



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.250023

http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.250023

China Journal of General Surgery, 2025, 34(5):963-977.

· 乳腺外科专题研究 ·

# FAP介导的肿瘤相关成纤维细胞功能在三阴性乳腺癌免疫微环境及治疗应答中的作用

李梦茜<sup>1, 2</sup>, 张克兢<sup>1, 2</sup>, 夏凡<sup>1, 2</sup>

[1. 中南大学湘雅医院 普通外科(乳腺外科), 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省乳腺癌防治临床医学研究中心, 湖南 长沙 410008]

## 摘要

**背景与目的:** 三阴性乳腺癌(TNBC)是一种临床行为高度恶性的乳腺癌亚型, 免疫检查点抑制剂(ICB)联合化疗已成为其新辅助治疗的重要策略。然而, ICB疗效差异显著, 相关免疫微环境机制尚未明晰。肿瘤相关成纤维细胞(CAF)通过调控肿瘤微环境(TME)影响免疫治疗反应, 其中成纤维细胞活化蛋白(FAP)为CAF的关键标志物, 其在TNBC中的免疫功能尚缺乏系统研究。本研究旨在揭示FAP在TNBC中的表达特征、对免疫微环境及ICB疗效的影响, 并探讨其可能的免疫抑制机制及临床应用潜力。

**方法:** 综合利用TCGA和I-SPY2临床试验数据, 分析FAP表达与TNBC患者预后、免疫细胞浸润及免疫检查点分子表达之间的关系。通过CIBERSORT算法、GSEA通路富集分析及差异表达分析(DESeq2), 评估FAP相关免疫微环境特征, 并在转录组层面筛选其下游相关基因。构建FAP过表达与敲低的CAF模型, 联合CD8<sup>+</sup>T细胞共培养, 检测其对CD8<sup>+</sup>T细胞活性和凋亡的调控效应。进一步通过qPCR与Western blot验证转录组分析中发现潜在靶基因的表达变化。结合I-SPY2数据与湘雅医院TNBC病例的多重免疫荧光病理样本与临床资料, 分析FAP表达水平与新辅助免疫治疗病理完全缓解率(pCR)之间的关系及其预测价值。

**结果:** FAP在TNBC肿瘤组织中明显高于正常组织, 高表达患者总生存期(OS)明显缩短。多因素Cox分析确认FAP为TNBC患者OS的独立不良预后因子。FAP高表达与CD8<sup>+</sup>T细胞、自然杀伤细胞、滤泡辅助性T细胞浸润减少明显相关, 同时伴随CD276、TIM-3、PD-L2等免疫检查点分子上调。CAF模型中, FAP过表达可抑制CD8<sup>+</sup>T细胞活性并促进其凋亡, 敲低FAP则产生相反效应。转录组分析显示FAP高表达组中COL1A1等多种胶原蛋白基因明显上调, 且与FAP表达呈正相关; qPCR与Western blot实验证实FAP可正向调控COL1A1表达。I-SPY2数据分析表明, FAP低表达TNBC患者在接受帕博利珠单抗联合化疗后pCR率明显高于FAP高表达组, 湘雅临床病理队列亦验证FAP高表达患者CD8<sup>+</sup>T细胞浸润减少, 且pCR率更低, 受试者工作特征分析曲线下面积达0.857。

**结论:** FAP高表达CAF通过促进COL1A1分泌、抑制CD8<sup>+</sup>T细胞功能及上调免疫检查点分子, 塑造免疫抑制性TME, 导致TNBC患者预后不良及免疫治疗应答下降。FAP不仅可作为TNBC患者生存及疗效的预测生物标志物, 亦为未来联合靶向治疗的潜在干预靶点。

## 关键词

三阴性乳腺癌; 癌相关成纤维细胞; 肿瘤微环境

中图分类号: R737.9

**基金项目:** 吴阶平医学基金会基金资助项目(320.6750.2024-16-9); 湖南省科技创新计划基金资助项目(2022SK2041)。

**收稿日期:** 2025-01-09; **修订日期:** 2025-03-18。

**作者简介:** 李梦茜, 中南大学湘雅医院硕士研究生, 主要从事乳腺癌免疫微环境方面的研究。

**通信作者:** 夏凡, Email: 13723890818@163.com

# Role of FAP-mediated cancer-associated fibroblast function in the immune microenvironment and therapeutic response of triple-negative breast cancer

LI Mengxi<sup>1,2</sup>, ZHANG Kejing<sup>1,2</sup>, XIA Fan<sup>1,2</sup>

[1. Department of General Surgery (Breast Surgery), Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Hunan Breast Cancer Prevention and Treatment Clinical Medical Research Center, Changsha 410008, China]

## Abstract

**Background and Aims:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is a clinically aggressive subtype of breast cancer with limited treatment options. Immune checkpoint blockade (ICB) combined with chemotherapy has emerged as a key neoadjuvant therapeutic strategy for TNBC. However, significant variability in ICB efficacy exists among patients, and the underlying mechanisms related to the tumor immune microenvironment (TME) remain unclear. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), as major stromal components, regulate TME and influence immunotherapy responses. Fibroblast activation protein (FAP), a key marker of CAFs, has been associated with poor prognosis in multiple solid tumors, yet its immunological role in TNBC has not been systematically investigated. This study aims to elucidate the expression pattern of FAP in TNBC, its impact on the immune microenvironment and ICB efficacy, and to explore its potential immunosuppressive mechanisms and clinical implications.

