wound-healing assay, Transwell assay and flow cytometry, respectively. The effect of panobinostat on gene expression in B16F0 cells was detected using transcriptome analysis and verified by qPCR. Flow cytometry was used to detect the effect of panobinostat on the expression of MHC I/II in B16F0 cells. B16F0 cells and bone marrow-derived dendritic cells (BMDC) were co-cultured to assess the effects of panobinostat on the expression of CD11c, CD80 and CD86 in BMDC cells. A xenograft mouse model was used to evaluate the effects of panobinostat on tumor growth and host immune function. **Results:** panobinostat promoted the acetylation of H3 and α -tubulin proteins in B16F0 cells ($P < 0.01$ or $P < 0.001$ or $P < 0.0001$), inhibited cell proliferation, migration, and invasion, promoted apoptosis, and induced G1-phase cell cycle arrest ($P < 0.05$ or $P < 0.001$ or $P < 0.0001$). Additionally, panobinostat enhanced surface expression of MHC I/II on B16F0 cells and promoted BMDC maturation (all $P < 0.01$). Transcriptomic analysis showed that panobinostat

[基金项目] 四川省医学会项目(No. S22013);南充市市校合作项目(No. 22SXQT0311);川北医学院校级科研发展基金项目(No. CBY23-ZDA07)

[作者简介] 梁安静(1999—),女,硕士,主要从事医学遗传学方面的研究

[通信作者] 陈竹(扫码获取作者联系方式)



upregulated the expression of E-cadherin and antigen presentation related genes in B16F0 cells, and inhibited the expression of N-cadherin, vimentin, c-Myc and CDK1, which was confirmed by qPCR. *In vivo*, panobinostat suppressed xenograft tumor growth and enhanced immune function in tumor-bearing nude mice ($P < 0.05$, $P < 0.0001$). **Conclusion:** panobinostat can inhibit the malignant biological behavior of B16F0 cells, promote apoptosis, regulate tumor immunity, and enhance immune function of tumor-bearing nude mice.

[Key words] melanoma; panobinostat; major histocompatibility complex I / II; tumor immunity

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(9): 957-967. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.09.009]

恶性黑色素瘤(metastatic melanoma)是一种起源于黑色素细胞的恶性肿瘤^[1-2],其发病率持续上升^[3]。由于黑色素瘤具有高度的肿瘤异质性,对大部分的放化疗药物具有耐药性,导致患者复发率和病死率均高^[4]。尽管针对晚期黑色素瘤的治疗开发了许多新兴的治疗方式,包括针对突变位点的靶向疗法和免疫疗法等,但黑色素瘤的耐药性极大地限制了这些疗法的应用^[4-5]。近年来的研究^[6-7]认为,表观遗传变化是黑色素瘤高度异质性的主要原因,也是黑色素瘤耐药性出现的关键因素。尽管表观遗传学机制涉及面广,如DNA甲基化、组蛋白乙酰化、染色质重塑及RNA干扰,但组蛋白乙酰化具有较高的临床意义,成药性较高。临床数据^[7-10]显示,黑色素瘤的组蛋白去乙酰化水平升高,且与患者的生存率显著相关。组蛋白过度去乙酰化与多种细胞过程,如增殖、凋亡、代谢和免疫原性相关^[7,11]。因此,组蛋白乙酰化被认为是改善黑色素瘤耐药性最有希望的治疗方法之一^[12-14]。帕比司他(panobinostat, LBH589)是一种广谱组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)抑制剂,具有抗肿瘤活性,是获批治疗多发性骨髓瘤的首款HDAC抑制剂,并且已经在临床上投入使用^[15]。目前,帕比司他在多发性骨髓瘤^[16]、肺癌^[17]、淋巴瘤^[18]等多种恶性肿瘤中均有应用。然而,帕比司他对黑色素瘤的疗效尚未明晰。本研究旨在探讨帕比司他对黑色素瘤生长和免疫性调节的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞与主要试剂

20只SPF级6~8周龄、雄性C57BL/6小鼠,体质量约20g,购自川北医学院动物实验中心[卫生许可证号:SYXK(川)2023-0076],本实验所有实验方案均经川北医学院动物实验伦理委员会批准(动物伦理编号:2024073),并符合实验动物福利与伦理规范。

黑色素瘤细胞B16F0购自中国科学院细胞库,胎牛血清(FBS)购自美国Thermo公司,RPMI 1640培养基、0.25%胰酶购自普诺赛公司,CCK-8试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自凯基生物公司,Transwell小室购自美国Corning公司,RNase A溶液购自biosharp公司,Matrigel基质胶购自美国BD Biosciences公司,Annexin V/PI凋亡试剂盒、RNA提取试剂盒、逆转录

试剂盒和PCR扩增试剂盒均购自南京诺唯赞有限公司,RT-qPCR引物购自擎科生物公司,IL-4购自近岸蛋白质公司,GM-CSF购自美国R&D Systems,乙酰化组蛋白3(acetylated histone 3, Ac-H3)一抗、乙酰化 α 微管蛋白(acetylated α -tubulin, Ac- α -TUB)一抗购自Affinity Biosciences公司,H3一抗购自华安生物有限公司, α -TUB一抗、辣根过氧化物酶(HRP)羊抗兔/鼠二抗均购自菲恩公司,细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒购自碧云天公司,帕比司他购自美国MCE公司,DAPI、CD3、CD4、CD8、NK1.1、CD11c、CD80、CD86、MHC I、MHC II流式抗体、LEGENDplex™多因子试剂盒均购自美国BioLegend公司。流式细胞仪(FACS Calibur)购自美国BD公司,流式细胞仪(NovoCyte)购自美国Agilent公司,酶标仪(ST-360)购自中国上海科华生物工程股份有限公司,实时荧光定量PCR仪(MA-6000)购自中国圣湘生物科技股份有限公司,紫外可见分光光度计(Nanordrop One)购自中国赛默飞世尔科技有限公司,96孔梯度PCR仪(T100)购自美国Bio-Rad公司。

1.2 WB法检测帕比司他对B16F0细胞中HDAC表达的影响

B16F0细胞用含10% FBS的1640培养基,37℃、5% CO₂培养箱中培养,当细胞汇合度达80%~90%时进行传代。取对数生长期的B16F0细胞以 5×10^5 /孔接种于6孔板中,细胞贴壁后,用不同浓度的帕比司他(0、0.01、0.05和0.10 μ mol/L)处理细胞,培养24 h后收集细胞,用RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白。按照细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒说明书提取核蛋白。BCA法分别测定总蛋白和核蛋白浓度,蛋白样品经SDS-PAGE分离后转膜至PVDF膜,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,孵育 α -TUB一抗(1:20 000)、Ac- α -TUB一抗(1:1 000)、H3一抗(1:10 000)、Ac-H3一抗(1:500),在4℃下处理过夜。在HRP标记二抗中室温下处理1 h,ECL显色液显影X光胶片, α -TUB和H3为内参,ImageJ软件分析Ac- α -TUB蛋白和Ac-H3蛋白的相对表达量。

