

通关藤注射液调节巨噬细胞极化协同多柔比星抗三阴性乳腺癌的作用机制

魏诗婷^{1,2}, 杨柳青^{1,2,3*}, 陈小菲^{1,2,3}, 韩博洋^{1,2}, 郑亚娟^{1,2}, 张明亮^{1,2,3}, 吴娅丽^{1,2,3}, 张辉^{1,2,3}, 王晓艳^{1,2,3,4}, 李伟霞^{1,2,3,4}, 唐进法^{1,2,3,4*}

1. 河南中医药大学第一附属医院 药学部, 河南 郑州 450003
2. 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046
3. 河南省中药临床应用、评价与转化工程研究中心, 河南省中药临床药理学中医药重点实验室, 河南省中药安全评价与风险防控工程研究中心, 河南 郑州 450003
4. 河南中医药大学 呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 河南 郑州 450046

摘要: **目的** 探究通关藤注射液(Tongguanteng Injection, TGT)调节巨噬细胞极化进而协同多柔比星(doxorubicin, DOX)抑制三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)生长的作用机制。**方法** 构建4T1乳腺癌荷瘤小鼠模型,随机分为模型组、TGT组、DOX组及TGT联合DOX治疗组,观察肿瘤体积及质量,评估体内抗肿瘤疗效;采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)、TUNEL及免疫组化染色检测肿瘤组织病理、细胞凋亡及剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)表达;通过免疫器官指数、血常规分析评估小鼠免疫功能;ELISA、qRT-PCR及免疫荧光染色检测肿瘤组织炎症因子水平和巨噬细胞极化标志物CD86、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、CD206、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)的表达;流式细胞术及免疫组化分析肿瘤组织CD4⁺T、CD8⁺T细胞浸润比例;qRT-PCR检测T细胞耗竭相关因子及细胞毒性因子的mRNA表达;转录组测序及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析挖掘核心信号通路并进行验证。**结果** 与模型组比较,TGT组、DOX组及TGT联合DOX治疗组小鼠的肿瘤体积和质量显著降低($P<0.01$ 、 0.001),肿瘤组织出现不同程度坏死,肿瘤细胞凋亡率显著升高($P<0.001$),其中TGT联合DOX治疗组上述变化更为显著($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与模型组相比,TGT组的促炎因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素- 1β (interleukin- 1β , IL- 1β)表达水平显著升高($P<0.01$ 、 0.001),抗炎因子IL-4、IL-10表达水平显著降低($P<0.05$ 、 0.01);M1型巨噬细胞(CD86⁺/F4/80⁺)比例增加($P<0.001$),标志物CD86、iNOS mRNA表达水平显著升高($P<0.05$ 、 0.01);M2型巨噬细胞(CD206⁺/F4/80⁺)比例减少($P<0.001$),标志物CD206、Arg-1 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$ 、 0.001);CD8⁺T细胞比例显著升高($P<0.05$ 、 0.001),CD4⁺T细胞比例显著降低($P<0.01$);T细胞耗竭指标程序性死亡受体-1(programmed cell death protein 1, PD-1)、T细胞免疫球蛋白和黏蛋白分子-3(T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3, Tim-3)、淋巴细胞活化基因-3(lymphocyte activation gene-3, Lag-3) mRNA表达水平显著下调($P<0.05$ 、 0.01),T细胞毒性因子穿孔素(perforin)、 γ 干扰素(interferon γ , IFN- γ)、颗粒酶B(granzyme B) mRNA表达水平显著上调($P<0.05$ 、 0.001);TGT联合DOX治疗组上述变化更加显著($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。转录组及KEGG富集分析显示,与模型组比较,联合治疗组差异基因显著富集于Janus激酶(Janus kinase, JAK)-信号转导和转录激活蛋白(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路;免疫组化染色结果表明TGT联合DOX显著下调肿瘤细胞中p-JAK2和p-STAT3蛋白的表达($P<0.001$)。**结论** TGT联合DOX显著抑制TNBC的生长,促进肿瘤相关巨噬细胞由M2型向M1型极化,促进CD8⁺T细胞浸润并减轻其耗竭,其作用机制与抑制JAK-STAT信号通路的磷酸化有关。

关键词: 通关藤注射液;多柔比星;三阴性乳腺癌;巨噬细胞极化;免疫调节;JAK-STAT信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)09-3414-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.014

收稿日期: 2026-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82204838);河南省医学科技攻关计划省部共建项目(SBGJ202302100);河南省高校科技创新团队(23IRTSTHN026);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY3012, 2022ZYZD01);河南省医学科技攻关计划项目(LHGJ20250411);河南省高校科技创新人才支持计划(25HASTIT061);河南省第三批中医药学科拔尖人才项目(豫卫中医药科教函[2025]14号);河南省自然科学基金面上科学基金项目(262300421585)

作者简介: 魏诗婷, 硕士研究生, 从事中药质量评价与合理用药研究。E-mail: wst17836939909@163.com

***通信作者:** 杨柳青, 博士, 从事中药质量评价与合理用药研究。E-mail: yangliuqing@163.com

唐进法, 博士, 博士生导师, 从事中药质量评价与合理用药研究。E-mail: a0519@163.com

Mechanism of Tongguanteng Injection in regulating macrophage polarization and cooperating with doxorubicin in anti-triple negative breast cancer

WEI Shiting^{1, 2}, YANG Liuqing^{1, 2, 3}, CHEN Xiaofei^{1, 2, 3}, HAN Boyang^{1, 2}, ZHENG Yajuan^{1, 2}, ZHANG Mingliang^{1, 2, 3}, WU Yali^{1, 2, 3}, ZHANG Hui^{1, 2, 3}, WANG Xiaoyan^{1, 2, 3, 4}, LI Weixia^{1, 2, 3, 4}, TANG Jinfan^{1, 2, 3, 4}

1. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

2. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Henan Provincial Engineering Research Center for Clinical Application, Evaluation and Transformation of Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial Key Laboratory of Clinical Pharmacy and Traditional Chinese Medicine, Henan Provincial Engineering Research Center for Safety Evaluation and Risk Prevention of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

4. Provincial-Ministerial Jointly-Built Collaborative Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Respiratory Diseases, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which Tongguanteng Injection (通关藤注射液, TGT) modulates macrophage polarization to synergize with doxorubicin (DOX) in inhibiting triple-negative breast cancer (TNBC) growth. **Methods** A 4T1 TNBC-bearing mouse model was constructed, randomly divided into model group, TGT group, DOX group and TGT combined with DOX treatment group. Tumor volume and weight were observed to evaluate *in vivo* antitumor efficacy. Hematoxylin-eosin (HE), TUNEL and immunohistochemical staining were employed to examine histopathological morphological changes in tumor tissues, tumor cell apoptosis, and protein expressions of cleaved cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2 associated X protein (Bax). Immune organ indices and routine blood analysis were conducted to assess immune function in mice. ELISA, qRT-PCR and immunofluorescence staining were performed to measure inflammatory cytokine levels and expressions of macrophage polarization markers *CD86*, inducible nitric oxide synthase (*iNOS*), *CD206*, arginase-1 (*Arg-1*) in tumor tissues. Flow cytometry and immunohistochemical analysis were used to determine the infiltration ratios of CD4⁺ T and CD8⁺ T cells, while qRT-PCR was employed to detect mRNA expression levels of T cell exhaustion-related factors and cytotoxic factors. Transcriptome sequencing and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted to identify core signaling pathways and perform validation. **Results** Compared with model group, the tumor volume and weight were significantly reduced in TGT group, DOX group and TGT combined with DOX treatment group ($P < 0.01, 0.001$), varying degrees of necrosis were observed in tumor tissues, the apoptosis rate of tumor cells was significantly increased ($P < 0.001$), these changes were more pronounced in TGT + DOX combination therapy group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Compared with model group, the expression levels of pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were significantly increased in TGT group ($P < 0.01, 0.001$), while the expression levels of anti-inflammatory cytokines IL-4 and IL-10 were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The proportion of M1-type macrophages (CD86⁺/F4/80⁺) was increased ($P < 0.001$), with significantly elevated mRNA expression levels of markers *CD86* and *iNOS* ($P < 0.05, 0.01$). The proportion of M2-type macrophages (CD206⁺/F4/80⁺) was decreased ($P < 0.001$), with significantly reduced mRNA expression levels of markers *CD206* and *Arg-1* ($P < 0.01, 0.001$). The proportion of CD8⁺ T cells was significantly increased ($P < 0.05, 0.001$), while the proportion of CD4⁺ T cells was significantly decreased ($P < 0.01$). The mRNA expression levels of T cell exhaustion markers programmed cell death protein-1 (*PD-1*), T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3 (*Tim-3*) and lymphocyte activation gene-3 (*Lag-3*) were significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01$), whereas the mRNA expression levels of T cell cytotoxic factors *perforin*, interferon- γ (*IFN- γ*) and *granzyme B* were significantly upregulated ($P < 0.05, 0.001$). These changes were more pronounced in TGT combined with DOX treatment group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Transcriptome and KEGG enrichment analyses revealed that, compared with model group, differentially expressed genes in the combination therapy group were significantly enriched in Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway. Immunohistochemical staining results indicated that TGT combined with DOX significantly downregulated the expressions of p-JAK2 and p-STAT3 proteins in tumor cells ($P < 0.001$). **Conclusion** TGT combined with DOX significantly inhibits the growth of TNBC, promotes the polarization of tumor associated macrophages from M2 to M1, promotes CD8⁺ T cell infiltration and reduces their exhaustion. Its mechanism is related to the inhibition of phosphorylation of JAK-STAT signaling pathway.