**Methods:** The data from TCGA and the I-SPY2 clinical trial were integrated to assess the association of FAP expression with prognosis, immune cell infiltration, and immune checkpoint molecule expression in TNBC. Immune landscape profiling was conducted using CIBERSORT, GSEA enrichment analysis, and differential gene expression analysis (DESeq2) to characterize the immune features associated with FAP expression and to identify downstream genes at the transcriptomic level. CAF models with FAP overexpression or knockdown were constructed and co-cultured with CD8<sup>+</sup> T cells to evaluate FAP's regulatory effects on CD8<sup>+</sup> T cell activity and apoptosis. The expression of COL1A1, a potential FAP-regulated gene identified from transcriptomic analysis, was validated using qPCR and Western blot. Finally, clinical data and multiplex immunofluorescence pathology samples from TNBC patients at Xiangya Hospital were analyzed alongside I-SPY2 data to determine the predictive value of FAP expression for pathological complete response (pCR) following neoadjuvant immunotherapy.

**Results:** FAP was significantly upregulated in TNBC tumor tissues compared to normal tissues and associated with shorter overall survival. Multivariate Cox regression analysis identified FAP as an independent adverse prognostic factor. High FAP expression was correlated with reduced infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells, NK cells, and Tfh cells, as well as upregulation of immune checkpoints including CD276, TIM-3, and PD-L2. In CAF models, FAP overexpression suppressed CD8<sup>+</sup> T cell activity and promoted apoptosis, while FAP knockdown had the opposite effect. Transcriptomic analysis showed that COL1A1 and other collagen-related genes were significantly upregulated in the FAP-high group and positively correlated with FAP expression; qPCR and Western blot confirmed that FAP positively regulates COL1A1 expression. Analysis of I-SPY2 data revealed that FAP-low patients receiving pembrolizumab plus chemotherapy had significantly higher pCR rates compared to FAP-high patients. Consistently, clinical data from the Xiangya cohort showed reduced CD8<sup>+</sup> T cell infiltration and lower pCR rates in FAP-high patients, with a ROC AUC of 0.857 for predicting treatment response.

**Conclusion:** FAP-high CAFs contribute to the formation of an immunosuppressive TME in TNBC by

promoting COL1A1 secretion, inhibiting CD8<sup>+</sup> T cell function, and upregulating immune checkpoint molecules. High FAP expression is associated with poor prognosis and reduced response to immunotherapy, highlighting FAP as both a prognostic biomarker and a potential therapeutic target for stratified and combination treatment strategies in TNBC.

**Key words**

Triple Negative Breast Neoplasms; Cancer-Associated Fibroblasts; Tumor Microenvironment

CLC number: R737.9

乳腺癌是全球女性中最常见的恶性肿瘤<sup>[1-2]</sup>,其中三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)因缺乏雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2)的表达,具有高度侵袭性、易复发及缺乏有效靶向治疗等特点,患者预后较差<sup>[3]</sup>。近年来,免疫检查点抑制剂(immune checkpoint blockade, ICB),特别是抗PD-1/PD-L1疗法,为TNBC患者提供了新的治疗策略<sup>[4]</sup>。临床研究<sup>[5-7]</sup>表明,ICB可通过调控肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME),改善患者的预后。ICB联合化疗已成为具有高危因素TNBC患者新辅助治疗的标准方案<sup>[8]</sup>。然而,TNBC患者对ICB的应答存在明显差异性,并非所有患者均可从免疫治疗中获益。因此,如何预测ICB疗效并揭示影响疗效的潜在分子机制,已成为当前TNBC研究的热点问题之一。

目前,对实体肿瘤的治疗视角已逐渐从癌细胞本身逐步拓展至TME。基质是TME中的一部分,指的是除肿瘤细胞外的所有结构性支撑性成分。而在基质占比超90%的乳腺肿瘤中,肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblasts, CAF)是其中最为丰富的成分之一<sup>[9-11]</sup>,其异质性主要来源于不同的细胞起源<sup>[12]</sup>。其中主要转化途径主要依靠大量癌细胞分泌的TGF- $\beta$ 蛋白,诱导正常成纤维细胞(normal fibroblasts, NF)向CAF转化<sup>[13]</sup>。CAF在肿瘤生物学行为中发挥关键作用,包括肿瘤发生、肿瘤生长、能量代谢、肿瘤免疫、血管生成、肿瘤进展、复发和转移<sup>[13-14]</sup>。被激活的CAF能够通过分泌改变细胞外基质(extracellular matrix, ECM)结构的细胞因子及酶类,调控TME形成免疫抑制环境,削弱免疫细胞对ICB疗法的应答<sup>[15-18]</sup>。成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)是一种CAF特异性标志物。在正常组织中FAP通常不表达<sup>[19]</sup>,而在超过90%的上皮性癌<sup>[20]</sup>中显著表

达。FAP具有同时表达二肽基肽酶及内肽酶活性(又称明胶酶活性)的特点<sup>[21]</sup>。已有研究<sup>[22]</sup>表明,FAP通过多种机制影响肿瘤生长,包括增殖、促进侵袭、血管生成和抑制免疫。目前认为FAP可能通过其内肽酶活性分泌因子破坏并重塑ECM促进癌细胞生长和侵袭;还可以独立于酶活性,通过改变细胞内信号通路进而影响细胞周期信号通路和细胞生长促进肿瘤进展<sup>[23]</sup>。在乳腺癌中,FAP高表达,且与较差的总生存期(overall survival, OS)呈正相关<sup>[24]</sup>,并且抑制FAP表达可以减少肿瘤细胞增殖、降低转移率,并改善患者预后<sup>[25-26]</sup>,但其在TNBC免疫微环境中的具体作用及其对ICB疗效的影响仍缺乏系统研究。

本研究基于TCGA和I-SPY2数据,结合体外细胞实验,探讨了FAP表达水平的不同在TNBC中对患者预后、新辅助免疫治疗疗效和免疫微环境的影响。通过生物信息学分析验证FAP高表达与TNBC不良预后的关系,并结合实验探讨FAP高表达CAF在塑造免疫抑制微环境中的作用。此外,研究FAP与胶原蛋白COL1A1的相关性,并分析FAP高低表达对新辅助免疫治疗病理完全缓解(pathological complete response, pCR)率的预测作用。本研究旨在揭示FAP在TNBC进展及免疫治疗应答中的重要作用,为优化TNBC的治疗策略提供潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 数据库分析