1.3 CCK-8法检测帕比司他对B16F0细胞增殖能力的影响

取对数生长期的B16F0细胞以 10^4 个/孔接种于96孔板中,细胞贴壁后按1.2节中的方法处理细胞。

每组5个复孔。分别在24、48和72 h用CCK-8法试剂盒说明书步骤检测各组细胞的存活率。

1.4 划痕愈合实验检测帕比司他对B16F0细胞迁移能力的影响

取对数生长期的B16F0细胞以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,待细胞汇合度达80%时用200 μ L的吸头划线,用生理盐水洗涤2次,对照组用无FBS的1640培养基培养,帕比司他组用含0.05 μ mol/L帕比司他的无FBS培养基培养,分别在0和24 h进行观察拍照,用ImageJ软件计算细胞迁移率,细胞迁移率 = (0 h划痕面积 - 24 h划痕面积) / 0 h划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell实验检测帕比司他对B16F0细胞侵袭能力的影响

将Matrigel基质胶和无血清培养基按1:5体积比混合,加入Transwell小室1 h使其硬化成膜。实验分为对照组和帕比司他组。将对数生长期的B16F0稀释成密度为 10^5 个/mL的单细胞悬液,上室中加入200 μ L单细胞悬液,对照组下室中加入600 μ L含0.05 μ mol/L帕比司他的20% FBS的1640培养基,培养48 h后,用棉签去除上室中未侵袭性细胞,将穿膜的细胞用4%多聚甲醛固定30 min,0.1%结晶紫染色10 min,用PBS清洗后,在光学显微镜下观察统计各组侵袭细胞数。

1.6 流式细胞术检测帕比司他对B16F0细胞凋亡和

细胞周期的影响

取对数生长期的B16F0细胞,以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,按1.3节中方法处理细胞。培养24 h后,用Annexin V/PI凋亡试剂盒进行染色;或用1 mL 70%冷乙醇固定,4 $^{\circ}$ C下处理过夜,加入500 μ L PI/RNase A染色工作液(50 μ g/mL PI, 100 μ g/mL RNase A)室温下避光处理30~60 min。流式细胞仪检测各组细胞的凋亡或细胞周期,以拟合软件Mod Fit分析各组细胞周期。

1.7 转录组学检测帕比司他对B16F0细胞基因表达的影响

取对数生长期的B16F0细胞,以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,按1.3节中方法处理细胞。24 h后收集细胞,每 10^6 个细胞加入1 mL TRIzol试剂,使其与细胞充分接触,至细胞充分裂解至溶液清亮,将溶液转移至1.5 mL无RNase的离心管中,送海普洛斯基基因组中心进行mRNA转录组测序。

1.8 qPCR法验证转录组学测序结果

取对数生长期的B16F0细胞,以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,按1.3节中方法处理细胞。24 h后收集细胞,用RNA提取试剂盒提取各组细胞中总RNA,用逆转录试剂盒将其逆转录为cDNA。根据SYBR qPCR Master Mix的说明书将cDNA进行扩增。qPCR引物序列见表1。以GAPDH为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算出目标基因的相对表达水平。

表1 qPCR引物序列(5'-3')

基因名称	正向序列	反向序列
CIITA	AGCGCCACAGATACTCCCTATTT	GCAGTCACCTACAGTCACATTCT
H2-Aa	TCCCTTCTGACGATGACATTTATGA	TTCCAGGGTGTGACTCATAAAGG
H2-Eb1	GAAAGCACAATCCACATCTGCAC	TCCTTCCTTCAGCCTTGTTACTT
H2-D1	TTCTGGGTGTCCCTTGAGCTATG	GAGAGACCTGAACACATCGTCTG
CD74	AACCATGAACAGTTGCCCATACT	GCTCACAGGTTTGGCAGATTTC
CDK1	CGAGAACGGCTTGATTGTC	GACCAGCAGACAGGGACATC
c-Myc	AAATCCTGTACCTCGTCCGATTC	TCTCCACAGACACCACATCAATT
E-cadherin	ACTTTGGTGTGGGTCAGGAAATC	TGGCGATGATGAGAGCTACATATG
N-cadherin	GGAGGAGAAGAAGACCAGGACTA	AGCAGCTTTAAGGCCCTCATTA
Vimentin	CGAGAGAAATTGCAGGAGGAGAT	CTGGACATGCTGTTCTGAATCT
GAPDH	CAGTGGCAAAGTGGAGATTGTTG	TCGCTCCTGGAAGATGGTGAT

1.9 流式细胞术检测帕比司他对B16F0细胞表面MHC I/II表达的影响

取对数生长期B16F0细胞,以 10^5 个/孔接于6孔板中,贴壁后按1.3节中方法处理细胞,培养24、48和72 h,收集细胞,用PE/Cyanine7-MHC I, Pacific Blue-MHC II抗体染色30 min后,用流式细胞仪进行检测分析。

1.10 B16F0细胞与骨髓来源的树突状细胞(bone marrow-derived dendritic cell, BMDC)共培养检测帕比司他对BMDC细胞CD11c、CD80和CD86表达的影响

选取6~8周龄的雄性C57BL/6小鼠,取其腿骨并剪去骨两端,在生理盐水中用注射器冲洗骨髓腔获得骨髓悬液,裂解红细胞后获得小鼠骨髓细胞。铺

板细胞数为 1×10^6 /孔, 加入 GM-CSF 20 ng/mL、IL-4 20 ng/mL 进行诱导, 第3天时换液补充细胞因子, 后续每2 d换液1次。第7天收集成熟 BMDC 细胞。收集对照组 B16F0 细胞和帕比司他处理 72 h 的 B16F0 细胞, B16F0 细胞和 BMDC 细胞按照 1:5 比例进行铺板 (B16F0 细胞为 10^4 个/孔) 培养, 培养 48 h 后收集 DC 进行相关指标染色, 包括 FITC-CD11c、APC-CD80、PE-CD86, 用流式细胞仪进行检测分析。

1.11 B16F0 细胞移植瘤实验检测帕比司他对移植瘤生长和裸鼠免疫功能的影响

制备对数生长期的 B16F0 细胞悬液, 密度为 1×10^6 /100 μ L, 将 100 μ L 的细胞悬液注射至小鼠右肩皮下。待移植瘤体积达 50~100 mm³ 时, 按随机数字表法随机将小鼠分为对照组和帕比司他组, 每组 10 只。帕比司他组每隔 2 d 腹腔给药, 药物剂量为 15 mg/kg, 100 μ L/只, 对照组注射等体积的生理盐水。每隔 1 d 测量 1 次小鼠移植瘤体积, 以“长径 $\times$ 短径 $\times$ 短径/2”计算移植瘤体积。当对照组移植瘤平均体积达到 1 300 mm³ 时进行安乐死, 完整剥离移植瘤组织块, 进行大体拍照。小鼠安乐死之前内眦取血, 离心后获得血清, 采用 LEGENDplex™ 多因子试剂盒利

用荧光微球技术进行炎症因子检测。随后, 小鼠部分肿瘤组织、心、肝、脾、肺和肾用 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片后进行 H-E 染色。小鼠脾和淋巴结制备成单细胞悬液, 进行 T 细胞相关指标 (APC-CD3、FITC-CD4、PerCP-CD8) 染色及 NK 细胞的相关指标 (APC-CD3、PE-NK1.1) 染色 (染色 30 min), 用流式细胞仪进行检测分析。

1.12 统计学处理

用统计软件 Graphpad Prism 9 处理分析实验数据。两组间比较用 *t* 检验, 多组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 帕比司他促进 B16F0 细胞中 H3 和 α -TUB 乙酰化

WB 法检测结果 (图 1) 显示, 与对照组比较, 帕比司他组 B16F0 细胞中 Ac-H3、Ac- α -TUB 表达水平均明显升高 ($P < 0.01$ 或 0.001 或 0.000 1)。实验结果表明, 帕比司他可促进 B16F0 细胞中 H3 和 α -TUB 乙酰化, α -TUB 乙酰化程度的增加也证明帕比司他具有使染色质松弛, 促进基因转录的作用。

