

周彦彤, 王政, 宋祖晨, 等. 泊沙康唑增强 cGAMP 对 4T1 乳腺肿瘤的抗肿瘤效应 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (7): 55-64.

ZHOU Y T, WANG Z, SONG Z C, et al. Posaconazole enhances the antitumor activity of cGAMP against 4T1 breast cancer [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (7): 55-64.

## 泊沙康唑增强 cGAMP 对 4T1 乳腺肿瘤的抗肿瘤效应

周彦彤, 王政, 宋祖晨, 余蕊宏, 焦丽娜, 刘振广\*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 乳腺癌是雌性犬中发病率最高的癌症, 有极高的转移率、复发率, 治疗手段有限且难以完全治愈, 本研究旨在探究泊沙康唑对干扰素基因刺激器 (STING) 激动剂 cGAMP 抗 4T1 乳腺肿瘤效应的增效作用。将 BALB/c 小鼠皮下注射 4T1 细胞建立乳腺癌移植瘤模型, 然后分为 Control 组、cGAMP 单独治疗组、泊沙康唑单独治疗组以及泊沙康唑+cGAMP 联用组, 观察并记录治疗过程中 4T1 乳腺肿瘤的体积、小鼠的体重以及生存率; 通过流式细胞术评估各组小鼠脾脏和肿瘤引流淋巴结中 CD69<sup>+</sup>T 细胞的比例; 通过高通量转录组测序探究肿瘤内免疫相关基因表达谱的变化。结果: 与 cGAMP 单独治疗组相比, 泊沙康唑+cGAMP 联用组中小鼠肿瘤体积显著下降, 生存率显著提高, 且小鼠脾脏和肿瘤附近引流淋巴结中 CD69<sup>+</sup>T 细胞比例显著升高; 在转录组测序中, 与 cGAMP 单独治疗组相比, 泊沙康唑+cGAMP 组中 cGAS-STING 通路相关基因、细胞毒性相关基因及 T 细胞特征基因的富集程度更高。以上结果表明, 泊沙康唑增强了 cGAMP 的体内抗肿瘤效应, 改变了肿瘤免疫相关基因表达谱, 并促进了 cGAS-STING 通路及其下游通路相关细胞因子反应的激活, 可作为有效的 STING 通路激活增效剂, 增强机体抗肿瘤免疫反应。

**关键词:** 泊沙康唑; cGAS-STING; 乳腺肿瘤; 肿瘤引流淋巴结; T 细胞免疫

中图分类号: S852.4 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)07-0055-10

## Posaconazole enhances the antitumor activity of cGAMP against 4T1 breast cancer

ZHOU Yantong, WANG Zheng, SONG Zuchen, YU Ruihong, JIAO Lina, LIU Zhenguang\*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** Breast cancer is the most prevalent malignancy in female dogs, characterized by extremely high metastasis and recurrence rates. Current treatment options are limited, and achieving complete remission is challenging. This study aims to investigate the synergistic effect of posaconazole on enhancing the anti-4T1 breast tumor activity of cGAMP. Female BALB/c mice were divided into four groups: the model group, the cGAMP monotherapy group, the posaconazole monotherapy group, and the combination therapy group of posaconazole and cGAMP. A breast cancer xenograft model was established by subcutaneous injection of 4T1 cells. In the treatment period, the tumor volume, body weight, and survival rate of the mice were monitored. The proportion of CD69<sup>+</sup>T cells in the spleen and tumor-draining lymph nodes of these rodents was assessed by flow cytometry. Finally, high-throughput transcriptome sequencing was employed to analyze changes in the immune-related gene expression profile within the tumor. Our results demonstrated that, compared with the cGAMP monotherapy group, the combination therapy in the treated groups significantly reduced tumor volume and improved survival rates of the mice, accompanied by a marked increase in CD69<sup>+</sup>T cell proportions in their spleen and tumor-draining lymph nodes. Transcriptome sequencing revealed heightened enrichment of genes associated with the cGAS-STING pathway, cytotoxicity, and T cell markers in the combination therapy group, compared with the cGAMP-alone group. These findings indicated that posaconazole enhanced the *in vivo* anti-tumor effects of cGAMP, altered the tumor immune-related gene expression profile, and enhanced activation of the cGAS-STING pathway and its downstream cytokine responses. Posaconazole might serve as an effective sensitizer for the STING pathway, bolstering the anti-tumor immune response in the body.

**Keywords:** posaconazole; cGAS-STING; breast tumors; tumor-draining lymphode; T cell-mediated immunity

近年来, 干扰素基因刺激器 (stimulator of interferon genes, STING) 信号通路在肿瘤免疫治疗研究

取得了显著进展。作为内质网上的核心适配蛋白, STING 能够敏锐地感知细胞质中的 DNA 片段, 并随之激活下游的 TBK1 激酶与 IRF3 转录因子, 进而触发一系列 I 型干扰素 (interferon-I, IFN-I) 反应。这一过程对于促进肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞的浸润及其抗肿瘤作用的发挥至关重要<sup>[1]</sup>。在小鼠 4T1 乳腺癌的研究中, STING 通路的激活被证实能显著增强肿瘤微环境内免

收稿日期: 2024-10-20; 修回日期: 2025-04-29

基金项目: 中国科协青年托举人才工程项目 (2022QNR001)

第一作者: 周彦彤, 女, 硕士研究生

\* 通信作者: 刘振广, 博士, 副教授, 研究方向: 临床兽医学,

E-mail: lzg199011@163.com。

疫细胞的浸润,尤其是 CD8<sup>+</sup> T 细胞与自然杀伤细胞,从而有力提升了抗肿瘤免疫反应的效果<sup>[2]</sup>。尽管 STING 通路在 4T1 乳腺癌研究中的应用主要聚焦于小鼠模型,但 4T1 乳腺癌的研究在生物学特性、遗传背景及病理过程等方面与人类及犬乳腺癌存在诸多相似之处<sup>[3-4]</sup>,因此,小鼠乳腺癌的研究成果对人类及犬乳腺癌的治疗也具有重要的借鉴价值。

近年来,我国宠物犬饲养数量显著增加,肿瘤性疾病已成为导致犬只死亡的主要原因之一,而犬乳腺肿瘤是雌性犬中最常见的肿瘤性疾病。犬乳腺癌已被广泛用作研究人类乳腺癌的转换模型<sup>[5]</sup>。外科手术是临床治疗犬乳腺癌的主要手段,也是控制局部肿瘤最有效的方法。然而,高转移率和复发率使单纯的外科手术无法达到完全治愈的效果<sup>[6-7]</sup>,通常还需要配合化疗、放射性疗法等辅助性治疗,而化疗和放射性疗法因其非选择性杀伤细胞,通常伴随着严重的副作用<sup>[8]</sup>。与传统治疗方法相比,免疫疗法利用自身免疫系统对肿瘤细胞进行识别和杀伤,增强并维持抗肿瘤免疫应答,具有更好的靶向性和较小的副作用。STING 通路在犬科动物抗肿瘤免疫治疗研究领域展现出极大潜力<sup>[9-10]</sup>。最新研究表明,通过激活 STING 通路,可以增强犬科动物的抗肿瘤免疫反应,从而提高治疗效果<sup>[11-13]</sup>。尽管 STING 通路在犬乳腺癌治疗研究中具有广阔的应用前景,但 STING 激动剂 cGAMP 仍存在递送效率差和生物利用度低等局限,加之高昂的成本严重限制了其在兽医临床的广泛应用<sup>[14-15]</sup>。因此,便捷高效且价格低廉的 STING 通路激活增效药物值得进一步研究。