Key words: Tongguanteng Injection; doxorubicin; triple-negative breast cancer; macrophage polarization; immunomodulation; JAK-STAT signaling pathway

乳腺癌是全球女性中发病率最高的恶性肿瘤，在我国其发病率逐年攀升，已成为严重威胁女性健康的重要疾病之一^[1]。其中三阴性乳腺癌（triple-negative breast cancer, TNBC）占乳腺癌的15%~20%，因雌激素受体、孕激素受体和人表皮生长因子受体均为阴性，目前化疗仍为其主要治疗手段^[2]。多柔比星（doxorubicin, DOX）是治疗乳腺癌的一线抗肿瘤药物，DOX虽能直接杀伤肿瘤细胞，但随着使用剂量的增加，往往伴随心脏毒性和耐药性等不良反应^[3]。中医辨证论治强调机体的整体调节，而肿瘤的发生发展与免疫功能密切相关。肿瘤患者普遍存在免疫功能低下的情况，同步化疗虽能增强肿瘤杀伤效果，但会损伤机体正气，进一步削弱免疫功能。中医药治疗可有效改善患者的免疫功能与体力状况，减轻不良反应及临床症状，提高远期生存率与生活质量，是肿瘤综合治疗中不可或缺的重要手段^[4]。近年来大量研究表明，中药与化疗联合用药可协同增效、降低化疗药物不良反应及克服耐药性^[5]。

肿瘤微环境（tumor microenvironment, TME）是由肿瘤细胞、免疫细胞、炎症细胞和多种细胞因子等构成的复杂系统，与肿瘤的生长和转移密切相关^[6]。TME中存在大量肿瘤相关巨噬细胞（tumor-associated macrophages, TAM），其作为核心抗原呈递细胞向T细胞呈递肿瘤抗原，这种抗原呈递会驱动T细胞向短寿、无自我更新能力的耗竭态转化，从而抑制T细胞的活化、增殖和浸润，促进肿瘤免疫逃逸^[7]。根据表型和功能差异，TAM可分为抑制肿瘤的M1型巨噬细胞和促进肿瘤的M2型巨噬细胞。研究表明，多数肿瘤组织中的TAM呈现M2型表型，其通过分泌白细胞介素-4（interleukin-4, IL-4）等因子限制T细胞增殖，导致T细胞耗竭和功能障碍，进而促进肿瘤生长和转移，并参与免疫抑制。M1型巨噬细胞通过释放IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）等促炎细胞因子，促进炎症反应，激活抗肿瘤免疫应答，并增强CD8⁺T细胞的抗肿瘤反应^[8-9]。

通关藤为萝藦科牛奶菜属植物通关藤 *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn. 的干燥藤茎，具有清热解毒、散结止痛的功效，其制剂通关藤注射液（Tongguanteng Injection, TGT）在肿瘤治疗中发挥重要作用，可抑制肿瘤细胞增殖、调节肿瘤血管生成并诱导肿瘤细胞凋亡等，临床常用于

乳腺癌、食管癌和胃癌等治疗^[10]。研究表明，TGT通过抑制肝癌源性生长因子的表达，促进巨噬细胞由M2型向M1型转化，从而增强抗肝癌疗效^[11]；通关藤注射液联合紫杉醇可有效提升乳腺癌患者术前和术后化疗效果，改善临床症状和血清肿瘤标志物水平，提高患者的免疫功能和生存质量^[12]。课题组前期研究发现TGT可逆转人乳腺癌DOX耐药MCF-7/DOX细胞耐药性，与DOX协同抑制MCF-7/DOX细胞的增殖和迁移^[13]，但在TNBC中TGT联合DOX的药效作用及调控免疫微环境发挥协同抗肿瘤效应的机制尚不明确。本研究拟探讨TGT联合DOX对TNBC荷瘤小鼠肿瘤生长的抑制作用及其对巨噬细胞极化的调节效应，并通过转录组测序技术，进一步揭示TGT与DOX协同治疗TNBC的分子机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

小鼠4T1乳腺癌细胞株购自中国上海科学院细胞库。

SPF级雌性BALB/c小鼠，体质量16~19g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司，生产许可证编号SCXK（鄂）2022-0030。动物实验经河南中医药大学第一附属医院实验动物伦理审查批准（批准号YFYDW2023022）。

1.2 药品与试剂

通关藤注射液（国药准字Z20025868，批号202206211）购自南京圣和药业股份有限公司；盐酸多柔比星（200mg/支，批号T1020）、B细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2, Bcl-2）抗体（批号GR3325129-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein, Bax）抗体（批号GR3368232-18）；总RNA提取试剂盒（批号R1200）购自北京索莱宝科技有限公司；RNA快速逆转录试剂（批号140735）购自莫纳生物科技有限公司；通用型高灵敏qPCR预混液（批号YQ51003）购自雅礼生物科技有限公司；小鼠IL-1 β 试剂盒（批号E-EL-M0037）、小鼠TNF- α 试剂盒（批号E-EL-M3063）、小鼠IL-4试剂盒（批号E-EL-M0043）、小鼠IL-10试剂盒（批号E-EL-M0046）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；Janus激酶2（Janus kinase 2, JAK2）抗体（批号HY-P80421）、信号转导和转录激活蛋白3（signal transducer and activator of transcription 3, STAT3）抗体（批号80149-1-RR）、p-JAK2抗体（批号HY-

P80829)、p-STAT3 抗体(批号 1064571)购自上海皓元生物医药科技有限公司;剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cystein-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体(批号 25128-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; CD86 抗体(批号 AC25061255)、CD206 抗体(批号 AC25030782)、F4/80 抗体(批号 AC25052366)、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(批号 20000730)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 仪器

NikonEclipseC1 型 Ti2-U 型荧光倒置显微镜(日本 Nikon 公司); XS105 型十万分之一电子天平(梅特勒托利多科技有限公司); NanoDrop One 型超微量分光光度计、Multiskan FC 型微孔板光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); cobas z 480 型实时荧光定量 PCR 仪(英潍捷基上海贸易有限公司); BD FACSCelesta 型多色流式细胞分析仪(美国 BD 生物科学公司); Agilent 5300 型片段分析仪(美国 Agilent Technologies 公司); BC-2800vet 型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)。

2 方法

2.1 体内药效学评价

2.1.1 4T1 荷瘤小鼠模型的构建、分组与给药 将密度为 3×10^6 个/mL 的 4T1 细胞,按 100 mL/只 sc 接种于小鼠的右侧腋窝下部,肿瘤体积达到 100 mm³ 时,视为造模成功。将造模成功后的荷瘤小鼠随机分为模型组、TGT 组、DOX 组和 TGT 联合 DOX 给药组。TGT 组的给药剂量为 40 mg/kg,每日 ip 给药 1 次;DOX 组的给药剂量为 4 mg/kg,每 3 天 ip 给药 1 次。每 3 天测量肿瘤直径,按肿瘤体积 = $ab^2/2$ 计算肿瘤体积(a 为最长直径, b 为最短直径)。第 10 天处死小鼠,摘眼球取血获得血清,取出肿瘤并进行称定质量,计算抑瘤率。

2.1.2 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色 观察小鼠肿瘤组织病理形态学变化 各组小鼠肿瘤组织包埋后切成连续石蜡切片,经脱蜡透明液、乙醇脱蜡至水,苏木素染色,冲洗后分化、返蓝并再次冲洗。乙醇脱水后伊红染色,依次经无水乙醇脱水、环保型脱蜡透明液透明,最后封片,光学显微镜下观察肿瘤组织病理变化。

2.1.3 TUNEL 染色检测肿瘤细胞凋亡 肿瘤切片固定后,使用蛋白酶 K 修复,PBS 洗涤去除残留试剂。滴加 buffer 常温孵育,配制 TUNEL 试剂覆盖

组织并于湿盒中 37 °C 孵育标记凋亡。滴加 DAPI 染液避光孵育染色细胞核,封片后荧光显微镜观察,TUNEL 阳性细胞呈红色,通过计算阳性细胞比例(凋亡率)评估各组凋亡情况。

2.1.4 免疫组化法检测肿瘤组织中 cleaved Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达 肿瘤组织固定包埋切片后,脱蜡脱水、蒸馏水冲洗。抗原修复冷却后 PBS 洗涤,双氧水避光孵育、牛血清白蛋白封闭。滴加一抗 4 °C 孵育过夜,PBS 洗涤后加 HRP 二抗室温孵育,PBS 洗涤后,DAB 显色、自来水终止,苏木素复染后分化、返蓝、冲洗,脱水透明封片,于显微镜下观察并拍照,阳性表达为棕黄色。

2.2 免疫功能评估

2.2.1 免疫器官指数测定 取小鼠的胸腺、脾脏称定质量,计算胸腺指数与脾脏指数。

$$\text{脏器指数} = \text{脏器湿质量} \times 10 / \text{体质量}$$

2.2.2 血常规分析 小鼠摘眼球采血,收集于预先加入抗凝剂的 1.5 mL 离心管中。取样后轻轻颠倒混匀,确保血液与抗凝剂充分混合。使用全自动血液细胞分析仪进行血常规检测。

2.3 ELISA 检测肿瘤组织中炎症因子水平

取各组小鼠肿瘤组织,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-4 及 IL-10 水平。

2.4 免疫荧光染色法检测肿瘤组织中巨噬细胞极化状态

CD86 是 M1 型巨噬细胞特异性标志物,CD206 为 M2 型巨噬细胞特征性标志物,二者常联合巨噬细胞通用标志物 F4/80 用于亚型鉴定与定位^[9]。为观察不同亚型巨噬细胞在肿瘤组织中的分布情况,采用 CD86 与 F4/80 联合标记 M1 型巨噬细胞,CD206 与 F4/80 联合标记 M2 型巨噬细胞进行免疫荧光染色。肿瘤组织石蜡切片脱蜡脱水、蒸馏水洗净,进行抗原修复,冷却后 PBS 洗涤。组化笔画圈,滴加封闭液封闭,随后滴加一抗于湿盒中 4 °C 孵育过夜。PBS 洗涤,滴加二抗室温避光孵育,PBS 洗涤后,滴加 DAPI 染液避光孵育复染细胞核。经自发荧光淬灭剂处理、流水冲洗后,抗荧光淬灭封片剂封片并采集图像。CD86 及 CD206 阳性区域呈红色,F4/80 阳性区域呈绿色。

2.5 qRT-PCR 检测肿瘤组织中炎症因子和极化标志物的 mRNA 表达

取肿瘤组织,提取组织中的总 RNA,检测浓度和纯度合格后,进行逆转录合成 cDNA,根据试剂

盒说明进行 PCR 扩增。通过 Roche cobas z 480 PCR 系统,使用 SYBR Mix 进行 qRT-PCR,以 β -actin 为

内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各目的基因的表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
<i>CD86</i>	GGTGGCCTTTTGGACTCTC	TGAGGTAGAGGTAGGAGGATCTT
<i>CD206</i>	CTCTGTTAGCTATTGGACGC	CGGAATTTCTGGGATTGAGCTTC
<i>Arg-1</i>	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC
<i>TNF-α</i>	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
<i>IL-1β</i>	GAAATGCCACCTTTTGGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>iNOS</i>	GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA	GTGGACGGGTCGATGTCAC
<i>IL-4</i>	CCCCAGCTAGTTGTCATCCTG	CAAGTGATTTTTGTGCGCATCCG
<i>IL-10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
<i>ACTB</i>	CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC	ATGGAGCCACCGATCCACA
<i>Lag-3</i>	CTGGGACTGCTTTGGGAAG	GGTTGATGTTGCCAGATAACCC
<i>PD-1</i>	ACCCTGGTCATTCACTTGGG	CATTTGCTCCCTCTGACACTG
<i>Tim-3</i>	TCAGGTCTTACCCTCAACTGTG	GGCATTCTTACCAACCTCAAACA
<i>IFN-γ</i>	GCCACGGCACAGTCATTGA	TGCTGATGGCCTGATTGTCTT
<i>perforin</i>	AGCACAAGTTCGTGCCAGG	GCGTCTCTCATTAGGGAGTTTTT
<i>granzyme B</i>	CCACTCTCGACCTACATGG	GGCCCCAAAGTGACATTTATT