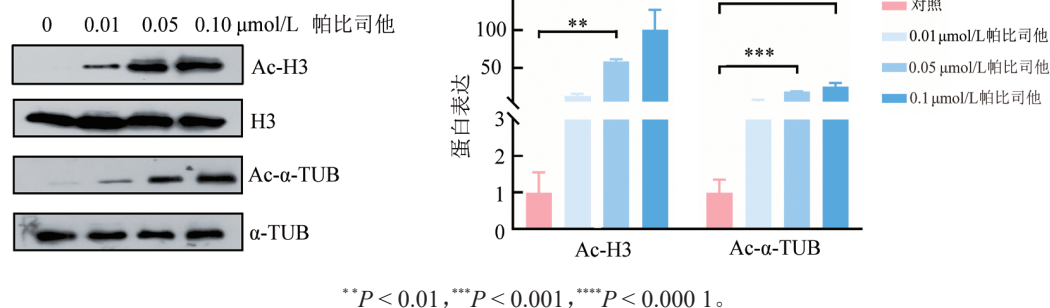


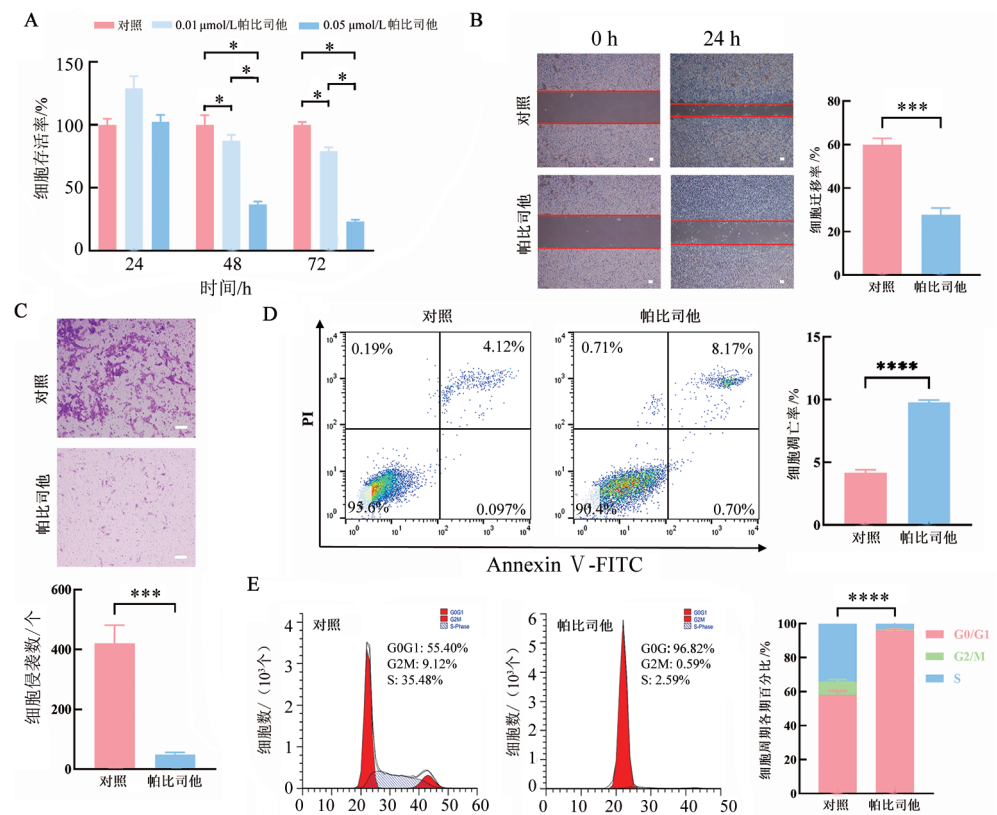
图1 WB法检测不同浓度帕比司他处理对 B16F0 细胞中 Ac-H3 及 α -TUB 表达的影响

2.2 帕比司他抑制 B16F0 细胞增殖、迁移和侵袭能力, 促进其凋亡, 并使细胞周期阻滞于 G1 期

CCK-8 法检测结果 (图 2A) 显示, 与对照组比较, 0.01 和 0.05 μ mol/L 帕比司他组 B16F0 细胞存活率在 48 和 72 h 均明显下降 (均 $P < 0.05$), 并且呈剂量依赖性。划痕愈合实验和 Transwell 实验检测结果 (图 2B、C) 显示, 与对照组比较, 0.05 μ mol/L 帕比司他组 B16F0 细胞迁移和侵袭能力均明显下降 (均 $P < 0.001$)。流式细胞术检测结果 (图 2D、E) 显示, 与对照组比较, 0.05 μ mol/L 帕比司他组 B16F0 细胞的凋亡率明显升高 ($P < 0.05$), 细胞周期阻滞于 G1 期。实验结果表明, 帕比司他抑制 B16F0 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 促进其凋亡, 并且使细胞周期阻滞于 G1 期。

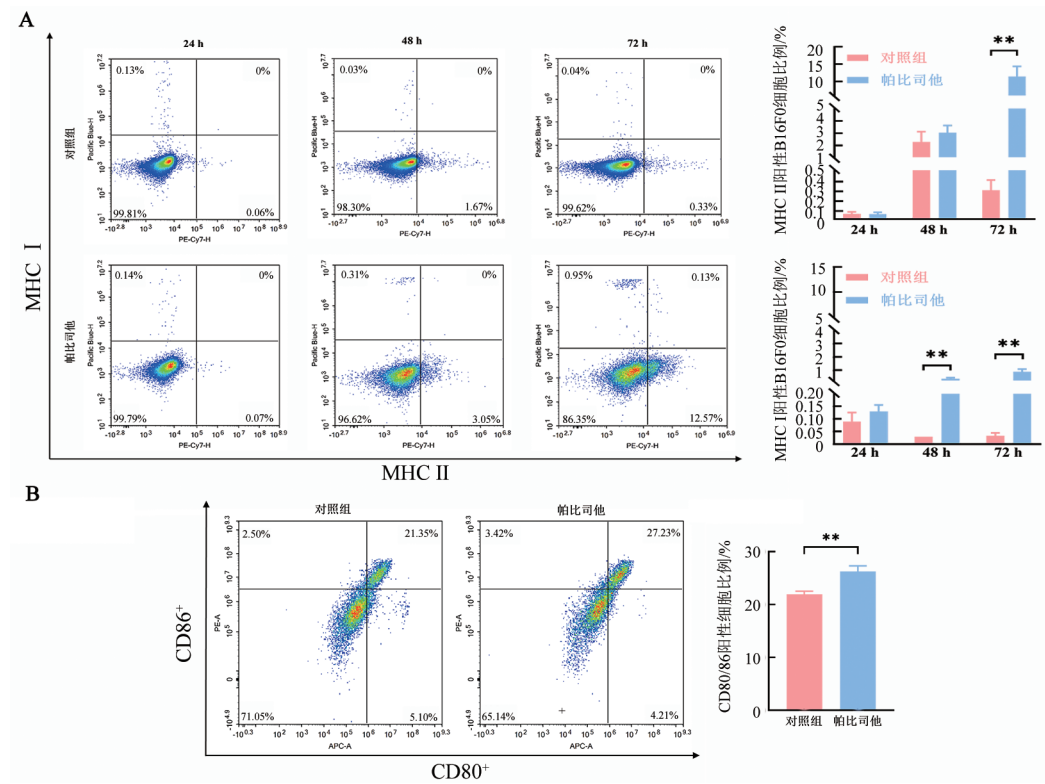
2.3 帕比司他促进 B16F0 细胞表面 MHC I/II 类分子表达并促进共培养 BMDC 成熟