**1.1.1 数据来源和处理** 从TCGA数据库下载BRCA转录组(RNA-seq)及对应临床数据,筛选TNBC转录组数据共117例,对应临床信息115例,其中早期患者113例,晚期患者2例;从GEO数据库下载I-SPY2研究数据(GSE194040),筛选TNBC患者转录组及对应临床信息共362例,该试验纳入患者

均为早期患者。

**1.1.2 定义 FAP 表达水平高低组** 首先使用 survminer 包 res.cut 函数对 TCGA-TNBC 数据计算最佳截止值为 FAP 表达量的  $\log_2(\text{TPM}+1)=3.07$ ，以此截止值将 TNBC 患者 ( $n=115$ ) 分为 FAP 高表达组 ( $n=72$ ) 和 FAP 低表达组 ( $n=43$ )；以此截止值所在的全体数据百分比 (37.6%) 在 I-SPY2 数据中划分 FAP 高低组，FAP 高表达组 ( $n=226$ )、FAP 低表达组 ( $n=136$ )。

**1.1.3 生存分析** 利用 survival 包和 survminer 包进行 Kaplan-Meier 生存分析，绘制 FAP 高低表达组的生存曲线。生存差异的统计学检验通过 Log-rank 检验实现，判断 FAP 高低表达对患者生存的影响是否有统计学意义 ( $P<0.05$ )。进一步通过 Cox 比例风险模型评估 FAP 作为独立预后指标的效能，提取 HR 及 95% CI。

**1.1.4 差异表达 (DES) 分析** 使用 DESeq2 包和 TCGA 转录组 counts 数据进行 DES 分析。筛选标准： $|\log_2\text{FC}|>1$ ； $P<0.05$  为差异有统计学意义，校正  $P$  值通过 Benjamini-Hochberg 方法调整。使用 ggplot2 包绘制火山图 (volcano plot) 将差异表达结果可视化，显示上调的基因。

**1.1.5 基因富集分析 (gene set enrichment analysis, GSEA)** 富集分析所用基因集来源于 MSigDB 数据库中的 HALLMARK 基因集。使用 clusterProfiler 包中的 GSEA 函数对差异表达的基因进行 GSEA，计算富集得分 (normalized enrichment score, NES) 和显著性  $P$  值。显著性标准： $\text{NES}>1$ ， $P<0.05$  和校正  $P<0.25$ 。

**1.1.6 免疫细胞浸润分析 (CIBERSORT 分析)** 使用 CIBERSORT 算法计算免疫细胞浸润比例，基于 LM22 基因集 (22 种免疫细胞亚群) 进行去卷积分析。对各组细胞的表达数据进行正态性检验后，为比较 FAP 高低表达组之间各类免疫细胞的浸润水平，使用 wilcox.test 进行统计学检验 ( $P<0.05$ )。

**1.1.7 线性回归分析** 使用 Spearman 相关性分析计算 FAP 与其他基因之间的表达相关性。使用 ggpubr 包绘制相关性散点图，展示 FAP 与目标基因的相关性趋势，并标注相关系数 ( $R$  值) 及显著性水平 ( $P$  值)。

**1.2 实验研究**

**1.2.1 细胞培养和转染分组** 本实验用所有细胞 (CAF 与 CD8<sup>+</sup> T) 均为人源，购自丰晖生物。所有细胞均在含 10% 胎牛血清 (FSP500, ExCellBio) 和

1% 双抗 (青霉素-链霉素溶液 100X, 货号: BL505A, Biosharp) 的 DMEM/F12 培养基 (C11330500 BT, Gibco) 中培养，培养条件为 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度。CAF 细胞基因转染使用 Lipo 汉恒试剂 [HB-LF-1000, 汉恒生物科技 (上海) 有限公司]，按照厂家说明操作。实验所用的 shRNA 和过表达质粒均以产品形式购自丰晖生物。在 CAF 中，用靶向 FAP 的 shRNA (shFAP) 敲低 FAP 表达 (CAF+shFAP 组)，非特异性 shRNA (shNC) 作为阴性敲低对照 (CAF+shNC 组)；用 FAP 过表达质粒 (oe-FAP) 上调 FAP 基因表达 (CAF+oe-FAP 组)，空载体质粒 (oe-NC) 作为阴性过表达对照 (CAF+oe-NC 组)；用无处理的 CAF 为空白对照。CAF 细胞接种于 6 孔板中，培养至细胞密度约为 70%~80% 时进行转染。转染过程将 2 μg 的质粒或 shRNA 与 4 μL 转染试剂 (Lipo 汉恒) 混合，形成复合物后加入无血清培养基中孵育 4~6 h，随后更换为完全培养基。各组细胞培养 48 h 后进行后续实验。

**1.2.2 RNA 提取及 qRT-PCR** 收集各组细胞后，使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。向提取的 RNA 中加入 100 μL 氯仿进行相分层分离，再用等体积的异丙醇沉淀 RNA。接着，用 1 mL 75% 乙醇 (使用 DEPC 水配制) 清洗 RNA 沉淀。最终将 RNA 溶解于 DEPC 水，并通过微量核酸检测仪测定其浓度与纯度。逆转录反应中，使用 RevertAid Reverse Transcriptase (EP0441, Thermo Fisher Scientific)，将 1 μg RNA 与 oligo (dT) 引物 (擎科)、RNase 抑制剂 (E00381, Thermo Fisher Scientific) 和 dNTPs (GD1102, Thermo Fisher Scientific) 混合，按说明书配制反应体系，合成 cDNA。荧光定量 PCR 使用 PerfectStart Green qPCR SuperMix 试剂，反应体系配置于 0.2 mL PCR 八联管中，包含引物和逆转录获得的 cDNA 模板。使用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增反应。每组样品进行 3 次技术重复，最终数据采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 法进行分析。所用引物信息见表 1。