Niemann-Pick 型 C1 溶酶体膜蛋白 (Niemann-Pick 型 C1, NPC1) 是 STING 蛋白运输过程中的一种辅助因子,其功能是作为 STING 与溶酶体间的接头蛋白。NPC1 与 STING 相互作用后将其募集到溶酶体,进而促进其降解<sup>[16]</sup>。相反, NPC1 缺陷则导致 STING 被移动至高尔基体加工以募集 TBK1<sup>[17]</sup>,促进 cGAS-STING 激活并增强下游干扰素调节因子 3 (interferon regulatory factor 3, IRF3) 的激活,增强 IRF3-IFN 信号传导<sup>[18]</sup>。因此, NPC1 或成为提高 STING 通路活性进而增强抗肿瘤免疫的新靶点。有研究表明,泊沙康唑可作为 NPC1 的抑制剂,通过与 NPC1 蛋白直接结合进而抑制 NPC1 的功能<sup>[19-20]</sup>。然而,泊沙康唑对 STING 通路及其介导的抗肿瘤作用的影响仍未明确。

本研究通过测定 4T1 乳腺癌荷瘤小鼠的 T 细胞活化以及肿瘤生长情况,分析肿瘤组织中的基因表达谱,从而探究泊沙康唑对 cGAMP 的抗肿瘤效力是否具有增效作用,揭示其对 cGAS-STING 通路和下游通

路的影响,以期为犬乳腺癌的治疗提供经济、高效的药物联用思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和动物

4T1 细胞购于青岛科瑞思博生物科技有限公司。6 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠购于扬州大学实验动物中心,体重为 16~18 g。动物饲养严格遵守实验动物福利伦理的要求,参考南京农业大学实验动物中心文件《实验动物福利伦理审查指南》。所用实验动物处理方案经南京农业大学动物福利和使用机构伦理委员会批准,批准号: NJAU.No20240702134。

### 1.2 主要试剂和仪器

泊沙康唑、cGAMP 购自上海麦克林生化科技股份有限公司;红细胞裂解液、RPMI-1640 培养基、含 EDTA 的 0.25% 胰酶购自上海源培生物科技股份有限公司; CD3、CD4、CD8 和 CD69 流式抗体购自 BioLegend 公司; 乌拉圭胎牛血清 (FBS) 购自 ExCell 公司; TRIzol 购自擎科公司; 氯仿、异丙醇购自阿拉丁公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自北京全式金公司; 高速剪切匀质机购自顺流科技公司; PCR 基因扩增仪、荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; CytoFLEX 流式细胞仪购自 Beckman Coulter 公司; 4 °C 离心机购自 Eppendorf 公司; Nanodrop<sup>TM</sup> 2100 分光光度计购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

### 1.3 细胞培养及传代

将 4T1 细胞解冻复苏后,用含 10% FBS 和 1% 青-链霉素的 RPMI-1640 细胞培养基重悬细胞,随后以  $1 \times 10^6$  个/mL 的密度接种于 T25 细胞培养瓶中。置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。每 3 d 更换新鲜培养基,进行传代。传代时,采用含 EDTA 的 0.25% 胰酶消化 30 s,加入 3 倍体积培养基终止消化后收集细胞,收集细胞悬液离心 5 min ( $1\ 500\ g$ ),弃去上清液,用新鲜培养基重悬细胞,按 1:3 的比例进行分装,继续培养。

### 1.4 荷瘤小鼠模型建立及试验分组

6 周龄的 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠适应性喂养 1 周后,用于建立动物模型。消化并收集 4T1 细胞,使用 0.9% 生理盐水重悬并调整细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/mL,使用 1 mL 注射器于其右腋同一位置缓慢注射 0.1 mL 细胞悬液。肿瘤 6 d 后,荷瘤小鼠右侧腋下肿瘤长至米粒大小,用游标卡尺测量其体积为  $100\ mm^3$  即可以分组给药。从造模成功的小鼠中随机抽取 72 只小鼠分为 4 组,每组 18 只。其中,Control 组仅造模不进行药物干预;泊沙康唑单独治疗组 (PSZ 组) 使用泊沙康唑 216  $\mu\text{g}$ /只灌胃给药;

cGAMP 单独治疗组 (cGAMP 组) 使用 cGAMP 10  $\mu\text{g}$ /只瘤内注射给药; 泊沙康唑 + cGAMP 联用组 (CP 组) 使用 cGAMP 10  $\mu\text{g}$ /只瘤内注射给药, 同时泊沙康唑 216  $\mu\text{g}$ /只灌胃给药。除 Control 组外, 其余 3 组于造模后第 7 天开始给药, cGAMP 的给药剂量和方案参照之前的研究制定<sup>[21-22]</sup>, 泊沙康唑的给药剂量参考 Trinh<sup>[19]</sup>的安全剂量制定。所有给药组每间隔 2 d 给药 1 次, 共给药 3 次。

### 1.5 小鼠肿瘤表观数据记录

自首次给药日起, 每隔 2 d 测量小鼠体重及肿瘤的最长径 (a) 和最短径 (b), 计算肿瘤体积, 肿瘤体积 =  $a \times b \times b / 2$ , 记录并绘制肿瘤体积生长曲线。当肿瘤体积超过 1 500  $\text{mm}^3$ , 依据 RBT 173—2018《动物实验人道终点评审指南》立即实施人道主义处死。

### 1.6 脾脏中 T 淋巴细胞活化水平的检测

#### 1.6.1 脾脏收集及细胞悬液制备

将采集的脾脏放置在 70  $\mu\text{m}$  细胞筛上, 使用 2.5 mL 注射器活塞在细胞筛上研磨脾脏, 同时用含 1% FBS 的 PBS 冲洗细胞筛网, 收集细胞悬液。1 500  $g$  离心 5 min, 弃去上清液。加入 1 mL 红细胞裂解缓冲液并重悬细胞, 在室温下孵育 3 min。加入 2 mL PBS 以中和红细胞裂解缓冲液。1 500  $g$  离心 5 min, 弃去上清液。加入 2 mL PBS 重悬细胞沉淀后, 重复离心 5 min 清洗一遍。弃去上清液后加入 1 mL PBS 重悬后移至 1.5 mL EP 管中。

#### 1.6.2 脾脏细胞流式细胞术检测

取 1.6.1 中的细胞悬液进行染色, 按照 CD3-FITC、CD4-APC、CD8-PE 和 CD69-PE-Cy7 四种染液母液与 PBS 以 1:100 的比例配制染液工作液。向每管细胞沉淀加入 100  $\mu\text{L}$  的工作液, 染色 30 min。随后, 加入 PBS 洗涤细胞, 离心 5 min (1 500  $g$ ), 弃去上清液, 重复洗涤 2 次。最后, 加入 1 mL PBS 重悬细胞沉淀, 经 200  $\mu\text{m}$  细胞筛网过滤后, 移至 1.5 mL 离心管中。使用流式细胞仪检测细胞表面 CD3、CD4、CD8 及 CD69 的表达水平及其比例。