Arg-1-精氨酸酶-1; *iNOS*-诱导型一氧化氮合酶; *Lag-3*-淋巴细胞活化基因-3; *PD-1*-程序性死亡受体-1; *Tim-3*-T 细胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3; *IFN- γ* 干扰素; *perforin*-穿孔素; *granzyme B*-颗粒酶 B。

Arg-1-arginase-1; *iNOS*-inducible nitric oxide synthase; *Lag-3*-lymphocyte activation gene-3; *PD-1*-programmed cell death protein-1; *Tim-3*-T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein-3; *IFN- γ* -interferon- γ ; *Perforin*; *Granzyme B*。

2.6 流式细胞术检测 CD4⁺ T、CD8⁺ T 细胞比例

准备 200 目细胞筛网,用 PBS 润湿后置于 6 cm 细胞培养皿中浸泡备用。将剥离的肿瘤组织转移至 200 目细胞筛网,用无菌眼科剪剪成小颗粒。使用 2.5 mL 注射器活塞以软头打圈方式研磨组织,直至筛网上无明显组织块。用 PBS 冲洗筛网 2~3 次。将细胞悬液用 200 目细胞筛网滤过后收集细胞悬液,300 \times g 离心 5 min,弃上清。用细胞染色缓冲液重悬细胞,调整细胞浓度至 1 \times 10⁷个/mL。加入 CD3、CD4、CD8 荧光标记抗体,混匀后 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。加入细胞染色缓冲液重悬细胞,300 \times g 离心 5 min,弃上清。加入 200 μ L 细胞染色缓冲液重悬细胞后,采用流式分析仪检测,使用 FlowJo 10.8.1 软件进行量化分析。

2.7 qRT-PCR 检测 T 细胞功能相关基因表达

按“2.5”项下方法提取肿瘤组织 RNA,进行 qRT-PCR 分析,检测 T 细胞耗竭及毒性因子相关基因表达,阐明 TGT 对 T 细胞功能调控的分子机制。

2.8 免疫组化法检测肿瘤组织中 CD4 和 CD8 蛋白表达

按“2.1.4”项下方法处理石蜡切片,孵育 CD4 和 CD8 抗体,于显微镜下进行观察并使用 Image J 软件进行量化。

2.9 转录组学分析

随机选择模型组、TGT 组及 TGT 联合 DOX 治疗组小鼠各 6 只,使用 TRIzol 试剂从肿瘤组织样本中提取总 RNA,经超微量分光光度计检测浓度纯度、琼脂糖凝胶电泳验证完整性、片段分析仪测定 RNA 质量数值 (RNA quality number, RQN),确保单次建库 RNA 总量 \geq 1 μ g。mRNA + lncRNA + circRNA 用 Illumina[®] Stranded Total RNA Prep 试剂盒构建链特异性文库,包括去 rRNA、反转录、连接 adapter 等步骤,smallRNA 用 QIAseq miRNA Library Kit 等构建文库;文库经 Qubit 4.0 定量后,于 Illumina NovaSeq X Plus 平台测序;原始数据经 fastp 等工具过滤,mRNA + lncRNA + circRNA 去除接头、低质量等序列,smallRNA 筛选 18-32nt 序列,获得高质量 clean data,过滤工具采用 fastp 及美吉自主开发软件。转录组测序委托上海美卓美吉生物医药技术有限公司进行。

2.10 Spearman 相关性分析

以巨噬细胞 M1/M2 极化比值和免疫组化染色量化的 CD8⁺ T 细胞浸润阳性信号为免疫表型指标,结合转录组测序结果,筛选 P 值排序前 20 的差异基因作为关键基因,采用 Spearman 相关性分析,评估上述关键差异基因的表达水平与 CD8⁺ T 细胞浸

润程度的关联强度。

2.11 免疫组化法检测肿瘤组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 的表达

按“2.1.4”项下方法处理石蜡切片, 孵育 JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 抗体, 于显微镜下进行观察并使用 Image J 软件进行量化。

2.12 统计学分析

应用 GraphPad Prism 8.4.2 软件进行统计分析 与作图, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本均数比较采用 *t* 检验, 多组样本间差异采用单因素方差分析。

3 结果

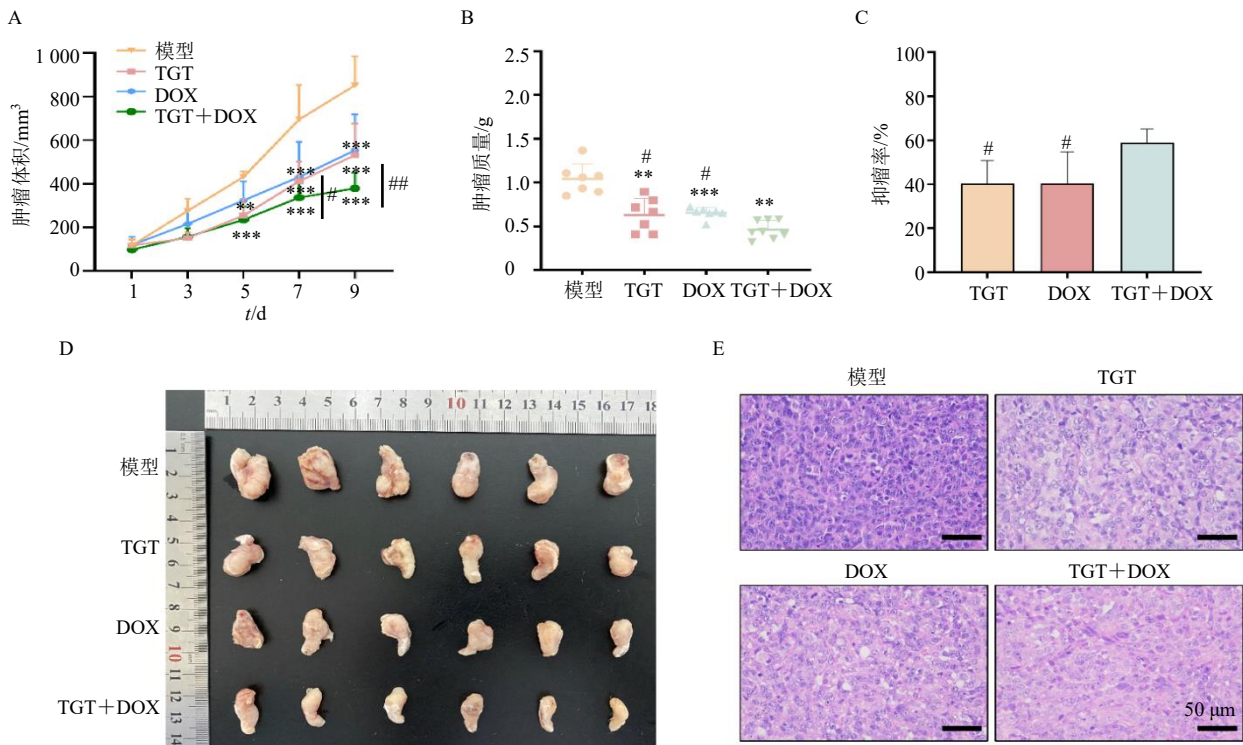
3.1 TGT 联合 DOX 协同抑制肿瘤生长

为探究 TGT 联合 DOX 体内抗 TNBC 疗效, 建立 4T1 荷瘤小鼠模型, 给药进行干预。如图 1-A~D 所示, 与模型组比较, TGT 组和 DOX 组均显著抑制肿瘤体积增长 ($P < 0.01$ 、 0.001)。与单独给药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组肿瘤体积和质量显

著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显示出更好的抑瘤效果。HE 染色结果 (图 1-E) 显示, 模型组肿瘤细胞分布密集、核深染; TGT 组和 DOX 组均可见细胞密度降低、核收缩及胞质比例增加; 联合治疗组肿瘤细胞密度最低, 组织坏死程度最明显。以上结果表明, TGT 与 DOX 联合应用具有协同抗肿瘤作用, 可显著抑制 TNBC 的生长。

3.2 TGT 联合 DOX 协同促进肿瘤细胞凋亡

为研究 TGT 联合 DOX 对 TNBC 小鼠肿瘤细胞凋亡的影响, 采用 TUNEL 染色和免疫组化染色进行分析。TUNEL 染色结果 (图 2-A) 显示, 与模型组比较, TGT 组和 DOX 组凋亡阳性细胞比例显著升高 ($P < 0.001$); 与单独给药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组凋亡阳性细胞比例显著升高 ($P < 0.001$)。免疫组化结果 (图 2-B) 表明, 与模型组比较, TGT 组和 DOX 组 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著增加 ($P < 0.001$), Bax/Bcl-2 值显著升高 ($P <$