表 1 引物信息表  
Table1 Primer information

基因	引物序列(5'→3')
h-FAP-205	正向:GGT GGA TGG TCG AGG AAC AG
	反向:ACC AGT TCC AGA TGC AAG GG
h-COL1A1-178	正向:GAG AGC ATG ACC GAT GGA TT
	反向:CCT TCT TGA GGT TGC CAG TC
h-GAPDH-168	正向:AGG TCG GAG TCA ACG GAT TT
	反向:TGA CGG TGC CAT GGA ATT TG



**1.2.3 Western blot 分析** 收集各组细胞,使用1 mL生理盐水洗涤后转移至1.5 mL离心管中。加入1 mL裂解液并添加10  $\mu$ L PMSF (100 mm),摇匀后置于冰上。确保PMSF充分溶解无结晶后再与裂解液混合。根据细胞量,每管细胞加入100~500  $\mu$ L含PMSF的裂解液,于冰上裂解30 min。裂解后,4  $^{\circ}$ C下以12 000 r/min离心10 min。离心后的上清液分装至1.5 mL离心管中,用于蛋白定量检测。如不能立即定量蛋白浓度,可将样品存放在-80  $^{\circ}$ C。使用二喹啉甲酸(BCA)法对蛋白进行定量后,依据目的蛋白分子量大小配置分离胶和5%浓缩胶。计算所需的蛋白溶液体积(20~80  $\mu$ g),并用1  $\times$  Loading buffer补至每个加样孔相同体积。电泳时,浓缩胶在80 V下电泳40 min,分离胶在120 V下电泳30~50 min,直至溴酚蓝跑至胶底。完成后,转膜至0.45/0.22  $\mu$ m的聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将膜完全浸泡在5% milk-PBST或5% BSA-PBST中,室温轻摇孵育60 min或在4  $^{\circ}$ C过夜。使用5% BSA-PBST稀释一抗,4  $^{\circ}$ C孵育过夜。次日取出膜,使用PBST洗膜5次,每次6 min。将二抗加入膜上,在室温下孵育60 min。洗膜5次,每次6 min。最后,使用ECL A和B液按1:1比例混合后均匀滴加至膜上,设置适当的曝光时间和类型,进行曝光。曝光结束后保存并导出图片。FAP与COL1A1一抗均购自Abcam公司,以GAPDH作为内参蛋白,使用ImageJ软件对目标蛋白条带的灰度值进行量化分析。

**1.2.4 CD8<sup>+</sup> T细胞活性与凋亡检测** 细胞活性检测:将各组转染后的CAF细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞共培养后,收集对数生长期的细胞消化后,离心去除上清液,重悬细胞并计数。将细胞接种于6孔板中,接种密度为 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔。使用Cell Staining Buffer重悬细胞,将细胞密度调整至 $1 \times 10^7$ 个/mL。每管取100  $\mu$ L的细胞悬液,加入相应的表面标记抗体,混匀后在室温下避光孵育30 min。加入2 mL的Cell Staining Buffer重悬细胞后,2 000 r/min离心5 min,弃去上清液,再加入0.1 mL的Cell Staining Buffer进行重悬。最后,在1 h内使用流式细胞仪进行检测。细胞凋亡检测:使用Transwell小室(Corning;货号3422),将各组转染后的CAF细胞与CD8<sup>+</sup> T细胞共培养48 h后进行乳酸脱氢酶(LDH)检测。根据试剂盒说明书配制LDH检测工作液并立即使用。将样本加入96孔板

中,在室温下避光孵育30 min。使用酶标仪在490 nm波长下测定吸光度,并以600 nm为参考波长进行校正。

### 1.3 临床样本分析

**1.3.1 样本来源与伦理** 本研究共收集了11例2023—2024年间在中南大学湘雅医院乳腺科经病理确诊为TNBC且使用新辅助化疗联合免疫治疗方案患者的术前初诊的穿刺石蜡样本切片。本研究已经过中南大学湘雅临床医学伦理审查委员会批准(伦审号:2024111446),并豁免知情同意书。所有操作严格遵守伦理委员会的要求,确保患者隐私得到保护,并遵循相关的伦理规范进行研究。

**1.3.2 多重免疫荧光(multiplex immunofluorescence, mIHC)** 将石蜡切片在65  $^{\circ}$ C烤片机中烘烤2 h以去除石蜡,随后进行二甲苯脱蜡处理2次,每次10 min。接着,切片依次通过100%、95%、90%、85%乙醇进行脱水,每步3 min,并使用PBS清洗。为修复抗原,切片置于含有pH 8.0的EDTA抗原修复液中,在微波炉中进行中火加热8 min,然后自然冷却,并用PBS清洗。为封闭内源性过氧化氢酶,切片浸泡在3%过氧化氢溶液中15 min,随后用PBS清洗。接下来,滴加正常山羊血清进行封闭30 min,然后加入FAP、CD8和CD4的一抗(1:1 000、1:3 000、1:3 000)于4  $^{\circ}$ C孵育过夜。洗涤后,加入HRP-Polymer二抗,在室温下孵育30 min,再次洗涤。重复上述步骤,使用不同的荧光染料(TYR-570、TYR-520、TYR-650)标记不同的抗原,并进行相应的洗涤处理。最后,使用DAPI染色细胞核,并在荧光显微镜下观察并采集图像。使用的抗体与染料均购自艾方生物:FAP(AF301279)、CD8(AF20211)、CD4(AF20210)一抗,HRP-Polymer二抗。