流式细胞术检测结果 (图 3) 显示, 与对照组比较, 帕比司他组 B16F0 细胞表面 MHC I 和 II 类分子表达均明显升高 (均 $P < 0.01$)。进一步将帕比司他处理后的 B16F0 细胞与 BMDC 共培养, 实验结果显示, 与对照组比较, 帕比司他处理后的 B16F0 细胞可显著地刺激 BMDC 细胞成熟, B16F0 细胞与 BMDC 共培养 48 h, CD80⁺/86⁺ 细胞比例明显升高 ($P < 0.05$)。实验结果说明, 帕比司他能促进 B16F0 细胞表面 MHC I/II 分子的表达和 BMDC 成熟, 有利于向 T 细胞提呈特异性抗原信号, 激活 T 细胞杀伤肿瘤细胞, 帕比司他处理能显著改善 B16F0 细胞的免疫性。



A: CCK-8法检测帕比司他处理后B16F0细胞的增殖情况; B: 帕比司他处理后B16F0细胞的迁移情况(标尺 = 100 μm); C: 帕比司他处理后B16F0细胞的侵袭情况(标尺 = 100 μm); D: 帕比司他处理后B16F0细胞凋亡情况; E: 帕比司他处理后B16F0细胞周期分布。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$ 。

图2 帕比司他对B16F0细胞增殖、迁移、侵袭与细胞周期的影响



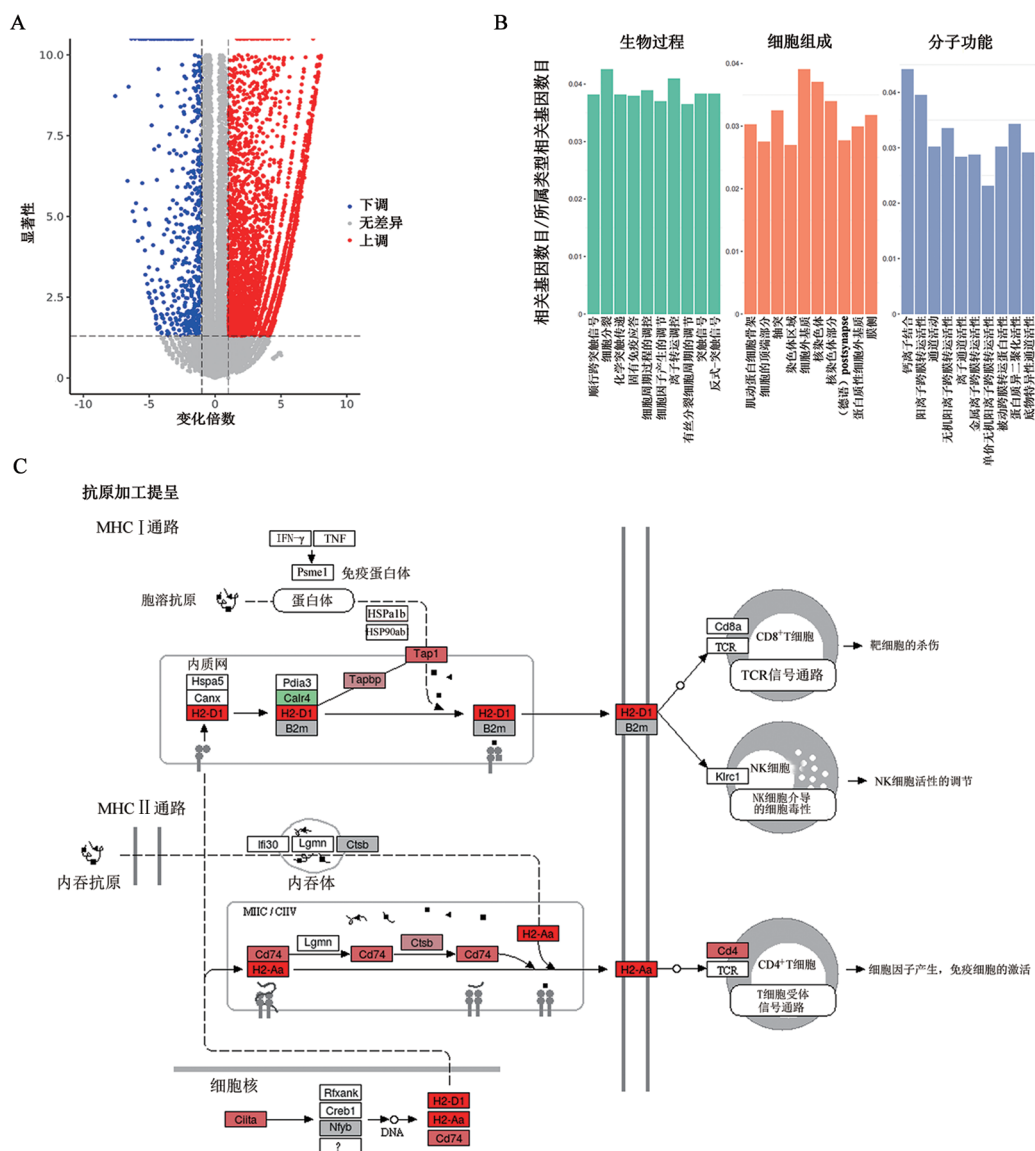
A: 0.05 $\mu\text{mol/L}$ 帕比司他处理后B16F0细胞中MHC I / II分子表达; B: B16F0细胞与BMDC共培养后BMDC中CD80⁺/86⁺表达情况。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图3 帕比司他处理后的B16F0细胞促进BMDC成熟

2.4 帕比司他促进B16F0细胞中E-cadherin和抗原提呈基因的表达,抑制N-cadherin、vimentin、c-Myc和CDK1的表达

转录组测序结果(图4A、B)显示,帕比司他处理后的B16F0细胞,5 267个基因表达上调,2 199个基因表达下调。如,上皮间质转化相关基因(E-cadherin、N-cadherin和vimentin)^[19]中E-cadherin基因表达明显升高($P < 0.001$),N-cadherin和vimentin基因表达均明显降低(图5A~C, $P < 0.01$ 或