### 1.7 肿瘤引流淋巴结中 T 淋巴细胞活化水平的检测

#### 1.7.1 肿瘤引流淋巴结收集及细胞悬液制备

在末次给药 24 h 后, 从各组中随机选取 6 只小鼠, 采用颈椎脱臼法处死, 并采集异位肿瘤附近的肿瘤引流淋巴结 (tumor-draining lymph node, TDLN)。将收集的淋巴结放在 70  $\mu\text{m}$  细胞筛上, 用 2.5 mL 注射器活塞在细胞筛上研磨淋巴结, 同时用含 1% FBS 的 PBS 冲洗细胞筛网收集细胞悬液。弃去上清液, 加入 1 mL PBS 重悬细胞, 并将细胞悬液转移至 1.5 mL 离心管中备用。

1.7.2 肿瘤引流淋巴结细胞流式细胞术检测与 1.6.2 步骤相同。

### 1.8 4T1 乳腺肿瘤组织的转录组测序

#### 1.8.1 样品处理

在末次给药 6 h 后, 每组各取 4 只小鼠颈椎脱臼法处死。完整剥离肿瘤组织, 立即浸入预冷的 0.9% NaCl 溶液冲洗瘤体 3 次, 将清洗后的肿瘤组织转移至 2 mL 离心管中, 存放至 -80  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中用于转录组测序及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测。

#### 1.8.2 测序及分析

测序试验基于 Illumina Novaseq 6000 测序平台, 测序服务由美吉测序公司提供。利用美吉测序公司提供的生物信息分析云平台 (<https://cloud.majorbio.com>) 对转录组测序数据进行分析。

### 1.9 cGAS-STING 信号通路相关及炎症因子相关 mRNA 水平的检测

#### 1.9.1 肿瘤组织提取总 RNA

将采集的肿瘤组织转移至 2 mL 离心管中, 加入 1 mL TRIzol 试剂和 3 颗研磨珠, 置于高速剪切匀质机中以 30 Hz 频率研磨 5 min。随后, 加入 0.2 mL 氯仿, 涡旋振荡 10 s 后静置 15 min, 形成上层水相、中间层及下层有机相。4  $^{\circ}\text{C}$  离心 15 min (12 000  $g$ ), 小心吸取上层水相 (避免吸入中间层和有机相)。向水相中加入等体积预冷的异丙醇, 颠倒混匀后置于 -20  $^{\circ}\text{C}$  过夜以沉淀 RNA。次日, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min (12 000  $g$ ), 弃去上清液, 收集 RNA 沉淀。用预冷的 75% 乙醇洗涤沉淀 2 次, 弃上清液后室温干燥至乙醇完全挥发。最后, 加入 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解 RNA。使用 Nanodrop<sup>TM</sup> 2100 分光光度计测定 RNA 浓度 ( $A_{260}$  值) 及纯度 ( $A_{260}/A_{280}$ ), 记录数据并冻存样本于 -80  $^{\circ}\text{C}$  备用。

#### 1.9.2 RT-qPCR

以 1.9.1 中提取的 RNA 为模板, 反转录成 cDNA, 进行 RT-qPCR 检测分析。根据 Primer Bank 中的白介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、干扰素刺激基因 15 (ISG15)、 $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ )、 $\beta$ -干扰素 (IFN- $\beta$ ) 和颗粒酶 B (Granzyme B) 的序列设计引物, 用 Primer 6 软件设计引物, 具体信息见表 1。引物均由擎科生物科技股份有限公司合成。

### 1.10 数据统计和分析

所有数据以“平均值 $\pm$ 标准误”形式呈现。在肿瘤生长曲线中, SEM 以 95% 置信区间为误差线。各组小鼠肿瘤体积的组间比较应用方差分析以及 Two-way ANOVA 进行统计分析, 流式细胞术数据使用 Flow Jo 分析, 基因富集评分使用 ROAST 算法分析, 所有统计作图应用 GraphPad Prism 6.0 进行。

表 1 引物序列

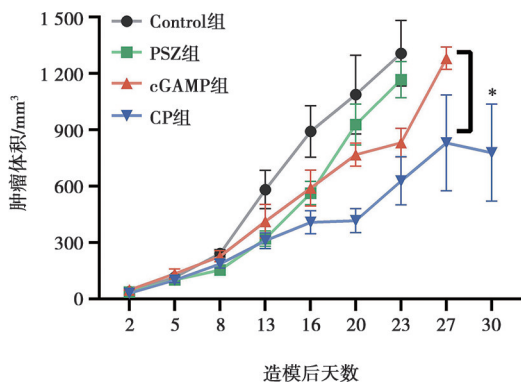
| 引物名称         | 引物序列 (5'→3')            |
|--------------|-------------------------|
| IFN-β-F      | CAGCTCCAAGAAAGGACGAAC   |
| IFN-β-R      | GGCAGTGTAAGTCTTCTGCAT   |
| IFN-γ-F      | ATGAACGCTACACACTGCATC   |
| IFN-γ-R      | CCATCCTTTTGGCAGTTCTCTC  |
| ISG15-F      | GGTGTCCGTGACTAACTCCAT   |
| ISG15-R      | TGGAAAGGCTAAGACCGTCCT   |
| Granzyme B-F | CCACTCTCGACCCTACATGG    |
| Granzyme B-R | GGCCCCAAAGTGACATTTATT   |
| GADPH-F      | AGCTCGGTGTGAACGGATTTG   |
| GADPH-R      | TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA |
| IL-6-F       | TAGTCTTCTACCCCAATTTCC   |
| IL-6-R       | TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC   |
| TNF-α-F      | CCCTCACACTCAGATCATCTTCT |
| TNF-α-R      | GCTACGACGTGGGCTACAG     |

## 2 结果

### 2.1 泊沙康唑增强 cGAMP 对 4T1 乳腺肿瘤的抑制作用

#### 2.1.1 对肿瘤生长的影响

为了探究泊沙康唑是否影响 cGAMP 对 4T1 乳腺癌的抑瘤作用, 本试验成功构建小鼠 4T1 乳腺癌模型。Control 组小鼠的肿瘤持续增长, cGAMP 组、PSZ 组和 CP 组的肿瘤生长速度在用药治疗后得到不同程度减缓。在第 27 天时, 与 cGAMP 组相比, CP 组中肿瘤生长速度显著减缓 ( $P < 0.05$ )。结果见图 1。



注: \* 表示  $P < 0.05$ 。下同。

图 1 各组小鼠在用药后的肿瘤体积变化

#### 2.1.2 对荷瘤小鼠生存率的影响

为探究泊沙康唑是否影响 cGAMP 治疗小鼠的生

存率, 本试验记录了各组荷瘤小鼠生存情况。如图 2 所示, Control 组的荷瘤小鼠在造模第 27 天全部死亡。与 Control 组相比, 3 个给药组中小鼠的存活时长均得到提升。在造模后的第 4 周, 与 CP 组相比, PSZ 组和 cGAMP 组以及 Control 组中的荷瘤小鼠生存率开始快速下滑。在第 30 天时, PSZ 组和 cGAMP 组的荷瘤小鼠全部死亡, 而 CP 组的生存率显著提高。