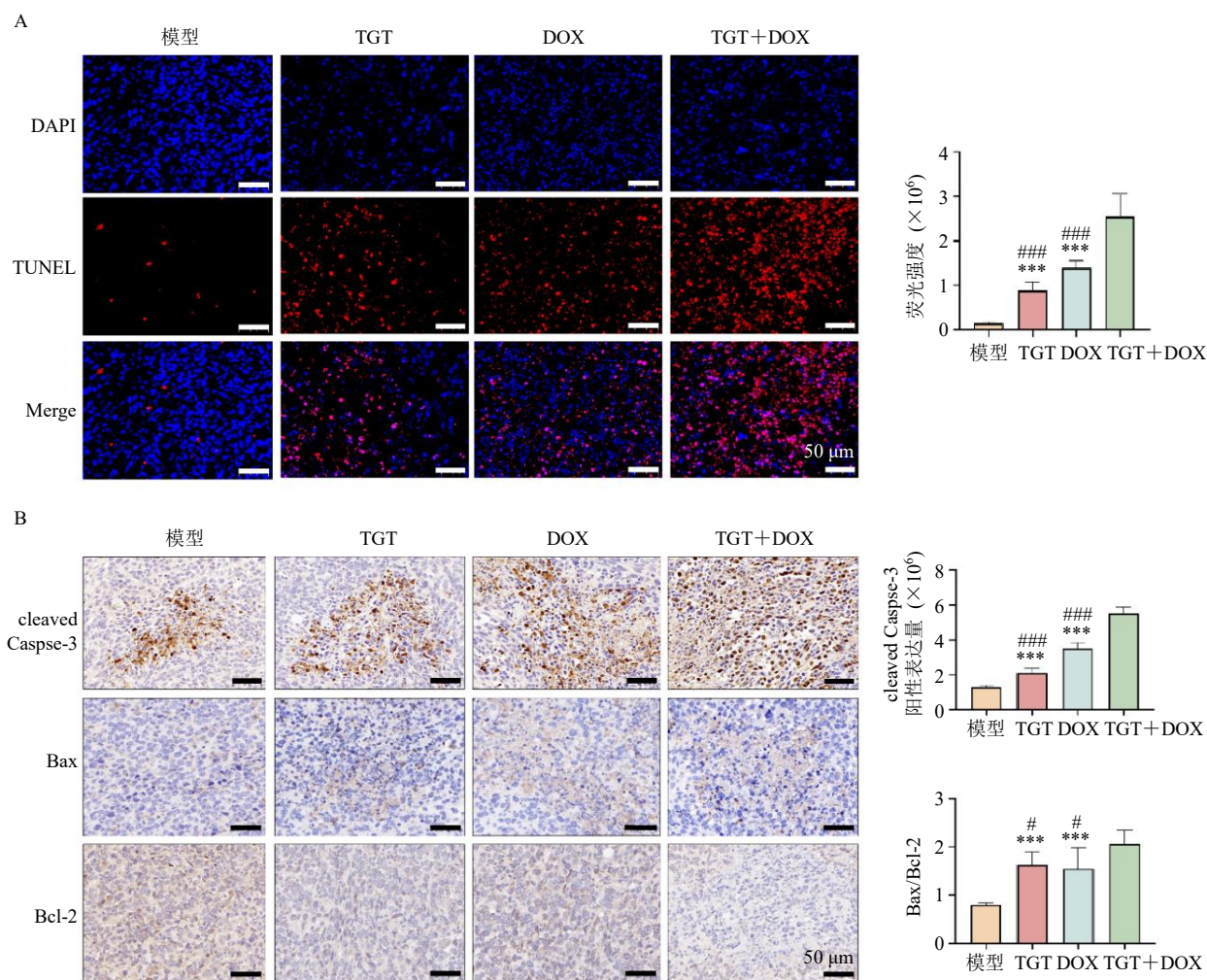


A-各组小鼠的肿瘤生长曲线; B-各组的肿瘤质量; C-各给药组的抑瘤率; D-各组肿瘤的代表性图像; E-肿瘤组织的病理学染色 (HE, $\times 200$); 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 TGT 联合 DOX 治疗组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下同。

A-tumor growth curves of mice in each group; B-tumor weight of each group; C-tumor inhibition rate of each treatment group; D-representative images of tumors in each group; E-pathological staining of tumor tissue (HE, $\times 200$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs TGT + DOX group, same as below figures.

图 1 TGT 联合 DOX 协同抑制 4T1 荷瘤小鼠的肿瘤生长 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 TGT combined with DOX synergistically inhibits tumor growth in 4T1-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡 ($\times 200$); B-免疫组化染色检测肿瘤组织 cleaved Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达 ($\times 200$)。

A-cell apoptosis in tumor tissue detected by TUNEL staining ($\times 200$); B-expressions of cleaved Caspase-3, Bcl-2 and Bax in tumor tissue detected by immunohistochemistry staining ($\times 200$).

图2 TGT 协同 DOX 促进肿瘤细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 TGT synergizes with DOX to promote tumor cell apoptosis ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

0.001); TGT 联合 DOX 治疗组 cleaved Caspase-3 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 值显著高于单独给药组 ($P < 0.05, 0.001$)。表明 TGT 协同 DOX 可显著增强 TNBC 小鼠肿瘤细胞的凋亡。

3.3 TGT 联合 DOX 协同改善机体免疫功能

为探究 TGT 联合 DOX 对 TNBC 小鼠免疫功能的影响, 检测免疫器官指数及血常规指标。如图 3-A 所示, 与模型组比较, DOX 单独给药组小鼠脾脏指数显著降低 ($P < 0.001$); TGT 联合 DOX 治疗组较 DOX 组的作用更为显著 ($P < 0.05$), 表明 TGT 协同 DOX 可显著缓解 TNBC 引起的脾脏肿大, 降低脾脏指数。由于 DOX 可诱导胸腺萎缩, 与模型组相比, DOX 单独给药组小鼠的胸腺指数显著降低

($P < 0.001$); TGT 联合 DOX 给药能显著提高胸腺指数 ($P < 0.05$), 表明 TGT 与 DOX 联合用药可有效缓解 DOX 引起的胸腺损伤。血常规检测结果 (图 3-B) 显示, TGT 联合 DOX 治疗组的红细胞计数较 DOX 单独给药组显著增加 ($P < 0.01$), TGT 联合 DOX 组血小板计数较单独给药组显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。表明 TGT 协同 DOX 可在一定程度上增强小鼠免疫能力。

3.4 TGT 联合 DOX 促进促炎因子表达并抑制抗炎因子表达

为探究 TGT 联合 DOX 对炎症因子的调控作用, 采用 qRT-PCR 和 ELISA 检测肿瘤组织中炎症因子的表达。qRT-PCR 结果 (图 4-A) 显示, 与模

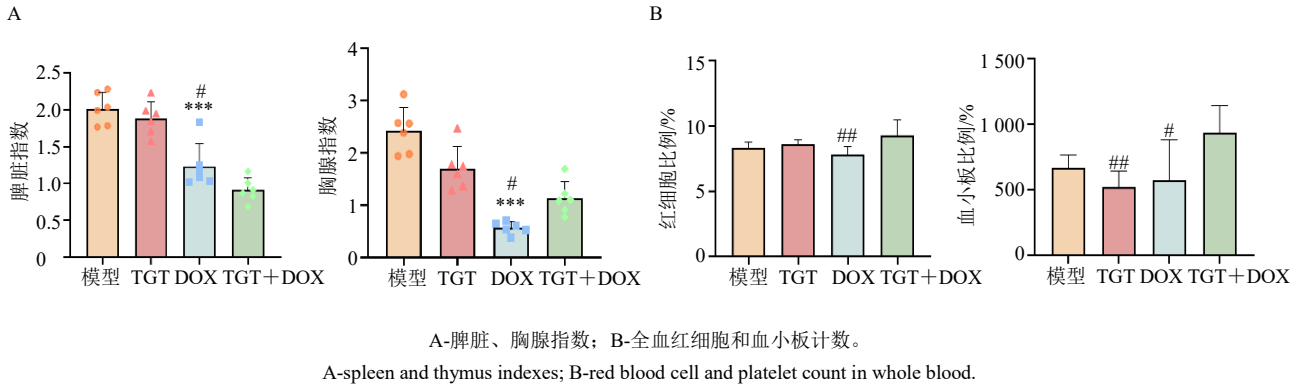


图3 TGT 协同 DOX 缓解免疫器官的损伤与造血功能抑制 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 TGT synergizes with DOX to alleviate damage to immune organs and inhibition of hematopoietic function ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