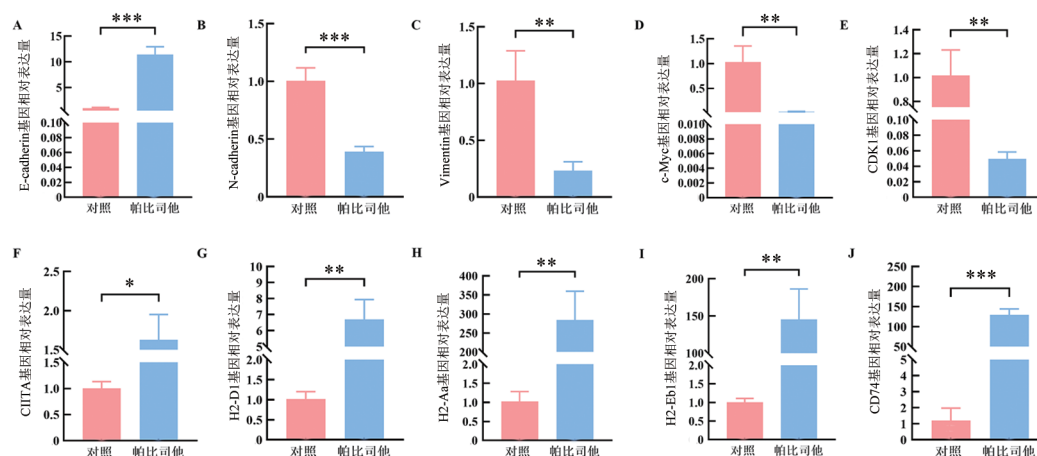
$P < 0.001$);与促进细胞增殖、抑制细胞凋亡等有关的c-Myc基因^[20]表达显著降低(图5D, $P < 0.01$)。细胞周期调控因子CDK1^[21-22]表达显著降低(图5E, $P < 0.01$)。其次,大量与抗原提呈相关的基因(CIITA、H2-Aa、H2-Eb1、H2-D1、CD74)表达明显升高(图4C, $P < 0.05$)。qPCR法验证结果(图5F~J)显示,与对照组比较,帕比司他处理后B16F0细胞中上述基因表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),与转录组测序的结果完全一致。



IFN-γ: interferon-γ(干扰素-γ); TNF: tumor necrosis factor(肿瘤坏死因子); Psmc1: proteasome activator subunit 1(蛋白酶体激活亚基1); CanX: calnexin(钙网蛋白); H2-D1: histocompatibility 2, D region locus 1(组织相容性2, D区域基因座1); Pdia3: protein disulfide isomerase associated 3(蛋白质二硫键异构酶相关3); Calr4: calreticulin 4(钙网蛋白4); HSPA1b: heat shock protein 1B(热休克蛋白1B); B2m: β-2 microglobulin(β-2微球蛋白); IFI30: interferon gamma inducible protein 30(干扰素γ诱导蛋白30); Lgmn: legumain(天冬酰胺内肽酶); Ctsb: cathepsin B(胰蛋白酶B); Ciita: class II transactivator(二类转活化因子); Rfxank: regulatory factor X-associated ankyrin-containing protein(增强子结合因子X相关的含锚蛋白蛋白); creb1: cAMP responsive element binding protein 1(cAMP响应元件结合蛋白1); Nfyb: nuclear transcription factor-Y beta(核转录因子-Yβ)。

A: GO数据库差异基因的火山图; B: 差异基因GO功能富集图; C: KEGG数据库显著富集的MHC I/II分子通路图。

图4 帕比司他处理后的B16F0细胞mRNA测序结果分析



A~C:侵袭、迁移相关基因的相对表达量;D:c-Myc的相对表达量;E:周期蛋白激酶CDK1的相对表达量;F~J:MHC I/II分子的相对表达量。 $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ 。

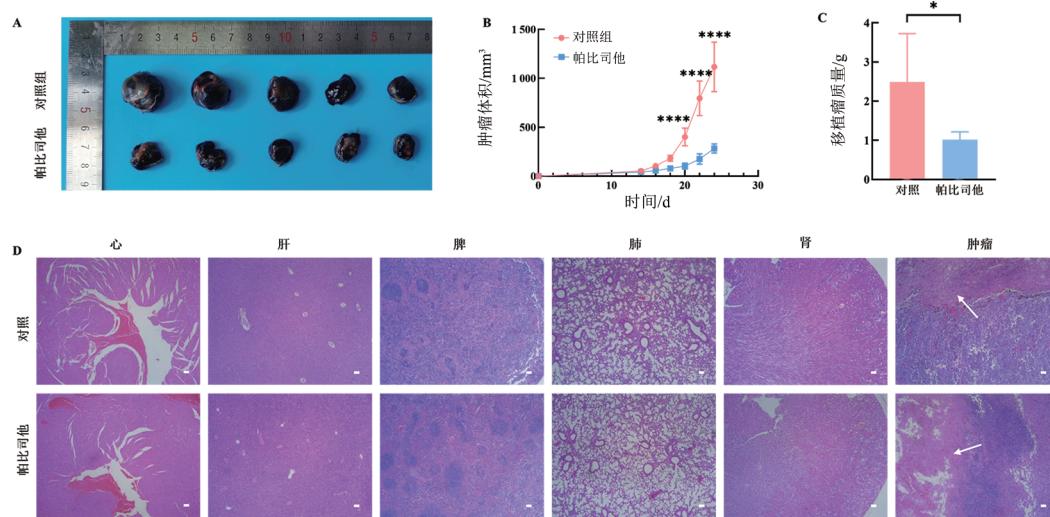
图5 帕比司他处理后B16F0细胞基因的表达量变化

2.5 帕比司他抑制裸鼠移植瘤的生长增强荷瘤裸鼠的免疫功能

裸鼠移植瘤实验检测结果(图6A~C)显示,与对照组比较,帕比司他组移植瘤的体积和质量明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$)。H-E染色检测结果(图6D)显示,与对照组比较,帕比司他组小鼠主要器官心、肝、脾、肺、肾均无明显异常,结果提示,帕比司他对小鼠主要器官没有明显的影响。

流式细胞术检测结果(图7)显示,与对照组比较,帕比司他组裸鼠淋巴结中 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^+$ T细胞和脾组织中 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^+$ T细胞和NK细胞比例均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$)。

利用荧光微球技术的多因子检测结果(图8)显示,与对照组相比,帕比司他组荷瘤裸鼠血清中白介素-1 α (IL-1 α)含量明显升高($P < 0.05$),单核细胞趋化因子-1(MCP-1)含量明显降低($P < 0.01$)。



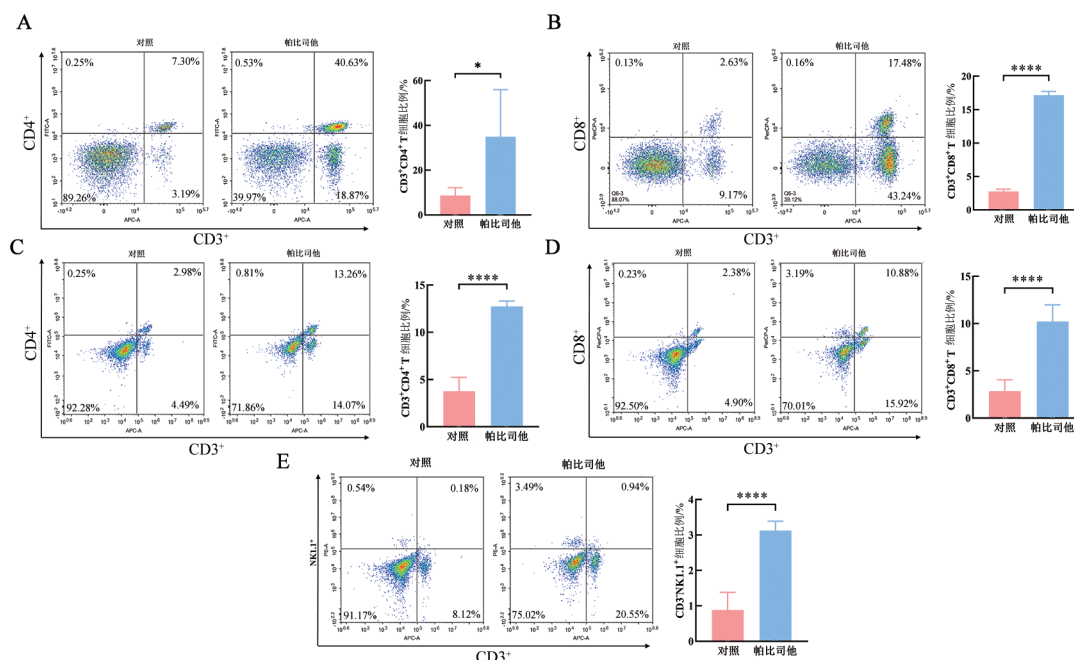
A:移植瘤大体图;B:各组移植瘤生长曲线;C:第24天各组移植瘤的质量;D:各组小鼠重要器官和移植瘤组织的H-E染色(标尺 = 100 μ m),箭头所示为坏死部位。与对照组比较, $^*P < 0.05$, $^{****}P < 0.0001$ 。