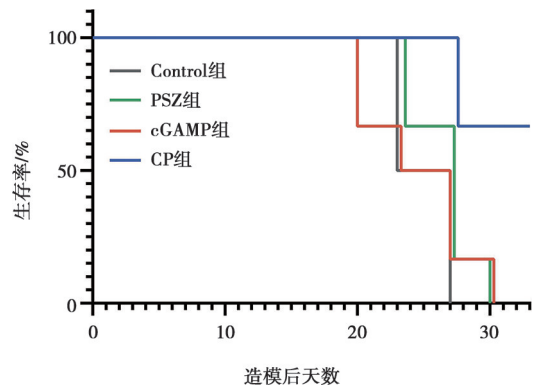


图 2 各组小鼠的生存率变化

#### 2.1.3 对荷瘤小鼠体重的影响

如图 3 所示, 在治疗过程中, 各组的荷瘤小鼠体重均呈缓慢上升状态, 符合荷瘤小鼠的正常生长情况, 且各组荷瘤小鼠体重均无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。

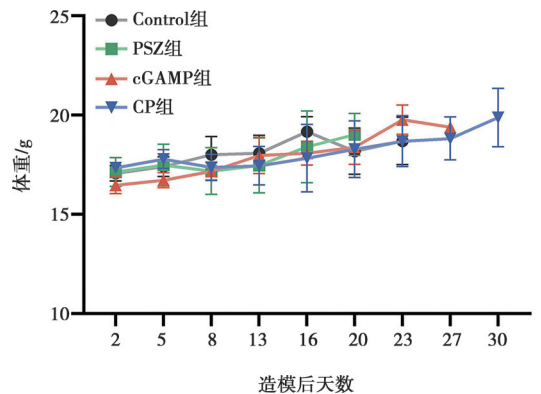
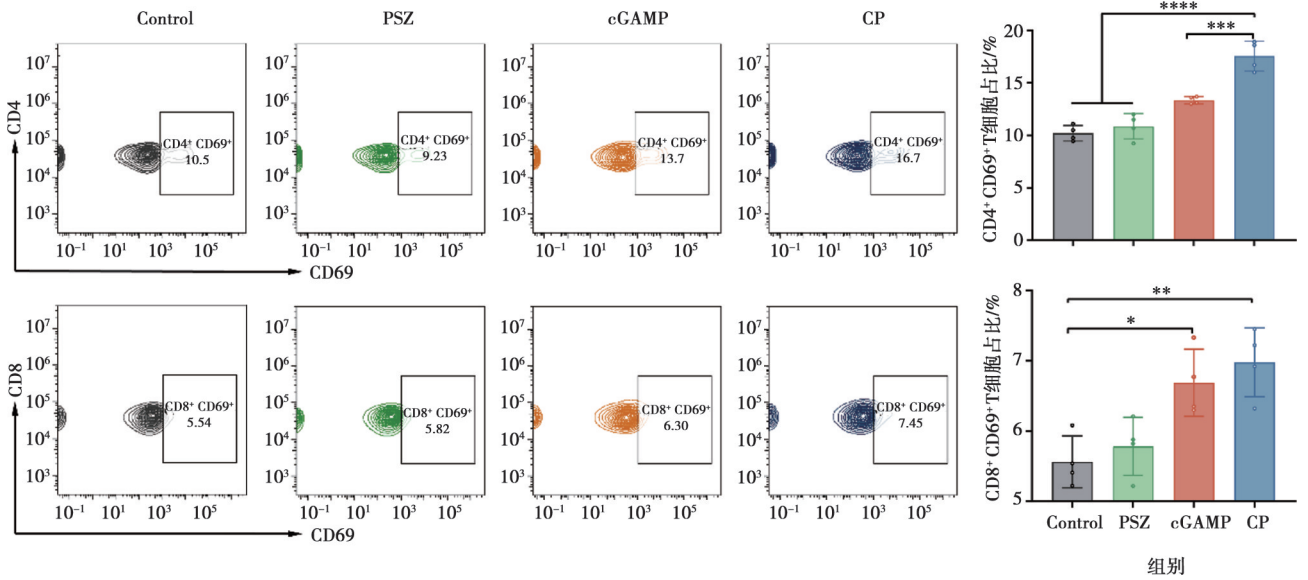


图 3 各组小鼠的体重变化

## 2.2 泊沙康唑增强 cGAMP 诱导的脾脏 T 淋巴细胞活化情况

如图 4 所示, 与 Control 组相比, cGAMP 组中  $CD8^+CD69^+$ T 细胞的比例显著升高 ( $P < 0.05$ ), CP 组中 T 细胞 CD69 的表达水平上调更为显著 ( $P < 0.01$ )。与 Control 组相比, PSZ 组脾脏中  $CD69^+$ T 细胞比例无明显差异 ( $P > 0.05$ )。



注：\* \* 表示  $P < 0.01$ ，\* \* \* 表示  $P < 0.001$ ，\* \* \* \* 表示  $P < 0.0001$ 。下同。

图 4 脾脏 T 细胞活化水平

### 2.3 泊沙康唑增强 cGAMP 诱导的引流淋巴结 T 淋巴细胞活化情况

如图 5 所示，相较于 Control 组和 PSZ 组，cGAMP 组和 CP 组 TDLN 中 CD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T 细胞和 CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T 细胞的比例均极显著升高 ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.0001$ )。同时，与 cGAMP 组相比，CP 组中 CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> T 细胞的比例升高更为显著 ( $P < 0.0001$ )。结果表明，泊沙康唑能够有效增强 cGAMP 对 T 细胞活化的上调作用，这与脾细胞中 T 细胞活化结果趋势一致。

### 2.4 泊沙康唑增强 cGAMP 引发的 4T1 乳腺肿瘤基因表达谱改变

#### 2.4.1 泊沙康唑增强 cGAMP 诱导的基因富集

为了进一步探究泊沙康唑和 cGAMP 联合治疗对肿瘤内基因表达谱的影响，本研究通过 RNA-seq 转录组测序分析在治疗后肿瘤组织内产生的差异表达基因 (differentially expressed gene, DEGs)。DEGs 分析结果显示 (图 6A~C)，与 cGAMP 组相比，CP 组中 DEGs 中有 495 个基因富集程度上调。GO 富集分析显示 (图 7)，这些富集的基因主要与对刺激的反应调节 (response to stimulus)、免疫系统 (immune

system process)、多细胞生物过程调控 (regulation of multicellular organismal process)、趋化性 (chemotaxis) 和信号通路激活 (signaling receptor binding、signaling receptor activator activity) 等有关。

#### 2.4.2 对肿瘤内信号通路富集的影响

与 cGAMP 组相比，CP 组 KEGG 通路富集结果中前 5 个通路分别是：先天免疫系统模式受体识别通路 (PPAR signaling pathway)、细胞因子-细胞因子受体相互作用 (cytokine - cytokine receptor interaction)、ECM 受体相互作用 (ECM-receptor interaction)、补体和凝固级联 (complement and coagulation cascades) 和趋化因子通路 (chemokine signaling pathway)，主要与细胞迁徙、细胞毒性、免疫细胞招募和增殖等生物过程有关 (图 8A)。GSEA 多基因富集的结果中，与细胞因子分泌相关的信号通路 (cytokine-cytokine receptor interaction)、NF- $\kappa$ B 信号通路 (NF- $\kappa$ B signaling pathway)、JAK-STAT 信号通路 (JAK-STAT signaling pathway) 和 TNF 信号通路 (TNF signaling pathway) 等基因集显著富集 (图 8B)。