**1.3.3 病理数据的处理和分析** 病理数字全片扫描(whole slide imaging, WSI)数据的分析在ImageJ中进行。每张切片在10 $\times$ 倍数下随机选取5个不重叠区域,并测量FAP阳性面积(area)、平均荧光强度(mean intensity)及总荧光积分密度(integrated density, intDen)。最终,以每张切片5个区域的平均IntDen值代表该患者的FAP总表达水平,通过计算ROC曲线,获取最佳切点(IntDen=13 696 109.5),并以此将患者分为FAP高表达组( $n=5$ )和FAP低表达组( $n=6$ )。

## 1.4 统计学处理

本研究中所有关于生物信息学的分析均在R语言(v4.2.2)中进行,其详细信息已在方法部分中描述和引用,本研究未生成新的代码或算法。所有关于实验的统计分析均使用GraphPad Prism(v10.1.2)完成,两组间的比较采用 $\chi^2$ 检验或Fisher精确检验(分类变量)以及独立样本 $t$ 检验(连续变量);2个及2个以上样本均数差别的显著性检验采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间差异的比较,若ANOVA结果有统计学意义( $P<0.05$ ),进一步使用Tukey's HSD事后检验对组间进行两两比较,以确定哪些组之间存在差异。

## 2 结果

### 2.1 FAP在TNBC中的表达及其与预后的关系

利用TCGA数据库对TNBC患者中FAP的表达水平进行分析,结果显示FAP在TNBC肿瘤组织中明显高于正常组织(图1A)( $P<0.0001$ )。生存分析表明,FAP高表达患者的OS明显短于FAP低表达患者(图1B)( $P=0.0013$ )。为了进一步明确FAP与TNBC患者预后的关系,分析TCGA队列TNBC患者临床病理特征与预后的关系,单因素Cox回归分析显示,肿瘤分期、N分期和FAP表达

水平与患者OS有关(均 $P<0.05$ );多因素Cox回归分析显示,FAP表达水平是TNBC患者OS的独立影响因素( $P=0.0347$ )(表2)。

### 2.2 FAP高表达TNBC的免疫抑制性微环境

通过GSEA分析探讨FAP高低表达组之间的通路差异,结果显示,在FAP高表达组中显著激活的通路包括上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、TGF- $\beta$ 信号通路、血管生成、IL2-STAT5信号通路和炎症反应等,这些通路肿瘤基质重塑、免疫抑制和肿瘤进展密切相关。与之相反,FAP高表达组中与细胞周期、氧化磷酸化、DNA修复及MYC靶基因相关的通路显著下调(图2A)。接着,继续进行免疫细胞浸润分析发现,FAP表达水平显著影响多种免疫细胞的浸润比例(图2B)。FAP高表达组中CD8<sup>+</sup>T细胞、活化的自然杀伤(NK)细胞以及滤泡辅助性T细胞(Tfh细胞)的浸润比例显著低于FAP低表达组( $P<0.05$ )。随后,进一步对免疫检查点分子的表达水平进行差异分析(图2C),结果表明FAP高表达组的免疫检查点整体呈现更高的表达水平趋势,其中BTLA、VSIR、CD276(B7-H3)、CTLA4、HAVCR2(TIM-3)和PDCD1LG2(PD-L2)在FAP高表达组中上调(均 $P<0.05$ ),尤其是CD276、HAVCR2、PDCD1LG2的差异最为明显( $P<0.001$ )。

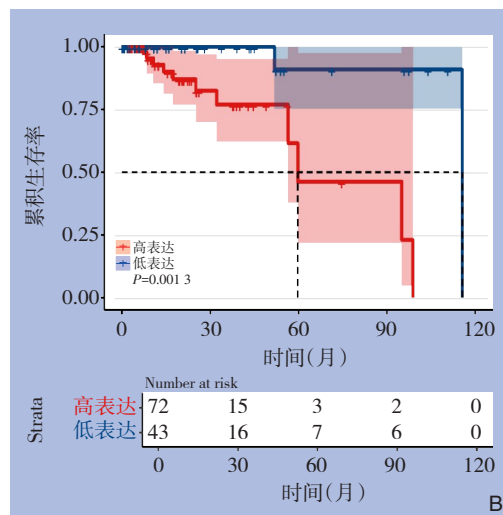
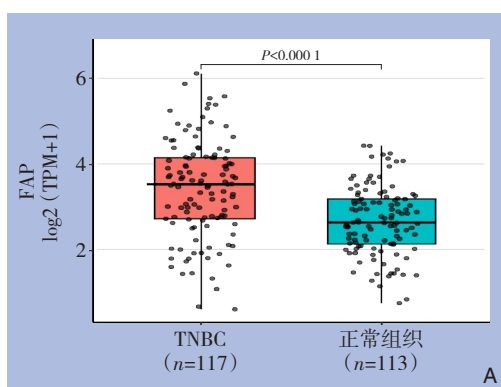


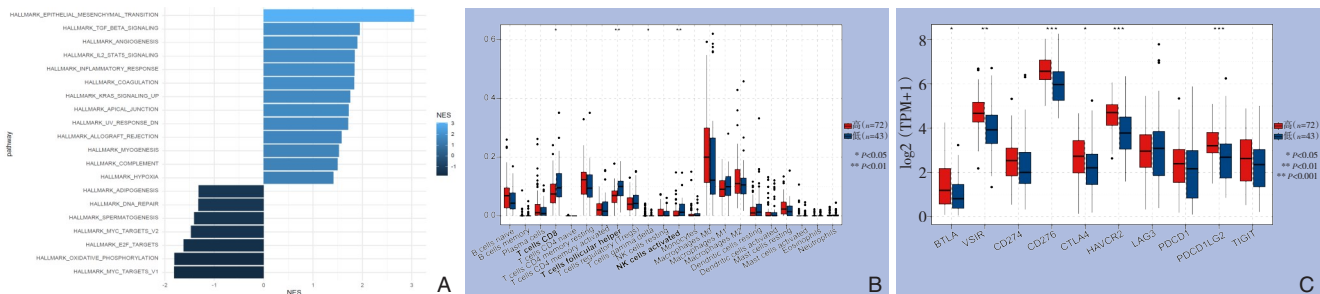
图1 TCGA队列TNBC患者FAP的表达情况及其与预后的关系 A: FAP在TNBC肿瘤组织和瘤旁正常组织中的表达差异; B: TNBC中FAP高表达组( $n=72$ )和低表达组( $n=43$ )患者的生存曲线