图6 帕比司他对裸鼠移植瘤生长及主要脏器的影响

3 讨论

尽管目前有部分HDAC抑制剂药物对黑色素瘤的治疗进入到了临床试验阶段,如伏立诺他和帕比司他^[6,23]。但这些HDAC抑制剂药物主要是通过免疫检查点联用的方式进行,虽然结果显示HDAC抑制剂药

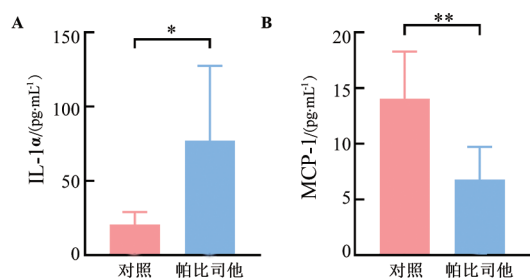
物显著提高了免疫检查点药物的疗效,但并未进行深入的机制探索^[7]。在本研究选择了目前常用的帕比司他,探索了其对于黑色素瘤生长和免疫功能的影响,并进一步通过转录组测序和qPCR法验证探究帕比司他对黑色素瘤细胞基因表达的影响,试图探索帕比司他影响黑色素瘤细胞的生长和免疫功能的机制。



A: 淋巴结中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞代表性的流式细胞图; B: 淋巴结中 CD3⁺CD8⁺ T 细胞代表性的流式细胞图; C: 脾中 CD3⁺CD4⁺ T 细胞代表性的流式细胞图; D: 脾脏中 CD3⁺CD8⁺ T 细胞代表性的流式细胞图; E: 脾中 CD3⁺NK1.1⁺ NK 细胞代表性的流式细胞图。

*P < 0.05, ****P < 0.0001。

图7 帕比司他对荷瘤裸鼠淋巴结和脾组织中的免疫细胞比例的影响



A: 荷瘤裸鼠血清中 IL-1α 表达的变化; B: 荷瘤裸鼠血清中 MCP-1 表达的变化。*P < 0.05, **P < 0.01。

图8 荷瘤裸鼠血清中 IL-1α 和 MCP-1 的表达

首先,本研究用 WB 法证明帕比司他剂量依赖性促进 B16F0 细胞中组 H3 和 α-TUB 乙酰化程度增高,这表明黑色素瘤细胞 B16F0 细胞对帕比司他敏感。实验结果还表明,帕比司他抑制 B16F0 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,并促进其凋亡。MYC 基因编码的转录因子家族是肿瘤中最常见的活化癌蛋白,可促进细胞增殖、抑制细胞凋亡,已证明在小鼠模型中抑制 MYC 基因可触发肿瘤消退^[24,25]。本研究发现,帕比司他抑制 B16F0 细胞 c-Myc 基因的表达,这可能是帕比司他抑制 B16F0 恶性生物学行为,促进其凋亡的机制。上皮间质转化(EMT)是促进肿瘤发生发展和广泛转移的关键机制,高转移性 4T1 乳腺癌模型表现为 EMT 杂交表型^[26]。E-cadherin 表达减少或缺失被认为是 EMT 的标志^[19],而 N-cadherin^[27] 和 vimentin 过表达^[28] 则可提高肿瘤细胞的侵袭能力。本实验

发现,帕比司他促进 E-cadherin 表达,抑制 N-cadherin 和 vimentin 的基因表达,表明帕比司他可抑制 B16F0 细胞的 EMT 进程,从而抑制 B16F0 细胞恶性生物学行为。周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase, CDK)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,与细胞周期蛋白形成复合体,CDK 在调控细胞周期、转录和剪接中起着至关重要的作用^[22,29]。本研究发现,帕比司他能抑制 B16F0 细胞中 CDK1 表达,细胞周期阻滞于 G1 期。

尽管免疫疗法在黑色素瘤治疗中应用较多,但由于原发性耐受或继发性免疫耐受的原因,约 40% 的黑色素瘤患者对联合免疫疗法无应答,约 30% 的患者初次应答后出现肿瘤复发或进展^[30]。因此,改善黑色素瘤的免疫原性,提高免疫治疗的应答率将有助于更多黑色素瘤患者从免疫疗法中获益。本研究通过测序结果发现,帕比司他能激活 B16F0 细胞中的 MHC I/II 信号通路。MHC I/II 是重要的抗原提呈途径,分别介导了 CD8⁺ T 和 CD4⁺ T 细胞的激活^[31,32]。本研究发现,帕比司他能显著促进 B16F0 细胞中大量与 MHC I/II 相关基因(CIITA、H2-Aa、H2-Eb1、H2-D1、CD74)的表达。流式细胞术检测结果也证实,帕比司他促进 B16F0 细胞表面的 MHC I 和 MHC II 的表达。文献报道^[33],MHC I/II 抗原提呈减少的原因之一是 HDAC 功能的失调,它们从组蛋白中移除乙酰基,导致染色质结构更加封闭,从而阻止 MHC I/II 的基因转录,而帕比司他能够调控 HDAC,使组蛋白乙酰化程度增高,染色质结构松弛

进而促进基因转录。其中, H2-D1 基因编码的蛋白质是 MHC I 类分子的一部分, 其具有抗原提呈功能^[34-35]。帕比司他使 H2-D1 基因表达增加, 有利于 MHC I 类分子将抗原提呈给 CD8⁺ T 细胞触发免疫应答。在过去很长一段时间, 关于肿瘤抗原的临床研究主要集中在 MHC I 类分子上。然而, 随着对肿瘤免疫认识的深入, 以及基础和临床研究数据的积累, MHC II 类分子限制性抗原肽在肿瘤免疫中的作用受到了越来越多的关注^[36-37]。一般认为, 肿瘤表面的 MHC II 表达与具有抗肿瘤效应的 CD4⁺ T 细胞的激活有关。本研究 mRNA 测序和 qPCR 法检测结果都显示, 帕比司他促进与 MHC II 相关的 H2-Aa、H2-Eb1、CD74 的表达。H2-Aa、H2-Eb1 基因编码的蛋白质作为 MHC II 类分子, 在抗原加工和 MHC II 类提呈外源肽抗原的上游或内部发挥作用, 并对 T 细胞分化具有正向调节作用, 而 CD74 则辅助 MHC II 类分子提呈外源性抗原肽, 启动特异性体液免疫应答^[38]。CIITA 作为 II 类反式激活因子, 可调控 MHC II 类基因的转录^[39-40]。帕比司他促进 H2-Aa、H2-Eb1、CD74、CIITA 基因的表达, 有利于 MHC II 类分子将抗原提呈给 CD4⁺ T 细胞触发免疫应答。