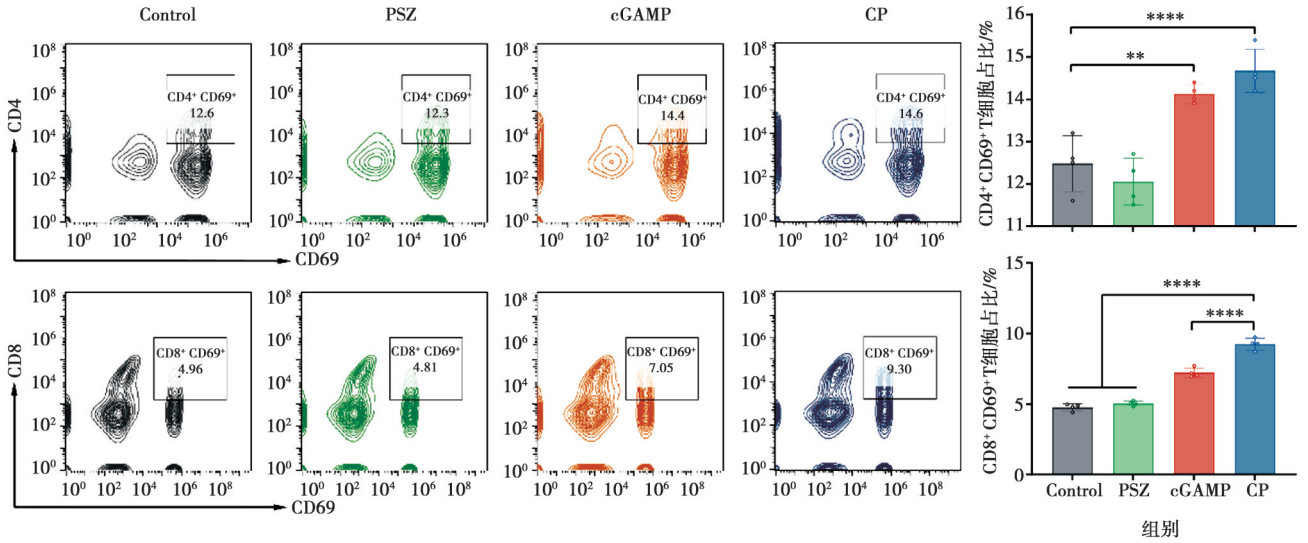
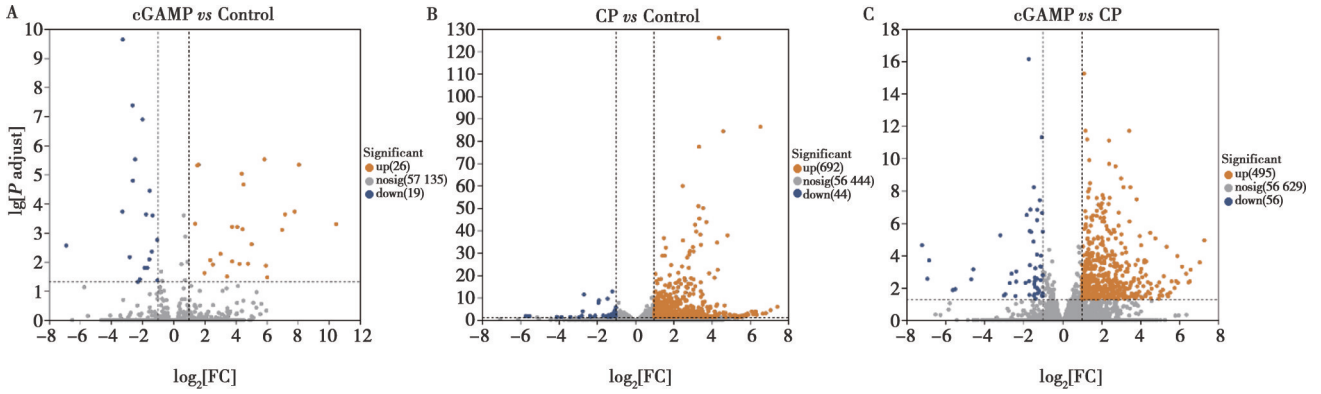


图 5 TDLN 中 T 细胞活化水平



A. cGAMP vs Control 组; B. CP vs Control 组; C. CP vs cGAMP 组。

图 6 CP、Control 和 cGAMP 组 DEGs 火山图

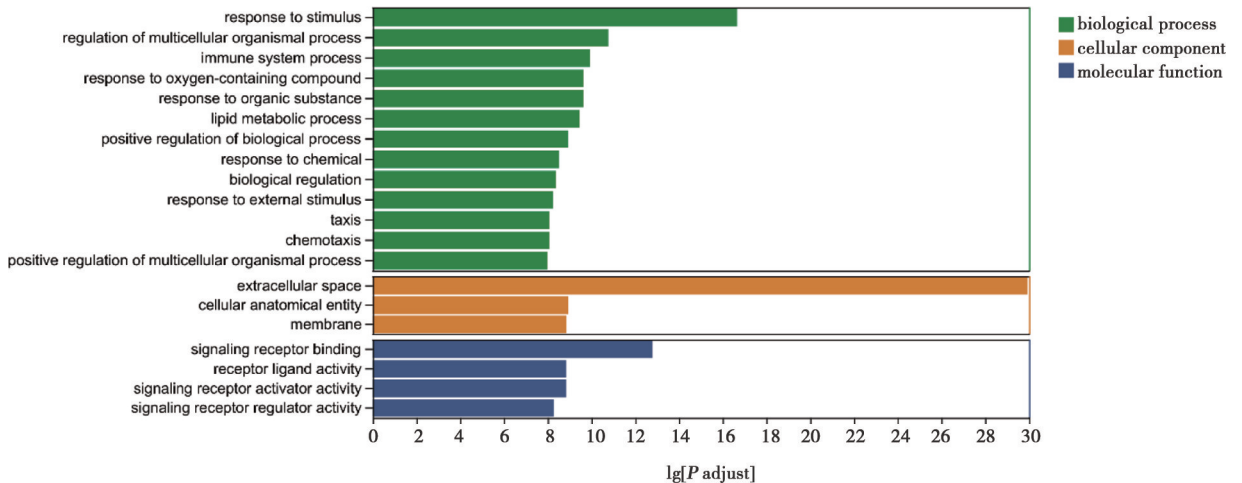
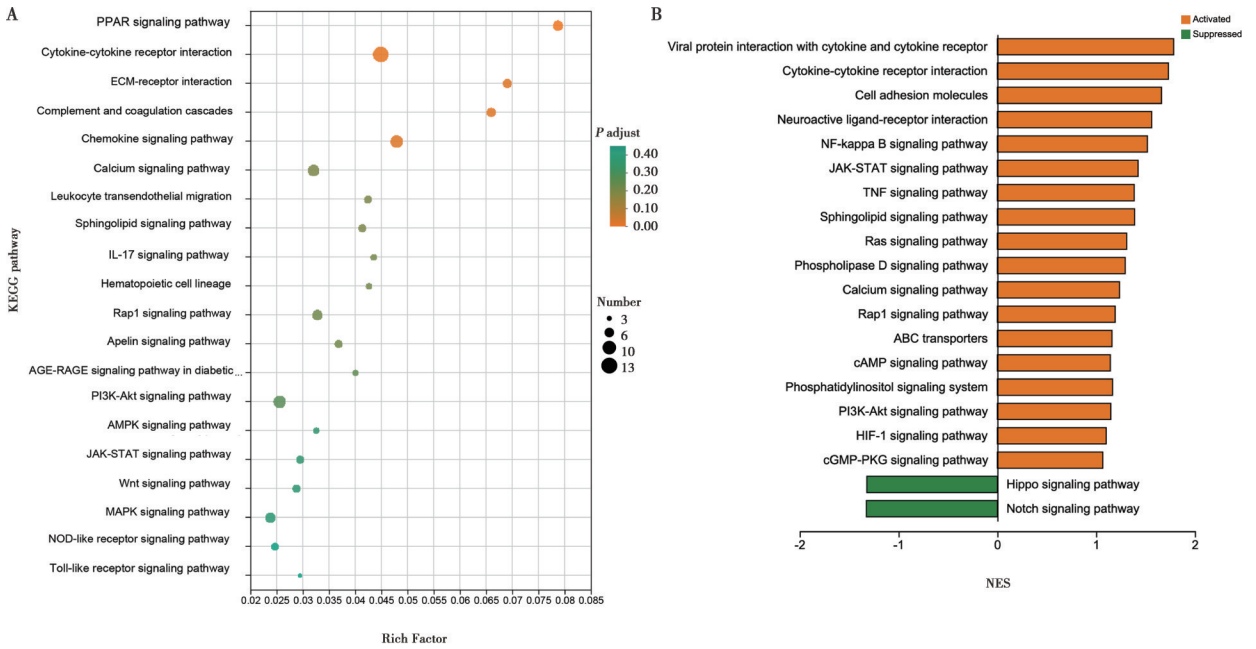