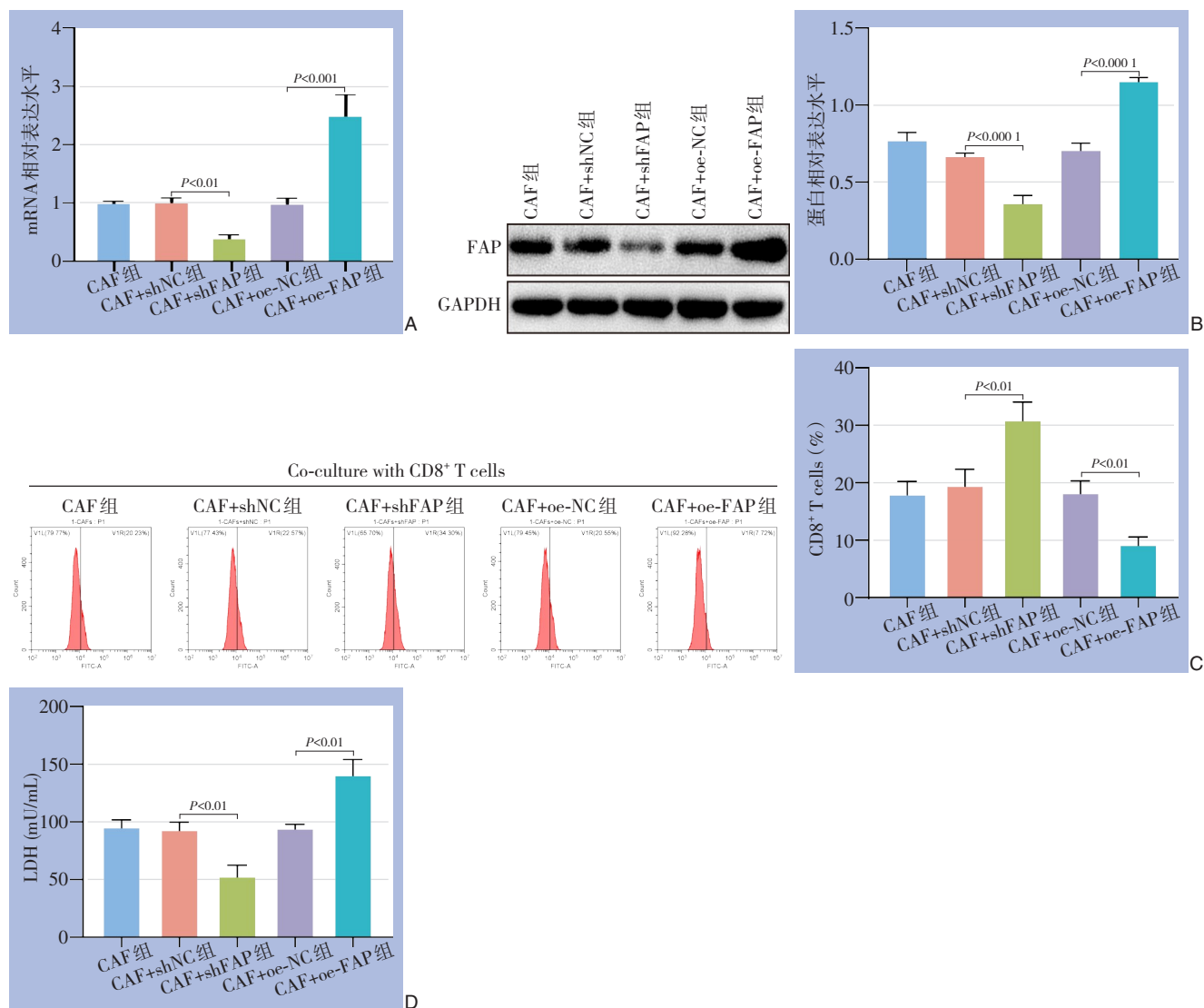
Figure 1 FAP Expression and its prognostic relevance in TNBC patients from the TCGA cohort A: Differential expression of FAP between TNBC tumor tissues and adjacent normal tissues; B: Kaplan-Meier survival curves of patients with high FAP expression ( $n=72$ ) and low FAP expression ( $n=43$ ) in TNBC

表2 TCGA队列TNBC患者预后的单因素和多因素Cox分析

Table 2 Univariate and multivariate Cox regression analysis of prognostic factors in TNBC patients from the TCGA cohort

变量	数值[n(%)]	单因素分析		多因素分析	
		HR(95% CI)	P	HR(95% CI)	P
年龄(岁)					
>50	70(60.87)	0.84(0.267~2.63)	0.763	—	—
≤50	45(39.13)				
肿瘤分期					
I	19(16.52)	3.29(1.48~7.31)	0.003 4	1.09(0.28~4.20)	0.897 4
II	73(63.48)				
III	21(18.26)				
IV	2(1.74)				
T分期					
1	26(22.61)	1.53(0.78~3.01)	0.218	—	—
2	73(63.48)				
3	12(10.43)				
4	4(3.48)				
N分期					
0	74(64.35)	3.09(1.61~5.92)	0.000 672	2.23(0.82~6.61)	0.112 7
1	25(21.74)				
2	12(10.43)				
3	4(3.48)				
M分期					
0	113(98.26)	6.73(0.80~56.4)	0.078 6	—	—
1	2(1.74)				
FAP表达					
高	72(62.61)	0.07(0.009~0.55)	0.011 7	0.10(0.013~0.85)	0.034 7
低	43(37.39)				