总的来说, 帕比司他促进 B16F0 细胞的 MHC I / II 相关基因表达, 增强 B16F0 细胞表面 MHC I / II 分子表达, 从而改善 B16F0 细胞免疫性。B16F0 细胞和 BMDC 共培养的实验结果显示, 帕比司他处理后的 B16F0 细胞促进 BMDC 成熟的能力更强, 与体内动物免疫激活实验结果相符。体内的动物实验结果显示, 淋巴结和脾中 CD8⁺ T、CD4⁺ T 细胞的比例显著升高。值得注意的是, 虽然 CD4⁺ T 细胞的亚型中还有免疫抑制细胞, 如 Treg 细胞^[41]。但根据前文中提到 MHC II 主要激活具有抗肿瘤效应的 CD4⁺ T 细胞的理论; 动物实验中肿瘤生长受到抑制, 免疫反应被激活的结果来看, 更趋向认为是具有抗肿瘤能力的 CD4⁺ T 细胞数增加, 但增加的 CD4⁺ T 细胞的具体分型, 尚需要进一步的研究。

尽管有 I 期临床试验表明, 帕比司他作为单药使用于晚期黑色素瘤患者效果欠佳且毒性较大^[23,42]。但黑色素瘤作为一种突变负荷高、异质性高的肿瘤, 多种治疗方案联合应用是临床上公认的能使患者从中获益的治疗方案。事实上, 目前大部分 HDAC 抑制剂单药在黑色素瘤的临床试验中均存在毒性较大^[7,43]。目前, 大部分的 HDAC 抑制剂在黑色素瘤临床试验中均需与其他疗法联合应用。伏立诺他和蛋白酶体抑制剂马里佐米(marizomib)联用治疗黑色素瘤的临床试验数据显示, 在 2 个治疗周期后, 50% 的患者病情稳定^[43]。同样, 帕比司他与其他治疗方案联

用也可以起到明显的增效减毒的作用。1 项已经完成的 I 期临床试验评估了帕比司他与地西他滨和替莫唑胺(NCT00925132)联合使用的耐受性和疗效^[44]。该研究涉及 20 例患有 III 期或 IV 期皮肤、眼部或黏膜黑色素瘤的患者。联用后显示, 1 例黏膜黑色素瘤患者 8 个月完全缓解, 5 例患者病情稳定。本研究结果显示, 帕比司他对黑色素瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、细胞周期、凋亡和免疫性均具有影响, 表明帕比司他与其他黑色素瘤疗法联合应用的良好前景。

综上所述, 帕比司他可显著地增强 B16F0 细胞中的组蛋白乙酰化程度, 抑制黑色素瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 促进其凋亡并使其细胞周期阻滞于 G1 期。帕比司他通过抑制移植瘤的增殖迁移和侵袭, 以及调节肿瘤细胞的免疫性有效地抑制黑色素瘤的生长, 为帕比司他在临床上与其他方法的联用提供了理论依据。

[参 考 文 献]

- [1] ELDER D E, BASTIAN B C, CREE I A, *et al.* The 2018 world health organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway[J]. ARCH PATHOL LAB MED, 2020, 144 (4): 500-522. DOI:10.5858/arpa.2019-0561-RA.
- [2] LONG G V, SWETTER S M, MENZIES A M, *et al.* Cutaneous melanoma[J]. The Lancet, 2023, 402(10400): 485-502. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.
- [3] HORNIG E, HEPPT M V, GRAF S A, *et al.* Inhibition of histone deacetylases in melanoma-a perspective from bench to bedside[J]. WILEY Exp Dermatol, 2016; 25: 831-838. DOI: 10.1111/exd.13089.
- [4] JENKINS R W, FISHER D E. Treatment of advanced melanoma in 2020 and beyond[J]. JID, 2021, 141(1): 23-31. DOI: 10.1016/j.jid.2020.03.943.
- [5] SWITZER B, PUZANOV I, SKITZKI J J, *et al.* Managing metastatic melanoma in 2022: a clinical review[J]. JCO Oncol Pract, 2022, 18(5): 335-351. DOI: org/10.1200/OP.21. 00686.
- [6] YEON M, KIM Y, JUNG H S, *et al.* Histone deacetylase inhibitors to overcome resistance to targeted and immuno therapy in metastatic melanoma[J/OL]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 486 [2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32626712/>. DOI: 10.3389/fcell.2020.00486.
- [7] PALAMARIS K, MOUTAFI M, GAKIOPOULOU H, *et al.* Histone deacetylase (HDAC) inhibitors: a promising weapon to tackle therapy resistance in melanoma[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(7): 3660[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35409020/>. DOI: 10.3390/ijms23073660.
- [8] SOURI Z, JOCHEMSEN A G, WIERENGA A P A, *et al.* Expression of HDACs 1, 3 and 8 is upregulated in the presence of infiltrating lymphocytes in uveal melanoma[J/OL]. Cancers (Basel), 2021, 13 (16): 4146[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439300/>. DOI:10.3390/cancers13164146.
- [9] LEVIDOU G, GAJDZIS P, CASSOUX N, *et al.* Histone deacetylase