图 7 CP vs cGAMP 组 GO 功能富集分析



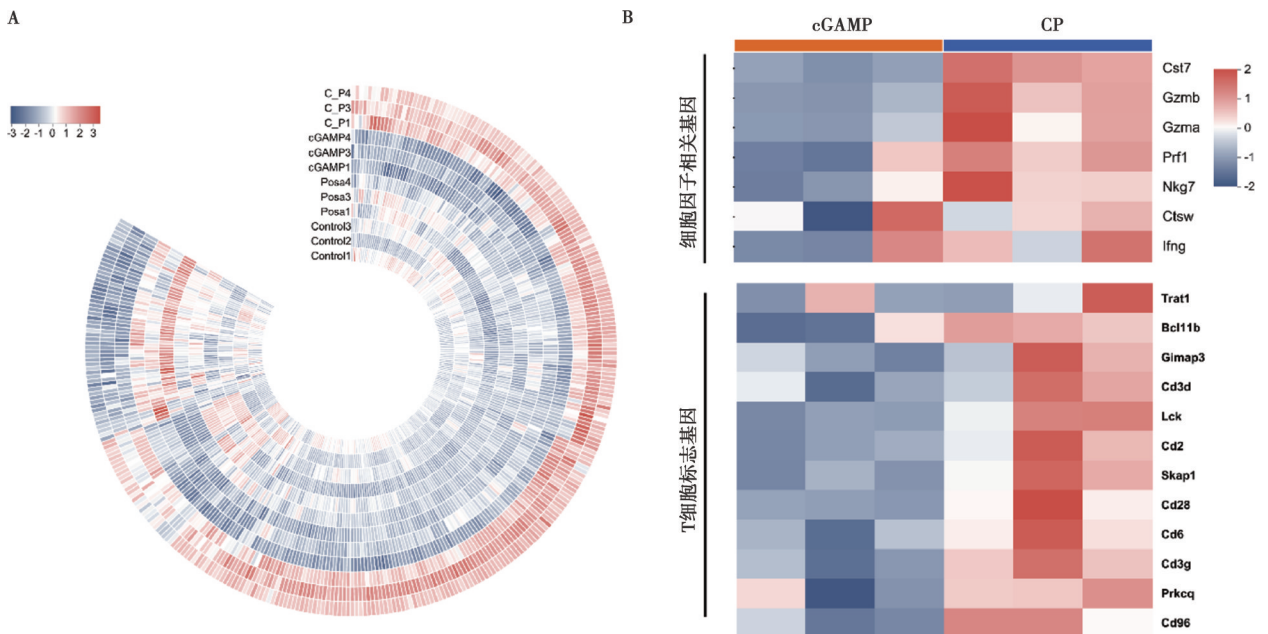
A. KEGG 通路富集分析; B. GSEA 多基因集富集分析。

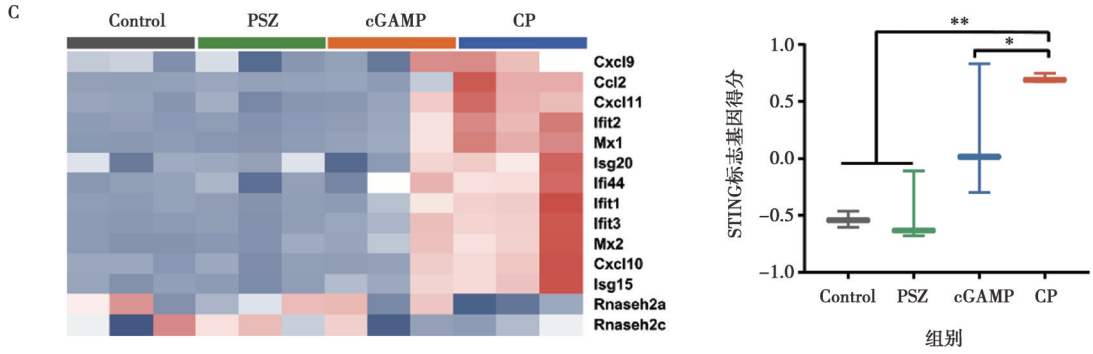
图 8 CP vs cGAMP 组的富集通路差异分析

2.4.3 对肿瘤内 cGAS-STING 通路相关基因富集程度的影响

为了从基因层面探究泊沙康唑对 cGAMP 诱导 cGAS-STING 通路激活及 T 细胞免疫应答的影响，本研究对基因富集的结果进行了更深入的挖掘。结果显示，与其他 3 组相比，CP 组的 DEGs 富集程度显著升高 (图 9A)。与 cGAMP 组相比，CP 组中与细胞

毒性相关的基因 Prf1、IFN- $\gamma$  和 Granzyme B 等及 T 细胞特征的基因<sup>[23]</sup>均显著上调 (图 9B)。另外，CP 组中 cGAS-STING 通路相关基因表达水平显著提高，其富集水平的评分也显著升高，表明泊沙康唑增强了 cGAMP 诱导的 cGAS-STING 通路激活和 T 细胞反应 (图 9C)。