**图3 FAP 敲低与过表达 CAF 模型的构建及与 CD8<sup>+</sup> T 细胞共培养** A: FAP mRNA 在 CAF 中的过表达以及敲降效率; B: FAP 蛋白在 CAF 中的过表达以及敲降效率; C: FAP 过表达和敲降后 CD8<sup>+</sup> T 细胞的活性变化; D: FAP 过表达和敲降后 CD8<sup>+</sup> T 细胞的凋亡率变化

**Figure 3 Construction of CAF models with FAP knockdown and overexpression and co-culture with CD8<sup>+</sup> T cells** A: Efficiency of FAP mRNA overexpression and knockdown in CAFs; B: Efficiency of FAP protein overexpression and knockdown in CAFs; C: Changes in CD8<sup>+</sup> T cell activity after FAP overexpression or knockdown; D: Changes in CD8<sup>+</sup> T cell apoptosis rate after FAP overexpression or knockdown

## 2.4 FAP 对胶原蛋白的表达与调控

首先在 TCGA-TNBC 转录组数据中进行 FAP 高、低表达分组的差异分析,结果显示,在 TNBC 中, FAP 高表达组中多个胶原蛋白相关基因(如 COL1A1、COL10A1、COL12A1 等)明显上调(校正  $P < 0.05$ ,  $\log_2 \text{FC} > 1$ )(图 4A)。进一步对这些基因在 TNBC 患者肿瘤组织与非瘤组织中的表达量进行分析,发现这些胶原蛋白相关基因均在 TNBC 组织中高表达(图 4B),且与 FAP 表达呈明显正相关性(图 4C)。为了进一步探讨 FAP 对一型胶原的调

控作用,通过 qRT-PCR 和 Western blot 验证 FAP 对 COL1A1 蛋白水平的影响,结果表明, FAP 过表达组 COL1A1 的 mRNA 与蛋白表达均明显上调,而 FAP 敲低组 COL1A1 的 mRNA 与蛋白表达均明显下调(均  $P < 0.05$ )(图 4D-E)。

## 2.5 FAP 高、低表达与 TNBC 新辅助免疫治疗 pCR 率的关系

基于 I-SPY2 研究数据将 TNBC 患者划分为 FAP 高表达组以及 FAP 低表达组。探讨 FAP 表达与不同治疗策略下患者 pCR 率的关系(图 5A)。结果显



示,在接受ganitumab (IGF-1R单抗)治疗的患者中,FAP高、低表达组的pCR率存在明显差异( $P=0.0279$ )。进一步对单独接受紫杉醇化疗的患者(ctr组)与接受紫杉醇联合帕博利珠单抗(pembrolizumab)治疗的患者(Pembro组)进行分析(图5B)。结果发现,无论在FAP高表达组还是低表达组,Pembro组的pCR率均明显高于ctr组,特别是在FAP低表达组中,Pembro组的治疗效果尤为显著(FAP高表达组, $P=0.0243$ ;FAP低表达组, $P=7.344921e-06$ )。

## 2.6 FAP作为TNBC免疫治疗潜在预测因子的临床意义

在11例临床病例中,7例达到了pCR,4例未达到病理完全缓解(non-pCR)。为评估FAP表达水

平在TNBC患者新辅助治疗反应中的预测价值,绘制ROC曲线,曲线下面积为0.857(图6A),表明FAP的表达能够较好地地区分pCR与非pCR患者。根据ROC曲线的最佳截断点,将患者分为FAP高表达组( $n=5$ )和FAP低表达组( $n=6$ )。mIHC染色结果显示,在FAP高表达组中,CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润较FAP低表达组减少(图6B)。FAP荧光强度分析结果显示,FAP高表达组(H)中FAP荧光强度明显高于低表达组(L),且差异具有统计学意义( $P=0.0306$ )(图6C)。进一步分析FAP表达水平与pCR的关系,结果显示,FAP高表达组的pCR率显著低于低表达组( $P=0.0152$ )(图6D)。