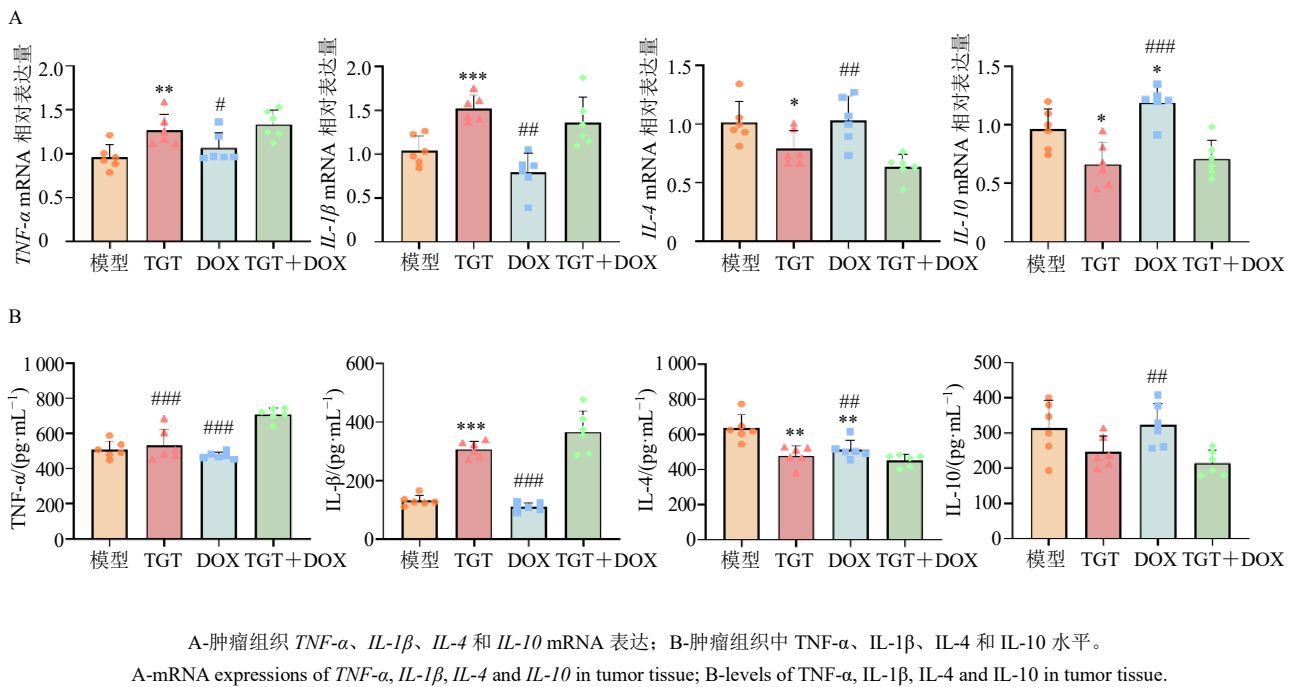


图4 TGT 协同 DOX 对炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

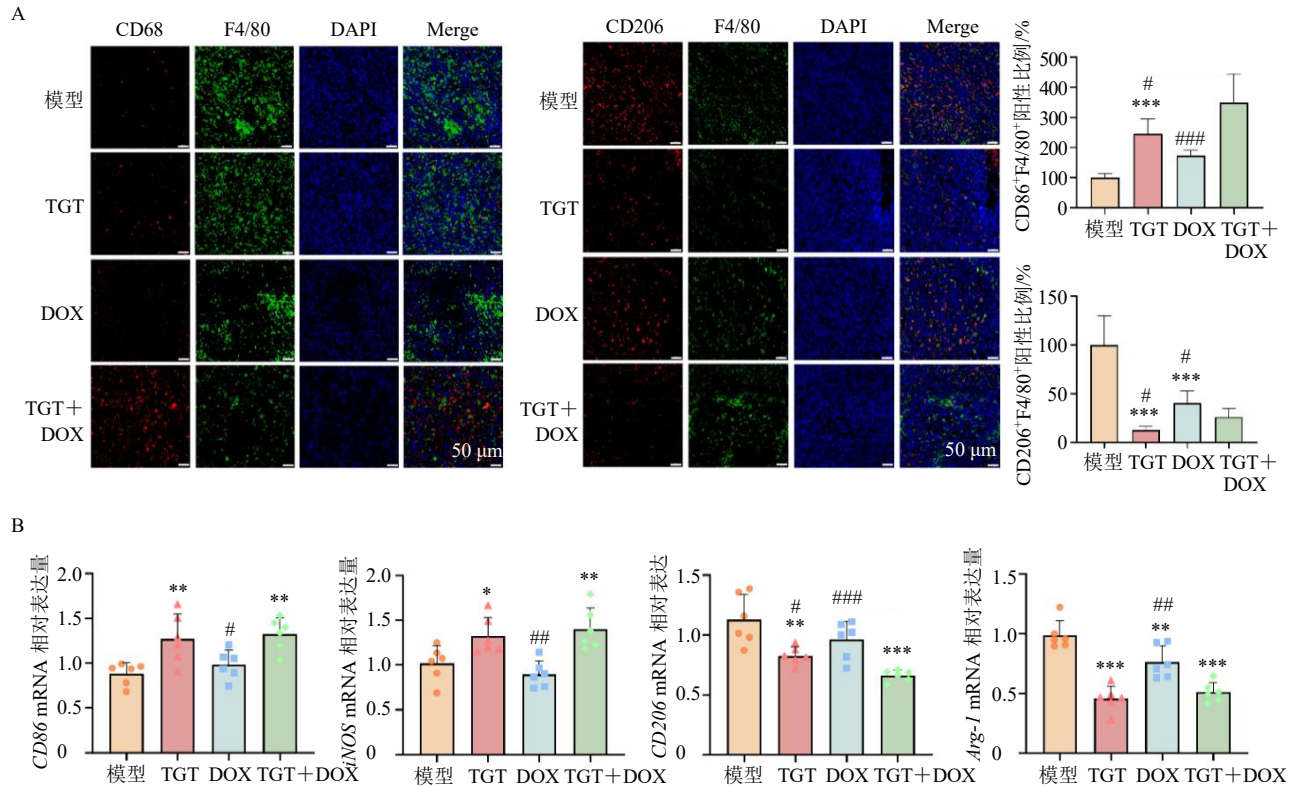
Fig. 4 Effects of TGT combined with DOX on inflammatory factor levels ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

型组比较, TGT 组显著上调促炎因子 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 显著下调 $IL-4$ 和 $IL-10$ 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$)。与 DOX 单独用药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组显著上调 $IL-1\beta$ 和 $TNF-\alpha$ 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并显著下调 $IL-4$ 和 $IL-10$ 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。ELISA 结果 (图 4-B) 显示, 与模型组比较, TGT 单独给药组显著上调促炎因子 $IL-1\beta$ 水平 ($P < 0.001$), 显著下调 $IL-4$ 水平 ($P < 0.01$); TGT 协同 DOX 治疗后, $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 水平进一步显著上调 ($P < 0.001$), 而 $IL-4$ 和 $IL-10$ 水平显著下调 ($P < 0.01$)。以上结果表明, TGT 与 DOX

联合用药促进肿瘤细胞中促炎因子的表达水平, 抑制抗炎因子的表达水平。

3.5 TGT 联合 DOX 促进巨噬细胞由 M2 向 M1 表型极化

对巨噬细胞极化标志指标 CD206、CD86 与 F4/80 进行荧光合染的结果显示 (图 5-A), 与模型组比较, TGT 组 CD86 阳性比例显著升高 ($P < 0.001$), TGT 组和 DOX 组 CD206 阳性比例显著降低 ($P < 0.001$); 与 TGT 和 DOX 单独给药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组 CD86 阳性比例进一步显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001), CD206 阳性比例显著降低 ($P < 0.05$)。qRT-PCR 结果 (图 5-B) 显示, 与模型



A-免疫荧光染色检测肿瘤组织 CD86 和 CD206 表达 (×200); B-肿瘤组织 CD86、iNOS、CD206 和 Arg-1 mRNA 表达。

A-expressions of CD86 and CD206 in tumor tissue detected by immunofluorescence staining (× 200); B-mRNA expressions of CD86, iNOS, CD206 and Arg-1 in tumor tissue.

图 5 TGT 协同 DOX 促进巨噬细胞由 M2 向 M1 表型极化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 TGT synergizes with DOX to promote macrophage polarization from M2 to M1 phenotype ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组比较, TGT 组显著上调 CD86 和 iNOS 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 显著下调 CD206 和 Arg-1 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01, 0.001$); 与 DOX 组相比, TGT 联合 DOX 治疗组 CD86、iNOS 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), CD206、Arg-1 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。上述结果表明, TGT 协同 DOX 促进巨噬细胞由 M2 表型向 M1 表型极化, 重塑巨噬细胞表型。

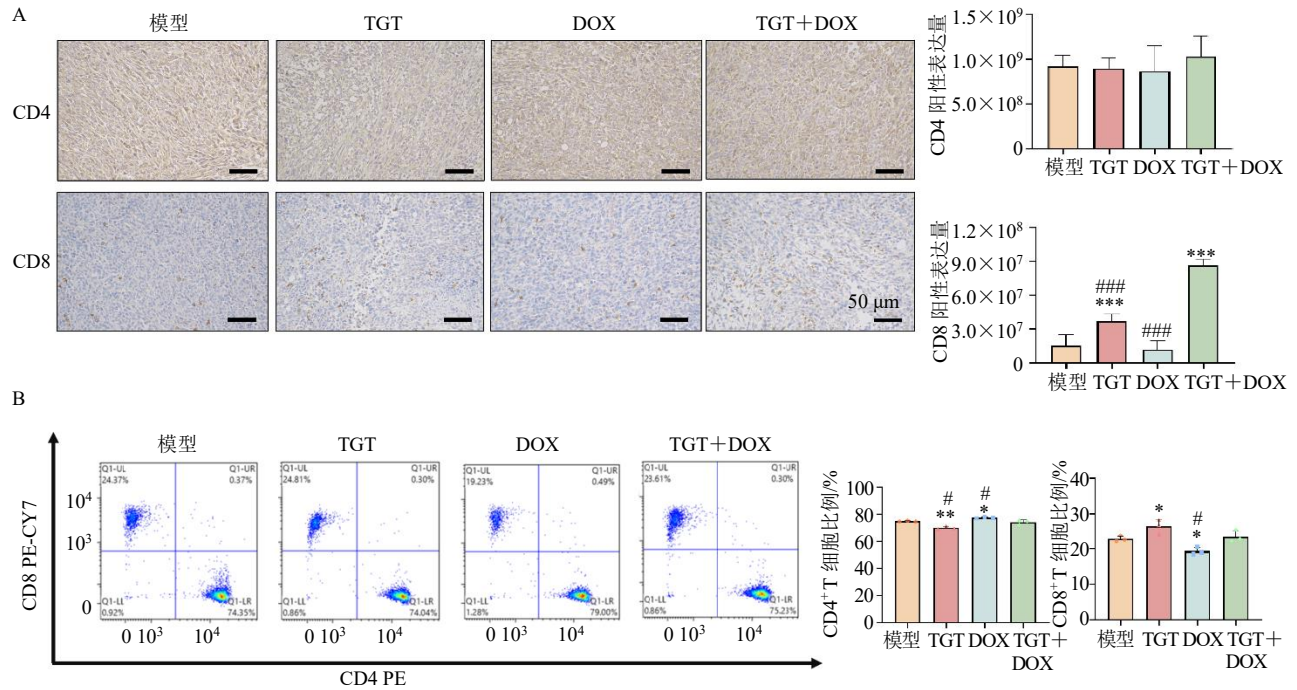
3.6 TGT 联合 DOX 促进肿瘤组织中 CD8⁺T 细胞的浸润

为探究 TGT 联合 DOX 对 TNBC 荷瘤小鼠中 T 细胞浸润的影响, 通过免疫组织化学染色和流式细胞术进行分析。免疫组化结果 (图 6-A) 显示, 与模型组比较, TGT 组和 DOX 组 CD4⁺T 细胞染色阳性区域强度无显著差异, 而 TGT 组 CD8⁺T 细胞阳性染色区域显著增加 ($P < 0.001$); TGT 联合 DOX 治疗组 CD8 蛋白的表达水平显著高于 DOX 单独给药组 ($P < 0.001$)。流式细胞术结果 (图 6-B) 进一

步表明, 与模型组比较, TGT 组 CD8⁺T 细胞比例升高 ($P < 0.05$), DOX 组 CD8⁺T 细胞比例显著降低 ($P < 0.05$), TGT 联合 DOX 治疗组的 CD8⁺T 细胞比例显著高于 DOX 单独给药组 ($P < 0.05$)。CD4⁺T 细胞比例呈现相反的趋势, TGT 组 CD4⁺T 细胞比例降低 ($P < 0.01$), DOX 组 CD4⁺T 细胞比例升高 ($P < 0.05$), TGT 联合 DOX 治疗组的 CD4⁺T 细胞比例显著低于 DOX 单独给药组 ($P < 0.05$)。以上结果表明, TGT 可协同 DOX 显著下调 CD4⁺T 细胞比例、升高 CD8⁺细胞毒性 T 细胞比例, 增强抗肿瘤免疫应答, 从而发挥协同增效的免疫调节作用。