A. 总 DEGs 富集; B. 细胞毒性相关基因和 T 细胞特异性基因; C. cGAS-STING 通路相关基因富集 (左) 和 ROAST 分析富集分数 (右)。

图 9 泊沙康唑对 cGAMP 诱导 DEGs 偏向的影响

### 2.4.4 对肿瘤组织中抗肿瘤免疫应答相关基因 mRNA 水平的影响

为验证转录组数据的可靠性, 将测序同源样本通过 qRT-PCR 评估抗肿瘤免疫相关细胞因子和炎性细胞因子的 mRNA 相对表达量。结果显示 (图 10), 与

抗肿瘤免疫应答相关的细胞因子 (Granzyme B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  和 ISG15) 和炎性因子 IL-6 在 CP 组中表达量均显著提高 ( $P < 0.05$ ), 而其他 2 个试验组和 Control 组无明显差异 ( $P > 0.05$ ), 证明转录组数据可靠。

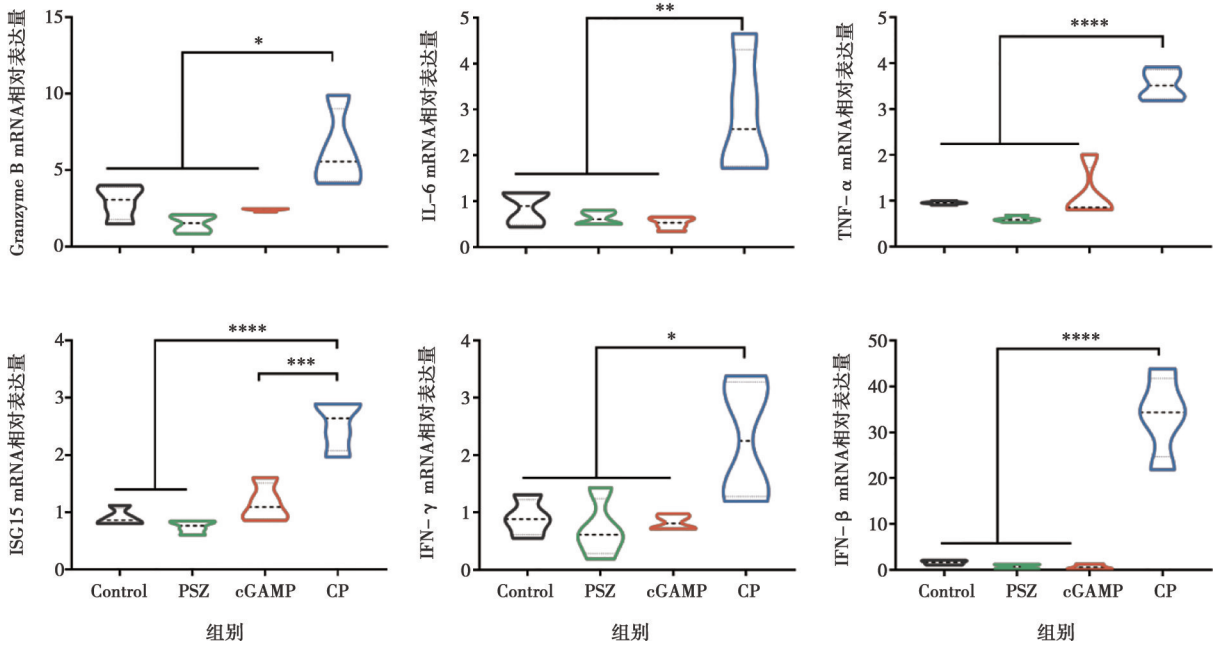


图 10 肿瘤组织中抗肿瘤免疫应答相关细胞因子相对表达量

## 3 讨论

cGAS-STING 信号通路作为 IFN-I 应答的关键调控通路, 在小鼠乳腺癌治疗研究中已得到广泛认可, 其激活后可触发下游 IFN-I 应答, 进而影响 TME 中免疫细胞的构成与功能<sup>[24-25]</sup>。为增强基于 cGAS-STING 通路的抗肿瘤免疫治疗效果并降低治疗成本, 本研究创新性采用泊沙康唑作为 cGAMP 的增效剂, 通过调控 STING 蛋白降解途径, 放大 cGAMP 激活

cGAS-STING 信号通路的效应。这一策略不仅增强了抗肿瘤效果, 还有望降低治疗成本, 为 cGAMP 在兽医领域的普及应用提供了新的可能。

小鼠作为常用的基础动物模型, 其试验结果对于人类和动物疾病治疗研究均具有借鉴意义。本研究通过小鼠 4T1 肿瘤模型验证了泊沙康唑与 cGAMP 联用策略的抗肿瘤效果。结果显示, 单独使用 cGAMP 治疗仅轻微减缓肿瘤生长速度, 且随着造模时间的延长, 肿瘤体积逐渐达到与 Control 组相当的水平; 与

cGAMP 组相比, CP 组显著抑制肿瘤的生长速度和体积,同时显著提高荷瘤小鼠的生存率。以上结果表明,泊沙康唑可作为 cGAMP 的增效药物,显著增强 cGAMP 的抗肿瘤活性。

在抗肿瘤免疫应答过程中, T 细胞是内源性抗肿瘤免疫的核心调控细胞,具有选择性识别肿瘤抗原、直接杀伤肿瘤细胞以及协调多种免疫反应的能力<sup>[26-27]</sup>。CD69 是 CD4<sup>+</sup>T 细胞和 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化后上调的早期标志,常作为评估 T 细胞活化水平的指标<sup>[28]</sup>。脾脏和 TDLN 中 T 细胞活化状态的结果均显示,与 Control 组相比, CP 组显著上调活化 T 细胞的比例,尤其是 TDLN 中的早期活化 CD8<sup>+</sup>T 细胞的比例。TDLN 是肿瘤特异性免疫细胞的生发中心,其中存在着大量被抑制的免疫资源(免疫细胞、细胞因子等)<sup>[29]</sup>。活化的 CD8<sup>+</sup>T 细胞在 TDLN 中快速增殖,并通过趋化因子募集至肿瘤组织,以执行抗肿瘤功能<sup>[30-31]</sup>。以上结果表明,泊沙康唑有效增强了 cGAMP 诱导 TDLN 中 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化与募集的能力,进一步推动肿瘤组织中的免疫杀伤功能。

细胞毒性 CD8<sup>+</sup>T 细胞是抗肿瘤免疫的主要效应细胞,可通过释放颗粒酶和穿孔素直接杀伤肿瘤细胞,同时分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  等细胞因子增强机体防御能力<sup>[32]</sup>。肿瘤组织转录组测序结果显示,CP 组中 cGAS-STING 信号通路相关的基因、细胞毒性相关的基因和 T 细胞特征基因被显著富集。此外,RT-qPCR 结果显示,CP 组中 Granzyme B、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IFN- $\beta$  和 IL-6 等细胞因子的 mRNA 表达水平显著高于 cGAMP 组,与转录组分析结果一致,验证了转录组数据的可靠性。以上结果表明,泊沙康唑促使 cGAMP 更高效地激活 cGAS-STING 通路,进一步激活 T 细胞反应,使 TME 向炎性浸润状态发展。