- (HDAC)-1, -2, -4, and -6 in uveal melanomas: associations with clinicopathological parameters and patients' survival[J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(19): 4763[2024-12-07]. <https://doi.org/10.3390/cancers13194763>. DOI:10.3390/cancers13194763.
- [10] WILMOTT J S, COLEBATCH A J, KAKAVAND H, *et al.* Expression of the class 1 histone deacetylases HDAC8 and 3 are associated with improved survival of patients with metastatic melanoma[J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(7): 884-894. DOI: 10.1038/modpathol.2015.34.
- [11] GOUTAS D, THEOCHARIS S, TSOUROUFLIS G. Unraveling the epigenetic role and clinical impact of histone deacetylases in neoplasia [J/OL]. *Diagnosis(Basel)*, 2021, 11(8): 1346[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34441281/>. DOI: 10.3390/diagnostics11081346.
- [12] LI X, SU X, LIU R, *et al.* HDAC inhibition potentiates anti-tumor activity of macrophages and enhances anti-PD-L1-mediated tumor suppression[J]. *Oncogene*, 2021, 40(10): 1836-1850. DOI:10.1038/s41388-020-01636-x.
- [13] SUNDARAMURTHI H, GARCÍA-MULERO S, TONELOTTO V, *et al.* Uveal melanoma cell line proliferation is inhibited by ricolinostat, a histone deacetylase inhibitor[J/OL]. *Cancers(Basel)*, 2022, 14(3): 782[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35159049/>. DOI:10.3390/cancers14030782.
- [14] BORCOMAN E, KAMAL M, MARRET G, *et al.* HDAC inhibition to prime immune checkpoint inhibitors[J]. *Cancers*, 2021, 14(1): 66. DOI:10.3390/cancers14010066.
- [15] BONDAREV A D, ATTWOOD M M, JONSSON J, *et al.* Recent developments of HDAC inhibitors: emerging indications and novel molecules[J]. *Brit J Clin Pharmacol*, 2021, 87(12): 4577-4597. DOI: 10.1111/bcp.14889.
- [16] SAVVIDOU I, KHONG T, WHISH S, *et al.* Combination of histone deacetylase inhibitor panobinostat (lbh589) with β -catenin inhibitor tegavivint (BC2059) exerts significant anti-myeloma activity both *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *Cancers(Basel)*, 2022, 14(3): 840[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35008230/>. DOI: 10.3390/cancers14030840.
- [17] XIAO Y, LIN F T, LIN W C. ACTL6A promotes repair of cisplatin-induced DNA damage, a new mechanism of platinum resistance in cancer[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci*, 2021, 118(3): e2015808118 [2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33408251/>. DOI: 10.1073/pnas.2015808118.
- [18] MENSAH A A, SPRIANO F, SARTORI G, *et al.* Study of the antilymphoma activity of pracinostat reveals different sensitivities of DLBCL cells to HDAC inhibitors[J]. *Blood Advances*, 2021, 5(10): 2467-2480. DOI:10.1182/bloodadvances.2020003566.
- [19] RUBTSOVA S N, ZHITNYAK I Y, GLOUSHANKOVA N A. Dual role of E-cadherin in cancer cells[J/OL]. *Tissue Barriers*, 2022, (10), 4: e2005420[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34821540/>. DOI: 10.1080/21688370.2021.2005420.
- [20] DUFFY M J, O'GRADY S, TANG M, *et al.* MYC as a target for cancer treatment[J]. *Cancer Treat Rev*, 2021, 94: 102154. DOI: 10.1016/j.ctrv.2021.102154.
- [21] ENSERINK J M, CHYMKOWITCH P. Cell cycle-dependent transcription: the cyclin dependent kinase cdk1 is a direct regulator of basal transcription machineries[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1293. [2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35163213/>. DOI: org/10.3390/ijms23031293.
- [22] WANG Q. Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications [J/OL]. *NPJ Precis Oncol*, 2023, 237: 58[2024-12-07]. <https://doi.org/10.1038/s41698-023-00407-7>. DOI: org/10.1038/s41698-023-00407-7.
- [23] IBRAHIM N, BUCHBINDER E I, GRANTER S R, *et al.* A phase I trial of panobinostat (LBH589) in patients with metastatic melanoma [J]. *Cancer Medicine*, 2016, 5(11): 3041-3050. DOI:10.1002/cam4.862.
- [24] MADDEN S K, DE ARAUJO A D, GERHARDT M, *et al.* Taking the Myc out of cancer: toward therapeutic strategies to directly inhibit c-Myc[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 3. DOI:10.1186/s12943-020-01291-6.
- [25] DHANASEKARAN R, DEUTZMANN A, MAHAUAD-FERNANDEZ W D, *et al.* The MYC oncogene-the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2022, 19(1): 23-36. DOI: 10.1038/s41571-021-00549-2.
- [26] HERNDON M E, AYERS M, GIBSON-CORLEY K N, *et al.* The highly metastatic 4T1 breast carcinoma model possesses features of a hybrid epithelial/mesenchymal phenotype[J/OL]. *Dis Model Mech*, 2024, 17(9): dmm050771[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39104192/>. DOI:10.1242/dmm.050771.
- [27] CAO Z Q, WANG Z, LENG P. Aberrant N-cadherin expression in cancer[J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109320[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31545265/>. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109320.
- [28] USMAN S, WASEEM N H, NGUYEN T K N, *et al.* Vimentin is at the heart of epithelial mesenchymal transition (EMT) mediated metastasis [J/OL]. *Cancers*, 2021, 13(19): 4985[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34638469/>. DOI:10.3390/cancers13194985.
- [29] ŁUKASIK P, ZAŁUSKI M, GUTOWSKA I. Cyclin-dependent kinases (CDK) and their role in diseases development-review[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 2935[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33805800/>. DOI:10.3390/ijms22062935.
- [30] LIU H, OU J, HUNG M C, *et al.* Immune checkpoint blockades therapy of melanoma[J]. *Sci Bull*, 2023, 68(4): 356-358. DOI: 10.1016/j.scib.2023.02.003.
- [31] PURCELL A W, RAMARATHINAM S H, TERNETTE N. Mass spectrometry - based identification of MHC-bound peptides for immunopeptidomics[J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(6): 1687-1707. DOI: 10.1038/s41596-019-0133-y.
- [32] SEWELL A K. Why must T cells be cross-reactive?[J]. *Nature Rev Immunol*, 2012, 12(9): 669-677. DOI:10.1038/nri3279.
- [33] JENKINS R W, BARBIE D A, FLAHERTY K T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors[J]. *Br J Cancer*, 2018, 118(1): 9-16. DOI:10.1038/bjc.2017.434.
- [34] WEN J, CHENG S, WANG R, *et al.* Group 2 innate lymphoid cells boost CD8⁺ T-cell activation in anti-tumor immune responses [J/OL]. *OncoImmunology*, 2023, 12(1): 2243112[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37577145/>. DOI: 10.1080/2162402X.2023.2243112.
- [35] ANDERSON C K, BROSSAY L. The role of MHC class Ib-restricted T cells during infection[J]. *Immunogenetics*, 2016, 68(8): 677-691. DOI:10.1007/s00251-016-0932-z.
- [36] ALSPACH E, LUSSIER D M, MICELI A P, *et al.* MHC- II neoantigens

- shape tumour immunity and response to immunotherapy[J]. *Nature*, 2019, 574(7780): 696-701. DOI:10.1038/s41586-019-1671-8.
- [37] SUN Z. MHC class II restricted neoantigen: a promising target in tumor immunotherapy[J]. *Cancer Lett*, 2016, 392: 17-25. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.12.039.
- [38] TURNER T B, MEZA-PEREZ S, LONDOÑO A, *et al*. Epigenetic modifiers upregulate MHC II and impede ovarian cancer tumor growth[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(27): 44159-44170. DOI: 10.18632/oncotarget.17395.
- [39] HAN Y, ZHANG X, WANG Q, *et al*. IL-27p28 specifically regulates MHC II expression in macrophages through CIITA[J/OL]. *Immunobiology*, 2023, 228(6): 152757[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37944428/>. DOI:10.1016/j.imbio. 2023.152757.
- [40] WRIGHT K L, TING J P Y. Epigenetic regulation of MHC- II and CIITA genes[J/OL]. *Trends Immunol*, 2006, 27(9): 405-412[2024-12-07]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16870508/>. DOI: 10.1016/j.it.2006.07.007.
- [41] OHKURA N, SAKAGUCHI S. Transcriptional and epigenetic basis of Treg cell development and function: its genetic anomalies or variations in autoimmune diseases[J]. *Cell Res*, 2020, 30(6): 465-474. DOI: 10.1038/s41422-020-0324-7.
- [42] KHUSHALANI N I, MARKOWITZ J, EROGLU Z, *et al*. A phase I trial of panobinostat with ipilimumab in advanced melanoma[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(15_suppl): 9547-9547. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9547.
- [43] MILLWARD M, PRICE T, TOWNSEND A, *et al*. Phase I clinical trial of the novel proteasome inhibitor marizomib with the histone deacetylase inhibitor vorinostat in patients with melanoma, pancreatic and lung cancer based on *in vitro* assessments of the combination[J]. *Invest New Drugs*, 2012, 30(6): 2303-2317. DOI: 10.1007/s10637-011-9766-6.
- [44] XIA C, LEON-FERRE R, LAUX D, *et al*. Treatment of resistant metastatic melanoma using sequential epigenetic therapy (decitabine and panobinostat) combined with chemotherapy (temozolomide) [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(4): 691-697. DOI: 10.1007/s00280-014-2501-1.
- [收稿日期] 2024-12-08 [修回日期] 2025-08-04
[本文编辑] 向正华