3.7 TGT 联合 DOX 减少 T 细胞耗竭并增强毒性因子表达

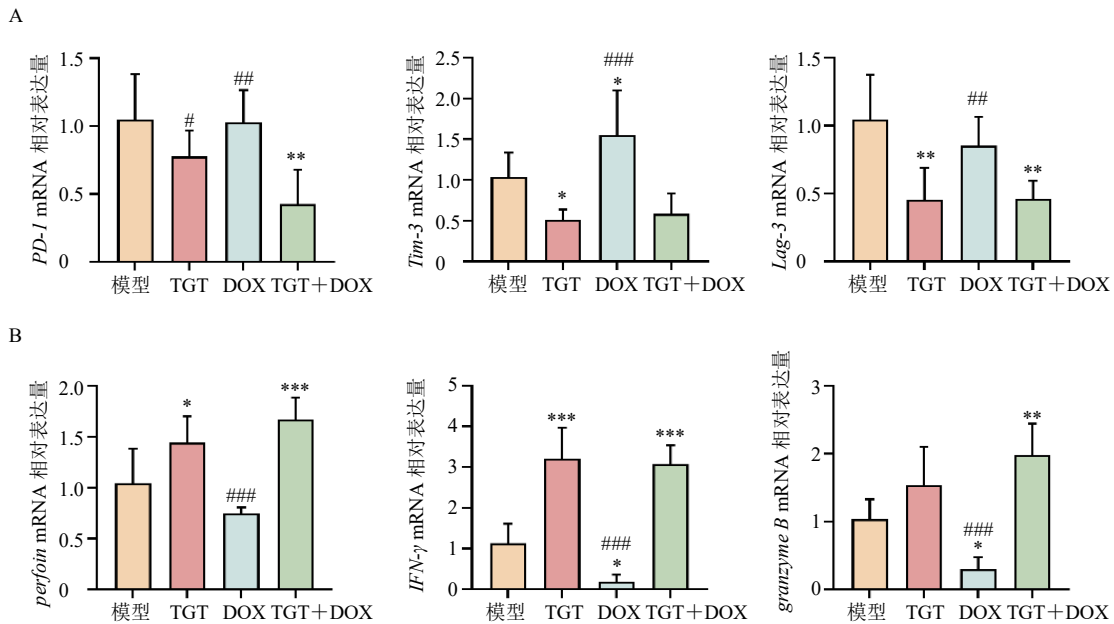
采用 qRT-PCR 检测肿瘤组织中 T 细胞耗竭相关基因 PD-1、Tim-3、Lag-3 及细胞毒性因子 perforin、IFN- γ 、granzyme B 的 mRNA 表达, 以评估 TGT 联合 DOX 对 T 细胞功能的影响。如图 7-A 所示, 在 T 细胞耗竭方面, 与模型组比较, TGT 单



A-免疫组化染色检测肿瘤组织中 CD4 和 CD8 表达 (×200); B-流式细胞术检测肿瘤组织中 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞比例。
A-expressions of CD4 and CD8 in tumor tissue detected by immunohistochemical staining (× 200); B-proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in tumor tissues detected by flow cytometry.

图 6 TGT 联合 DOX 对 4T1 荷瘤小鼠肿瘤组织中 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的调控作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Regulatory effects of TGT combined with DOX on CD4⁺ and CD8⁺ T cells in tumor tissues of 4T1-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-肿瘤组织 PD-1、Tim-3 和 Lag-3 mRNA 表达; B-肿瘤组织 perforin、IFN-γ 和 granzyme B mRNA 表达。
A-expressions of PD-1, Tim-3 and Lag-3 mRNA in tumor tissue; B-expressions of perforin, IFN-γ and granzyme B mRNA in tumor tissue.

图 7 TGT 协同 DOX 缓解 T 细胞耗竭并增强 T 细胞毒性因子表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 TGT synergistically alleviates T cell exhaustion and enhances cytotoxic cytokine expressions in conjunction with DOX ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

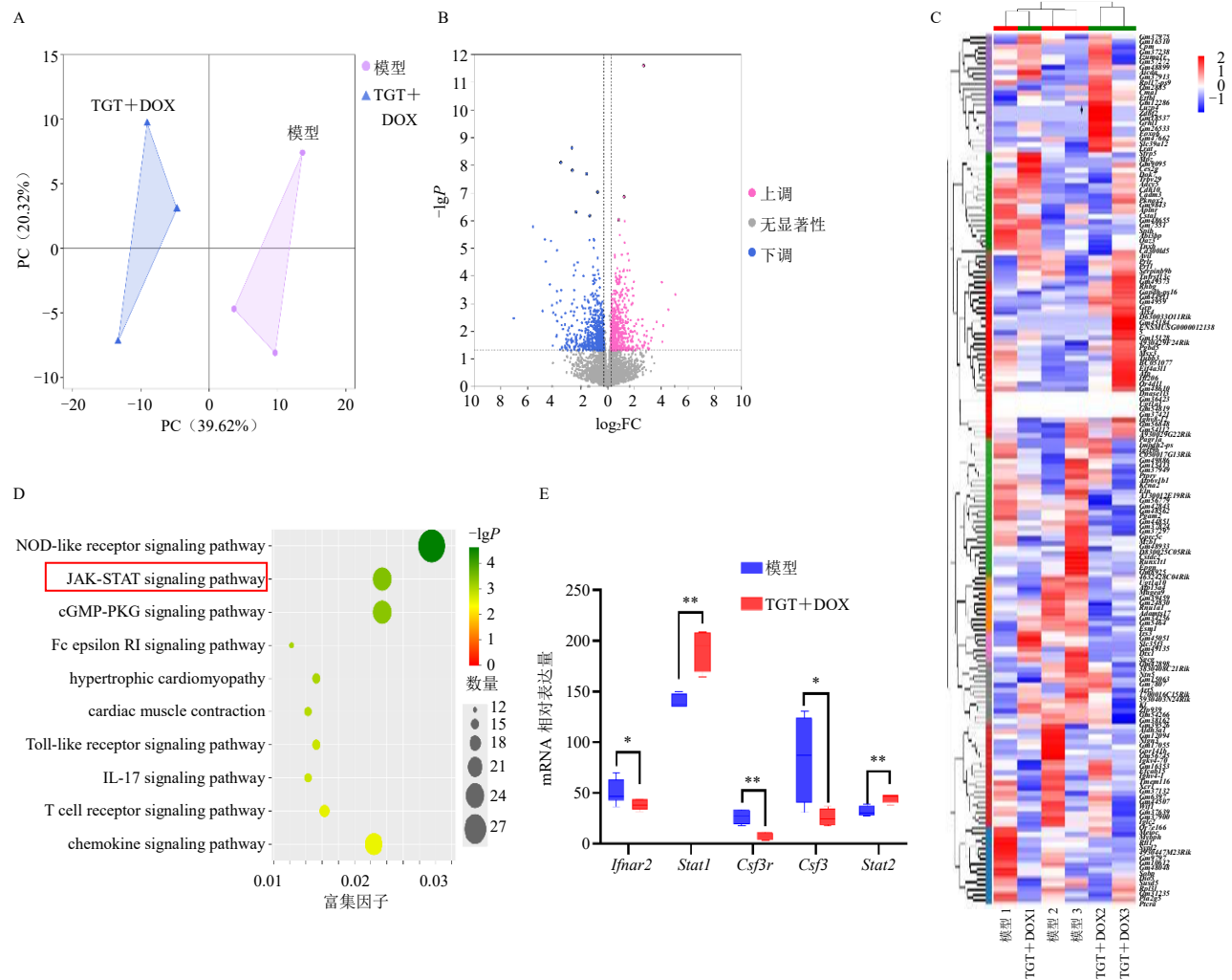
独给药组显著下调 *Tim-3* 和 *Lag-3* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.01$), DOX 单独给药组则显著上调 *Tim-3* 的表达 ($P < 0.05$); 与 DOX 单独给药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组中 *PD-1*、*Tim-3* 和 *Lag-3* 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01, 0.001$); 与 TGT 单独给药组相比, 联合组 *PD-1* 表达也显著下调 ($P < 0.05$)。在细胞毒性因子方面 (图 7-B), 与模型组比较, TGT 单独给药组显著上调 *perforin* 和 *IFN- γ* 的 mRNA 表达 ($P < 0.05, 0.001$), DOX 单独给药组显著下调 *IFN- γ* 和 *granzyme B* 的表达 ($P < 0.05$); 与 DOX 单独给药组相比, TGT 联合 DOX 治疗组 *perforin*、*IFN- γ* 和 *granzyme B* 的 mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.001$)。以上结果表明, TGT 联合 DOX 可有效缓解 TNBC 小鼠肿瘤浸润 T 细胞

的耗竭状态,同时增强 T 细胞毒性因子的转录表达,从而协同提升抗肿瘤免疫应答。

3.8 转录组结果

3.8.1 主成分分析 (principal component analysis, PCA) 对标准化后的转录组数据进行 PCA, 结果如图 8-A 所示, PC1 的贡献率为 39.26%, PC2 的贡献率为 20.32%, 表明该 PCA 模型拟合性较好。样本全部置于 95% 置信区间内, 因此, 模型组与 TGT 联合 DOX 治疗组数据处理结果可信, 能从总体上反映出模型组与 TGT 联合 DOX 治疗组之间的基因差异。

3.8.2 差异基因聚类与京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析 为分析各组样本的基因表达分布趋势,



A-PCA 图; B-火山图; C-热图; D-KEGG 通路富集气泡图; E-JAK-STAT 关键靶点箱线图。

A-PCA plots; B-volcano plots; C-heatmaps; D-KEGG pathway enrichment bubble plots; E-JAK-STAT key target box plot.