综上所述,泊沙康唑能够显著增强 cGAMP 的抗肿瘤效应,其通过促使 cGAMP 更高效地激活 cGAS-STING 信号通路,并诱导更高水平的 CD8<sup>+</sup>T 细胞活化并肿瘤组织募集,进而重塑 TME 的免疫细胞浸润状态。此外,泊沙康唑在放大 cGAMP 抗肿瘤效应的同时降低了死亡率,展现其作为 cGAS-STING 信号通路激活增效剂的安全性高效性。基于 4T1 乳腺肿瘤模型的试验结果,本研究推测,泊沙康唑与 cGAMP 的联用策略在人类乳腺癌的治疗中同样具有广阔的应用前景。这一联用策略有望克服传统疗法中无差别细胞杀伤的局限,提高抗肿瘤效应,同时降低免疫疗法的治疗成本。因此,本研究对犬乳腺癌治疗提供了创新性的药物应用策略与坚实的理论基础,有望为犬乳腺癌的治疗研究开辟一条新路径,但仍需进一步验证其在犬中的具体效果。

## 参考文献:

- [1] LANNG K R B, LAURIDSEN E L, JAKOBSEN M R. The balance of STING signaling orchestrates immunity in cancer [J]. *Nature Immunology*, 2024, 25 (7): 1144-1157.
- [2] XUE P, WANG Y, WANG X, et al. Zn<sup>2+</sup> enhanced the anti-breast cancer activity of fucoidan based nanoparticles by activating the cGAS-STING pathway [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2024, 500: 156729.
- [3] DOS REIS D C, DAMASCENO K A, DE CAMPOS C B, et al. Versican and tumor-associated macrophages promotes tumor progression and metastasis in canine and murine models of breast carcinoma [J]. *Frontiers in Oncology*, 2019, 9: 577.
- [4] LEE J, LEE S A, GU N Y, et al. Canine natural killer cell-derived exosomes exhibit antitumor activity in a mouse model of canine mammary tumor [J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021 (1): 6690704.
- [5] VAFAEI R, SAMADI M, HOSSEINZADEH A, et al. Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study [J]. *Cancer Cell International*, 2022, 22 (1): 14.
- [6] YU C, ZHENG H, LIU X, et al. The analysis of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, HER-2, CEA, CA15-3 and SF expression in the diagnosis of canine mammary tumors [J]. *Animals*, 2022, 12 (21): 3050.
- [7] VALDIVIA G, ALONSO-DIEZ Á, PÉREZ-ALENZA D, et al. From conventional to precision therapy in canine mammary cancer: a comprehensive review [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8, 623800.
- [8] 刘皓乾, 孙嘉徐, 何晓晖, 等. 放疗在犬猫肿瘤中的应用 [J]. *中国兽医杂志*, 2024, 60 (8): 110-117.
- [9] 李巴仑, 华进联. 犬肿瘤免疫疗法的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2020, 42 (7): 1288-1296.
- [10] 张凌涛. 可激活 STING 通路的纳米药物的构建及其在化学免疫疗法中的应用 [D]. 北京: 北京化工大学, 2023.
- [11] 杨洁, 季星好, 朱媛媛, 等. 天然免疫 DNA 感受器及其抗动物疫病研究进展 [J]. *中国动物传染病学报*, 2020, 28 (4): 103-111.
- [12] BOUDREAU C E, NAJEM H, OTT M, et al. Intratumoral delivery of STING agonist results in clinical responses in canine glioblastoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2021, 27 (20): 5528-5535.
- [13] GAO S, HOU Y, XU Y, et al. Discovery of orally bioavailable phosphonate prodrugs of potent ENPP1 inhibitors for cancer treatment [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2024, 279: 116853.
- [14] GAO Y, OUYANG Z, SHEN S, et al. Manganese dioxide-entrapping dendrimers co-deliver protein and nucleotide for magnetic resonance imaging-guided chemodynamic/starvation/immune therapy of tumors [J]. *ACS Nano*, 2023, 17 (23): 23889-23902.
- [15] JNEID B, BOCHNAKIAN A, HOFFMANN C, et al. Selective STING stimulation in dendritic cells primes antitumor T cell responses [J]. *Science Immunology*, 2023, 8 (79): eabn6612.
- [16] CHU T T, TU X, YANG K, et al. Tonic prime-boost of STING signalling mediates Niemann-Pick disease type C [J]. *Nature*, 2021,

- 596 (7873): 570–575.
- [17] HAN S, WANG Q, SONG Y, et al. Lithium ameliorates Niemann–Pick C1 disease phenotypes by impeding STING/SREBP2 activation [J]. *iScience*, 2023, 26 (5): 106613.
- [18] WANG A, CHEN C, MEI C, et al. Innate immune sensing of lysosomal dysfunction drives multiple lysosomal storage disorders [J]. *Nature Cell Biology*, 2024, 26 (2): 219–234.
- [19] TRINH M N, LU F, LI X, et al. Triazoles inhibit cholesterol export from lysosomes by binding to NPC1 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114 (1): 89–94.
- [20] SHIOI R, KARAKI F, YOSHIOKA H, et al. Image-based screen capturing misfolding status of Niemann–Pick type C1 identifies potential candidates for chaperone drugs [J]. *PLoS One*, 2020, 15 (12): e0243746.
- [21] HAN J, HU S, HU Y, et al. Discovery of podofilox as a potent cGAMP–STING signaling enhancer with antitumor activity [J]. *Cancer Immunology Research*, 2023, 11 (5): 583–599.
- [22] LAI J, FU Y, TIAN S, et al. Zebularine elevates STING expression and enhances cGAMP cancer immunotherapy in mice [J]. *Molecular Therapy*, 2021, 29 (5): 1758–1771.
- [23] YI M, LI T, NIU M, et al. Blockade of CCR5<sup>+</sup> T Cell Accumulation in the tumor microenvironment optimizes anti–TGF– $\beta$ /PD–L1 bispecific antibody [J]. *Advanced Science*, 2024, 11 (43): e2408598.
- [24] WANG X, LIU Y, XUE C, et al. A protein-based cGAS–STING nanoagonist enhances T cell-mediated anti-tumor immune responses [J]. *Nature Communications*, 2022, 13 (1): 5685.
- [25] KWON J, BAKHOUM S F. The cytosolic DNA–sensing cGAS–STING pathway in cancer [J]. *Cancer Discovery*, 2020, 10 (1): 26–39.
- [26] 纪元, 陈明洋. CD8<sup>+</sup>T 细胞在肿瘤免疫中的研究进展 [J]. *解剖科学进展*, 2024, 30 (4): 440–442.
- [27] PILIPOW K, DARWICH A, LOSURDO A. T–cell–based breast cancer immunotherapy [J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2021, 72: 90–101.
- [28] DE AQUINO M T, HODO T, SHANKER A. Upregulation of neuroreceptors on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells promotes their anti-tumor function [J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2015, 3 (Suppl 2): P322.
- [29] LIU Z, YU Z, CHEN D, et al. Pivotal roles of tumor–draining lymph nodes in the abscopal effects from combined immunotherapy and radiotherapy [J]. *Cancer Communications*, 2022, 42 (10): 971–986.
- [30] HIURA T, KAGAMU H, MIURA S, et al. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression [J]. *The Journal of Immunology*, 2005, 175 (8): 5058–5066.
- [31] 李宇翔, 刘芹, 刘宝瑞. 肿瘤引流淋巴结的特殊微环境及其靶向治疗 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30 (7): 622–627.
- [32] RITTER A T, SHTENDEL G, XU C S, et al. ESCRT–mediated membrane repair protects tumor–derived cells against T cell attack [J]. *Science*, 2022, 376 (6591): 377–382.