图 8 TGT 联合 DOX 通过调控 JAK-STAT 信号通路促进巨噬细胞从 M2 向 M1 表型极化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 TGT combined with DOX promotes macrophage polarization from M2 to M1 phenotype by regulating JAK-STAT signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

进一步进行差异基因分析(图 8-B)。结果显示, TGT 联合 DOX 治疗组有 622 个基因上调和 691 个基因下调。通过聚类分析 TGT 联合 DOX 治疗组与模型组的差异表达基因(图 8-C), 热图中红色表示基因上调, 蓝色表示基因下调。结果显示, TGT 联合 DOX 治疗组与模型组的差异基因聚类清晰, 表达差异显著, 表明联合处理对基因表达的调控具有集中性和特异性。以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) $|\geq 1.5$ 为筛选条件确定的调控基因作为 TGT 联合 DOX 干预作用的关键差异基因。对差异基因进行 KEGG 通路富集分析, 结果如图 8-D 所示。气泡图中, 气泡大小表示通路中差异基因数量, 颜色深浅代表通路显著性。进一步针对 JAK-STAT 信号通路中与巨噬细胞极化相关的干扰素 α/β 受体 2 (interferon alpha/beta receptor 2, *Ifnar2*)、集落刺激因子 3 受体 (colony-stimulating factor 3 receptor, *Csf3r*) 和集落刺激因子 3 (colony-stimulating factor 3, *Csf3*) 等差异基因绘制箱线图(图 8-E)。结果显示, 通路中的 *Ifnar2*、*Csf3r* 及 *Csf3* 基因在联合治疗组中显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而 *Stat1* 与 *Stat2* 基因则显著上调 ($P < 0.01$)。上述结果表明, TGT 联合 DOX 能通过精准调控 JAK-STAT 信号通路中巨噬细胞极化相关核心分子的表达从而介导 TAM 的表型重塑。

3.8.3 Spearman 相关性分析差异基因对巨噬细胞极化与 CD8⁺ T 细胞浸润的调控 如表 2、3 所示, 在筛选的 20 个关键差异基因中, 9 个基因与巨噬细胞 M1/M2 极化比值存在显著 Spearman 相关性, 其中真核翻译起始因子 2B 亚基 3 (eukaryotic translation initiation factor 2B subunit 3, *Eif2b3*)、黏病毒抗性蛋白 (2myxovirus resistance 2, *Mx2*) 等基因与 M1/M2 比值呈正相关, *A430057M04Rik*、*Apo19a*、*Rnf149* 等基因与 M1/M2 比值呈负相关。同时, 12 个基因与 CD8⁺ T 细胞浸润水平存在显著 Spearman 相关性, 溶质载体家族 8 成员 (solute carrier family 8 member A1, *Slc8a1*)、*Mx2*、免疫球蛋白重常数 μ 区 (immunoglobulin heavy constant mu, *Ighm*) 等基因的表达水平与 CD8⁺ T 细胞浸润呈显著正相关, *Rnf149*、*Apo19a*、*A430057M04Rik* 等基因的表达水平与 CD8⁺ T 细胞浸润呈显著负相关。提示这些关键差异基因的表达变化, 可能同时参与调控巨噬细胞极化平衡与 CD8⁺ T 细胞在 TME 中的浸润程度。

表 2 差异表达基因与巨噬细胞 M1/M2 的相关性分析

Table 2 Correlation analysis of differentially expressed genes with macrophage M1/M2 polarization

序号	基因	相关系数	P值
1	<i>Myl9</i>	0.531 5	0.047 3
2	<i>Eif2b3</i>	0.650 3	0.035 2
3	<i>Slc8a1</i>	0.440 6	0.046 7
4	<i>Mx2</i>	0.650 3	0.047 1
5	<i>Ighm</i>	0.489 5	0.046 9
6	<i>A430057M04Rik</i>	-0.503 5	0.044 4
7	<i>Eomes</i>	0.636 4	0.048 7
8	<i>Apo19a</i>	-0.601 4	0.045 7
9	<i>Rnf149</i>	-0.629 4	0.042 8

表 3 差异表达基因与 CD8⁺ T 细胞浸润的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of differentially expressed genes and CD8⁺ T cell infiltration

序号	基因	相关系数	P值
1	<i>Rnf149</i>	-0.783 2	0.045 6
2	<i>Slc8a1</i>	0.776 2	0.025 8
3	<i>Apo19a</i>	-0.748 3	0.028 0
4	<i>Eif2b3</i>	0.741 3	0.023 4
5	<i>A430057M04Rik</i>	-0.692 3	0.037 2
6	<i>Btk</i>	-0.664 3	0.043 8
7	<i>Mx2</i>	0.657 3	0.040 8
8	<i>Cyp11a1</i>	0.643 4	0.041 7
9	<i>Rnf144a</i>	0.629 4	0.043 1
10	<i>Ighm</i>	0.622 4	0.041 6
11	<i>Brms1l</i>	-0.608 4	0.043 5
12	<i>Eomes</i>	0.587 4	0.048 9

3.8.4 免疫组化法检测肿瘤组织中 JAK2、p-JAK2、STAT3 及 p-STAT3 的表达 如图 9 所示, 与模型组比较, TGT 联合 DOX 治疗组 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 总 JAK2 和总 STAT3 蛋白表达水平无明显变化。表明 TGT 协同 DOX 通过抑制 JAK-STAT 通路中 JAK2 和 STAT3 的磷酸化过程, 下调 p-JAK2 和 p-STAT3 的表达, 抑制 JAK-STAT 信号通路的激活, 进而抑制 TNBC 的肿瘤生长。

4 讨论

DOX 作为蒽环类化疗药物, 是 TNBC 的一线治疗选择^[14]。然而, 其临床应用存在显著局限性, 约 60% 的患者会出现原发性或获得性耐药, 且具有剂量相关性心肌毒性^[15]。单用化疗药物治疗 TNBC 的疗效有限, 易诱发 TME 的免疫抑制, 从而削弱抗肿瘤效果并加速肿瘤进展^[16]。因此, 探索能够与化疗药物协同增效、减轻化疗药物不良反应的联合治疗方案, 成为突破 TNBC 化疗瓶颈的重要研究方向。本研究采用 TNBC 荷瘤小鼠模型发现 TGT 可

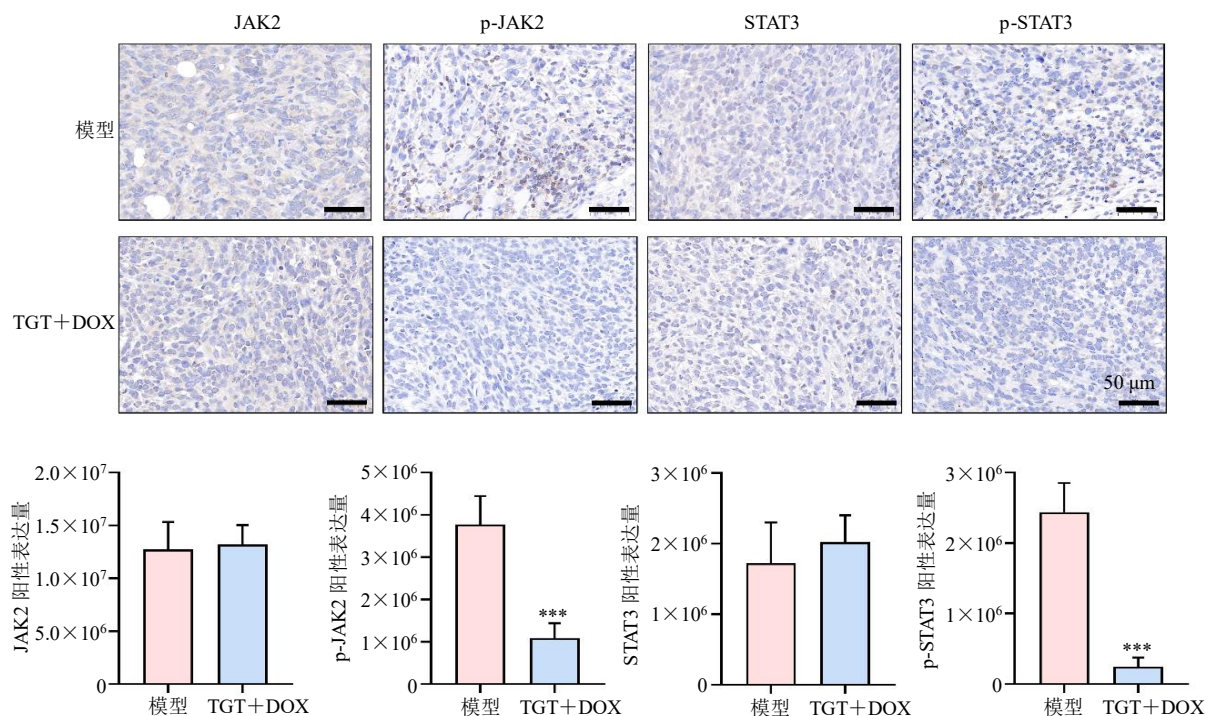


图9 TGT联合DOX协同抑制JAK-STAT信号通路(×200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 TGT combined with DOX inhibits JAK-STAT signaling pathway (×200; $\bar{x} \pm s, n = 3$)

以协同 DOX 通过调控 JAK-STAT 信号通路抑制 TNBC 荷瘤小鼠的肿瘤生长, 缓解 DOX 引发的免疫器官损伤, 促进巨噬细胞由 M2 型向 M1 型极化并上调 CD8⁺ T 细胞浸润比例、下调 CD4⁺ T 细胞比例增强抗肿瘤免疫应答。

DOX 治疗 TNBC 会诱导 TME 产生独特的免疫抑制效应, TME 作为复杂的细胞生态系统, 巨噬细胞是其中核心免疫细胞, 可极化为促炎抗肿瘤的 M1 型与抗炎促瘤的 M2 型, 二者与炎症反应相互作用共同塑造了 TME 的免疫抑制特性^[17]。多数肿瘤组织中 TAM 以 M2 表型为主, 可促进肿瘤生长、转移与复发并抑制 T 细胞功能, 而 M1 型巨噬细胞能释放 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 等促炎细胞因子发挥抗肿瘤活性。Wang 等^[18]证实 DOX 可诱导 TAM 向 M2 型促肿瘤表型极化, 使 TME 中 M2 型巨噬细胞比例显著上升; Pang 等^[19]也发现 DOX 会多重抑制 T 细胞功能, 使 CD8⁺ T 细胞衰竭标志物 PD-1、TIM-3 表达上调, 进而削弱抗肿瘤免疫应答。巨噬细胞极化状态受炎症信号调控, 持续的炎症会通过分泌 IL-10、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等免疫抑制性细胞因子驱动 TAM 向 M2 表型极化, M2 型巨噬细胞不仅丧失抗肿瘤活性, 还会促进肿瘤血管生成与侵袭, 进一步强化 TME 的

免疫抑制特征^[20]; 而促炎信号可诱导 TAM 向 M1 型转化, M1 型巨噬细胞通过分泌活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及 IL-1 β 、IL-2 等促炎因子激活抗肿瘤免疫^[21]。T 细胞作为抗肿瘤免疫核心效应细胞, 其功能状态高度依赖 TME 中炎症信号与巨噬细胞表型的调控^[22], M1 型巨噬细胞可通过抗原提呈与促炎因子分泌, 促进 CD8⁺ T 细胞增殖、增强其细胞毒性并抑制调节性 T 细胞的免疫抑制作用^[23], 而 M2 型巨噬细胞会导致 CD8⁺ T 细胞高表达 PD-1、TIM-3 等耗竭标志物, 同时升高调节性 T 细胞比例, 最终削弱 T 细胞抗肿瘤效应^[24]。

本研究发现, TGT 联合 DOX 干预 4T1 荷瘤小鼠可协同促进 TAM 向 M1 型极化、抑制其向 M2 型极化, 同时显著上调肿瘤组织中 CD8⁺ T 细胞浸润水平。进一步检测证实联合给药可显著下调 T 细胞耗竭标志物的 mRNA 表达水平, 上调细胞毒性因子的 mRNA 表达水平, 提示其不仅能提高 CD8⁺ T 细胞浸润数量, 还可改善 T 细胞耗竭状态, 增强细胞毒效应, 进而强化机体抗肿瘤免疫应答。

转录组分析显示, TGT 联合 DOX 治疗组与模型组存在显著基因表达差异, KEGG 富集分析表明差异基因显著富集于 JAK-STAT 信号通路, 其中

Ifnar2、Csf3r、Csf3 呈显著下调, Stat1、Stat2 显著上调。JAK-STAT 信号通路是 TNBC 发病机制的核心通路之一, 可促进肿瘤细胞增殖、侵袭并介导免疫逃逸, 其异常激活还会降低肿瘤对化疗药物的敏感性, 同时抑制 CD8⁺ T 细胞活性、促进 M2 型巨噬细胞极化, 削弱免疫治疗效果^[25-26]。该通路也是调控巨噬细胞极化的核心分子网络, 其中 STAT3 可诱导抗炎因子分泌、招募免疫抑制细胞, 造成肿瘤免疫抑制恶化。Manore 等^[27]研究表明 IL-6 介导的 JAK2-STAT3 轴可促进乳腺癌细胞恶性进展并抑制抗肿瘤免疫, 该轴组分 JAK2、STAT3 均为潜在治疗靶点。Jiang 等^[28]证实结直肠癌微环境中, TAM 的 PD-1 可通过激活 JAK2-STAT3 通路驱动 M2 型极化, 敲低 PD-1 可逆转该过程并恢复巨噬细胞抗肿瘤功能。进一步通过 Spearman 相关性分析发现, *Eomes*、*Btk*、*Mx2*、*Ighm*、*Rnf144a* 基因与巨噬细胞 M1/M2 极化及 CD8⁺ T 细胞浸润显著相关。其中 *Btk* 低表达可能促进巨噬细胞向 M1 型极化^[29], *Eomes* 可调控 CD8⁺ T 细胞分化与浸润, 还可能协同调控巨噬细胞极化平衡^[30], *Mx2* 可通过免疫信号通路促进巨噬细胞功能及 CD8⁺ T 细胞浸润^[31], *Ighm* 参与炎症微环境构建并协同调控巨噬细胞极化与 T 细胞浸润^[32], *Rnf144a* 高表达可能抑制 M1 型巨噬细胞极化及 CD8⁺ T 细胞浸润^[33], 提示 TGT 联合 DOX 可能通过调控上述关键基因发挥抗肿瘤免疫调控作用。免疫组化结果进一步证实, 联合给药可显著下调 JAK-STAT 信号通路中 p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达。

综上, 本研究明确 TGT 协同 DOX 可通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路, 促进 TAM 由 M2 型向 M1 型转化, 调控炎症因子表达, 同时促进 CD8⁺ T 细胞浸润、增强抗肿瘤免疫应答, 发挥协同抗 TNBC 的治疗效果。本研究丰富了 TNBC 联合治疗的作用机制研究, 但仍存在局限, 仅采用皮下移植瘤模型难以充分模拟 TNBC 的体内原位生长微环境, 上述问题仍需后续研究从更深层次进行系统探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张启越, 燕德悦, 陆潇曼, 等. 影像组学预测乳腺癌肿瘤浸润淋巴细胞的研究进展 [J]. 磁共振成像, 2025, 16(12): 205-211.
[2] 马琴, 王玉. 放射治疗联合免疫治疗在三阴性乳腺癌中的研究进展 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2025,

17(5): 136.
[3] 吴进敏, 戚宇航, 方静怡, 等. FTO 通过 Wnt/ β -catenin 信号通路调节三阴性乳腺癌对阿霉素的耐药性 [J]. 中国药理学通报, 2025, 41(12): 2334-2341.
[4] 陈欣, 郑琦, 席玉棚, 等. 从五脏气探讨调气解毒法联合免疫检查点抑制剂在晚期非小细胞肺癌中的应用 [J]. 中国医药导报, 2025, 22(12): 136-140.
[5] Zhou H R, Zhang M X, Cao H H, *et al.* Research progress on the synergistic anti-tumor effect of natural anti-tumor components of Chinese herbal medicine combined with chemotherapy drugs [J]. *Pharmaceuticals*, 2023, 16(12): 1734.
[6] 邹蔓姝, 雷昌, 黄丹, 等. 用于肿瘤治疗的智能调控/响应肿瘤微环境的纳米递药系统研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2024, 33(15): 1564-1570.
[7] Waibl Polania J, Hoyt-Miggelbrink A, Tomaszewski W H, *et al.* Antigen presentation by tumor-associated macrophages drives T cells from a progenitor exhaustion state to terminal exhaustion [J]. *Immunity*, 2025, 58(1): 232-246.
[8] Wang K C, Liu W, Xu Q F, *et al.* Tenacissoside G synergistically potentiates inhibitory effects of 5-fluorouracil to human colorectal cancer [J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153553.
[9] Ma X Z, Xiao L L, Liu L T, *et al.* CD36-mediated ferroptosis dampens intratumoral CD8⁺ T cell effector function and impairs their antitumor ability [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 1001-1012.
[10] 吴子薇, 李晓波, 麻文谦, 等. 通关藤注射液研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(4): 71-82.
[11] 盛佳钰, 张馨月, 李琼, 等. 基于肿瘤微环境中 TLR4/NF- κ B 通路的变化探讨乳腺癌术后对乳腺癌小鼠肺转移的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 2864-2867.
[12] 张葳, 陈君君, 杨姣, 等. 通关藤注射液通过调控 ATF3 表达对紫杉醇抗乳腺癌细胞的增效作用 [J]. 中成药, 2022, 44(6): 1774-1782.
[13] 张小帅, 杨柳青, 王晓艳, 等. 通关藤注射液逆转乳腺癌多柔比星耐药的作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(15): 5112-5124.
[14] Vyas D, Deshpande K, Chaturvedi L, *et al.* Rapid extensive recurrence of triple negative breast cancer: Are both therapy and cancer biology the culprit? [J]. *J Clin Med Res*, 2016, 8(2): 162-167.
[15] Wu H, Wei G L, Luo L X, *et al.* Ginsenoside Rg₃ nanoparticles with permeation enhancing based chitosan derivatives were encapsulated with doxorubicin by thermosensitive hydrogel and anti-cancer evaluation of

- peritumoral hydrogel injection combined with PD-L1 antibody [J]. *Biomater Res*, 2022, 26(1): 77.
- [16] Wu L Q, Ding W S, Wang X P, *et al.* Interference KRT17 reverses doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer cells by Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Genes Genomics*, 2023, 45(10): 1329-1338.
- [17] 牛涛, 周逢海. 炎症与肿瘤微环境 [J]. 中南大学学报: 医学版, 2023, 48(12): 1899-1913.
- [18] Wang S R, Wang Z Y, Li Z Y, *et al.* A catalytic immune activator based on magnetic nanoparticles to reprogram the immunoeology of breast cancer from “cold” to “hot” state [J]. *Adv Healthc Mater*, 2022, 11(21): 2201240.
- [19] Pang Y H, Shi R Z, Chan L J, *et al.* The combination of the HDAC1 inhibitor SAHA and doxorubicin has synergic efficacy in triple negative breast cancer *in vivo* [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 196: 106926.
- [20] Bai H T, Feng L, Schmid F. Macrophage-based cancer immunotherapy: Challenges and opportunities [J]. *Exp Cell Res*, 2024, 442(1): 114198.
- [21] McWhorter R, Bonavida B. The role of TAMs in the regulation of tumor cell resistance to chemotherapy [J]. *Crit Rev Oncog*, 2024, 29(4): 97-125.
- [22] Heintzman D R, Fisher E L, Rathmell J C. Microenvironmental influences on T cell immunity in cancer and inflammation [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(3): 316-326.
- [23] Miyazaki T, Suzuki G, Yamamura K I. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance [J]. *Int Immunol*, 1993, 5(9): 1023-1033.
- [24] Rawlings J S, Rosler K M, Harrison D A. The JAK/STAT signaling pathway [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(8): 1281-1283.
- [25] Xiong N T, Wu H M, Yu Z K. Advancements and challenges in triple-negative breast cancer: A comprehensive review of therapeutic and diagnostic strategies [J]. *Front Oncol*, 2024, 14: 1405491.
- [26] Jin W. Role of JAK/STAT3 signaling in the regulation of metastasis, the transition of cancer stem cells, and chemoresistance of cancer by epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 217.
- [27] Manore S G, Doheny D L, Wong G L, *et al.* IL-6/JAK/STAT3 signaling in breast cancer metastasis: Biology and treatment [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 866014.
- [28] Jiang H, Pang J J, Li T Y, *et al.* PD-1 regulates the anti-tumor immune function of macrophages through JAK2-STAT3 signaling pathway in colorectal cancer tumor microenvironment [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 502.
- [29] Ní Gabhann J, Hams E, Smith S, *et al.* Btk regulates macrophage polarization in response to lipopolysaccharide [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e85834.
- [30] Martinet V, Tonon S, Torres D, *et al.* Type I interferons regulate eomesodermin expression and the development of unconventional memory CD8⁺ T cells [J]. *Nat Commun*, 2015(6): 7089.
- [31] Meng X W, Cheng Z L, Lu Z Y, *et al.* MX2: Identification and systematic mechanistic analysis of a novel immune-related biomarker for systemic lupus erythematosus [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 978851.
- [32] Le S T, Marusina A I, Merleev A A, *et al.* SPP1hi macrophages, NKG7 T cells, CCL5hi fibroblasts, and IgM plasma cells are dominant features of necrobiosis [J]. *JCI Insight*, 2025, 10(4): e178766.
- [33] Yang Y L, Zhang Y, Li D D, *et al.* RNF144A functions as a tumor suppressor in breast cancer through ubiquitin ligase activity-dependent regulation of stability and oncogenic functions of HSPA2 [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(3): 1105-1118.

[责任编辑 李亚楠]