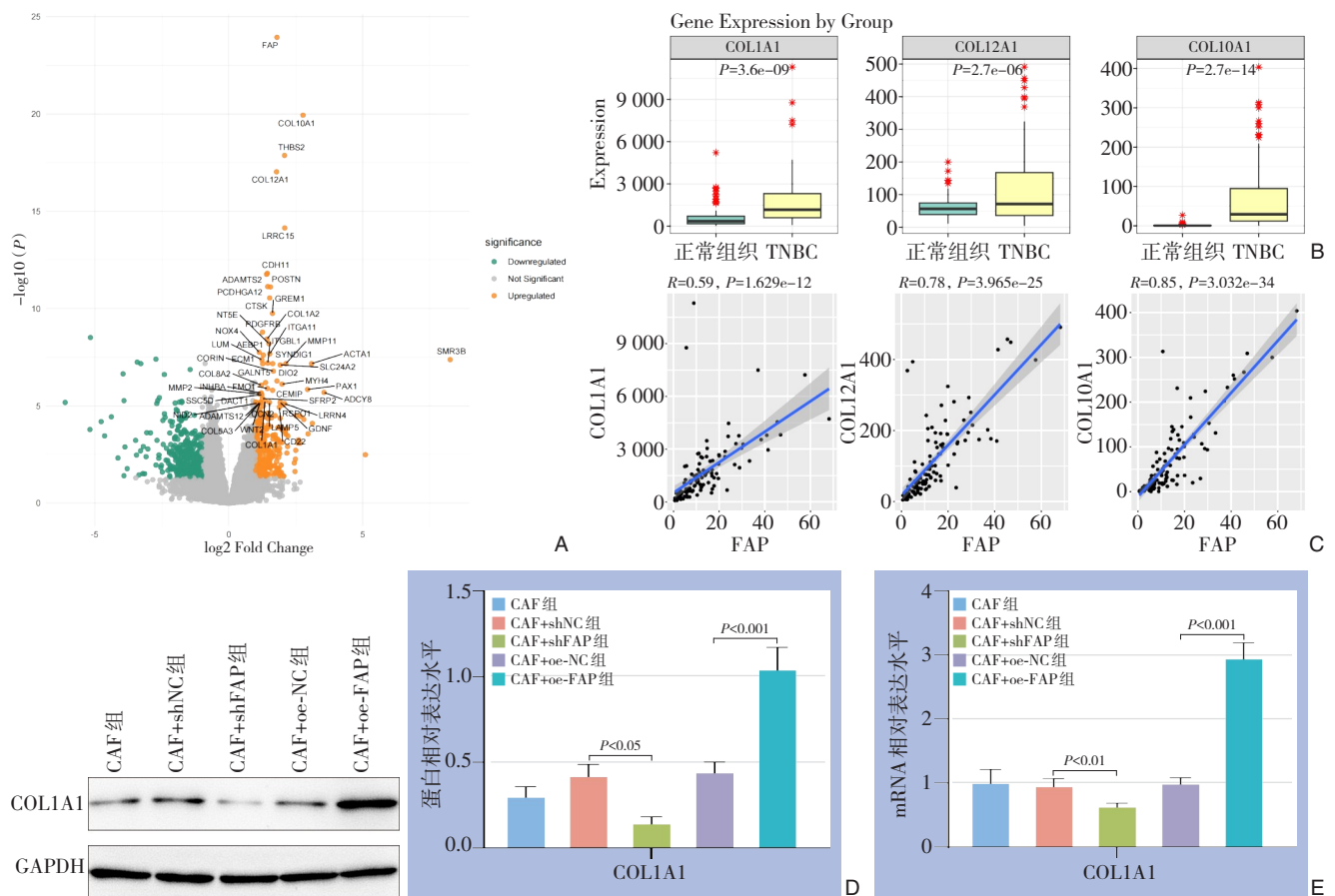


图4 FAP表达对胶原蛋白基因的影响 A: 转录组学差异分析显示FAP高表达时前50个显著上调基因; B: COL1A1、COL12A1、COL10A1在TNBC与非瘤组织间的表达差异; C: COL1A1、COL12A1、COL10A1在TNBC中与FAP表达的相关性; D: FAP过表达和敲低CAF对COL1A1蛋白表达的影响; E: FAP过表达和敲低CAF对COL1A1 mRNA表达的影响

Figure 4 Effect of FAP expression on collagen-related gene expression A: Top 50 significantly upregulated genes in the FAP high-expression group identified by transcriptomic differential expression analysis; B: Expression differences of COL1A1, COL12A1, and COL10A1 between TNBC tumor tissues and non-tumor tissues; C: Correlation between FAP expression and COL1A1, COL12A1, and COL10A1 in TNBC; D: Effects of FAP overexpression and knockdown in CAFs on COL1A1 mRNA expression; E: Effects of FAP overexpression and knockdown in CAFs on COL1A1 protein expression

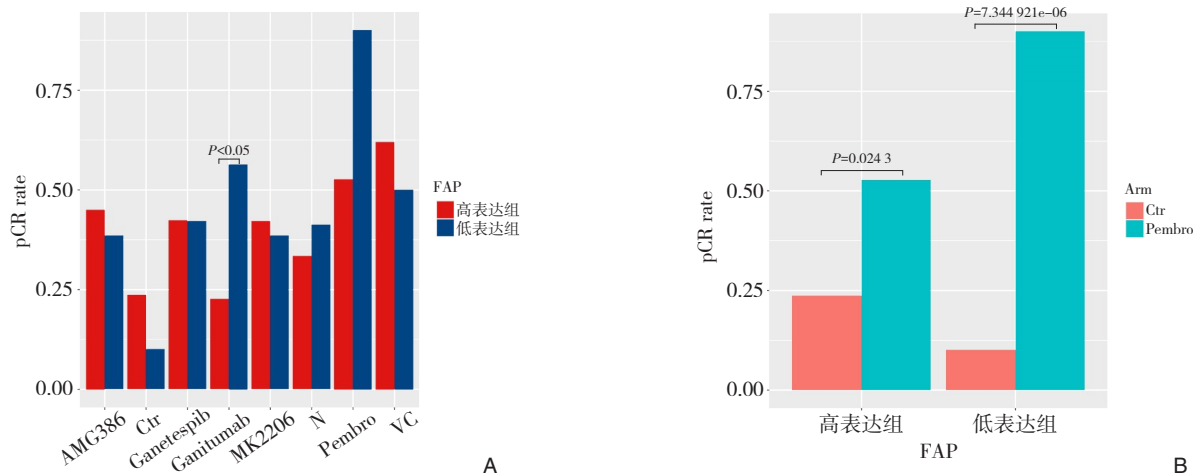


图5 I-SPY2 临床试验数据中 FAP 表达高低与 TNBC 新辅助治疗疗效的关系 A: 各治疗组中 FAP 高、低表达间的 pCR 率差异; B: 在 FAP 高、低表达组中 Ctr 组和 Pembro 组间的 pCR 率差异

Figure 5 Association between FAP expression levels and neoadjuvant treatment response in TNBC from the I-SPY2 clinical trial data A: Differences in pCR rates between high and low FAP expression groups across different treatment arms; B: Comparison of pCR rates between the Ctr and Pembro groups within the high and low FAP expression subgroups

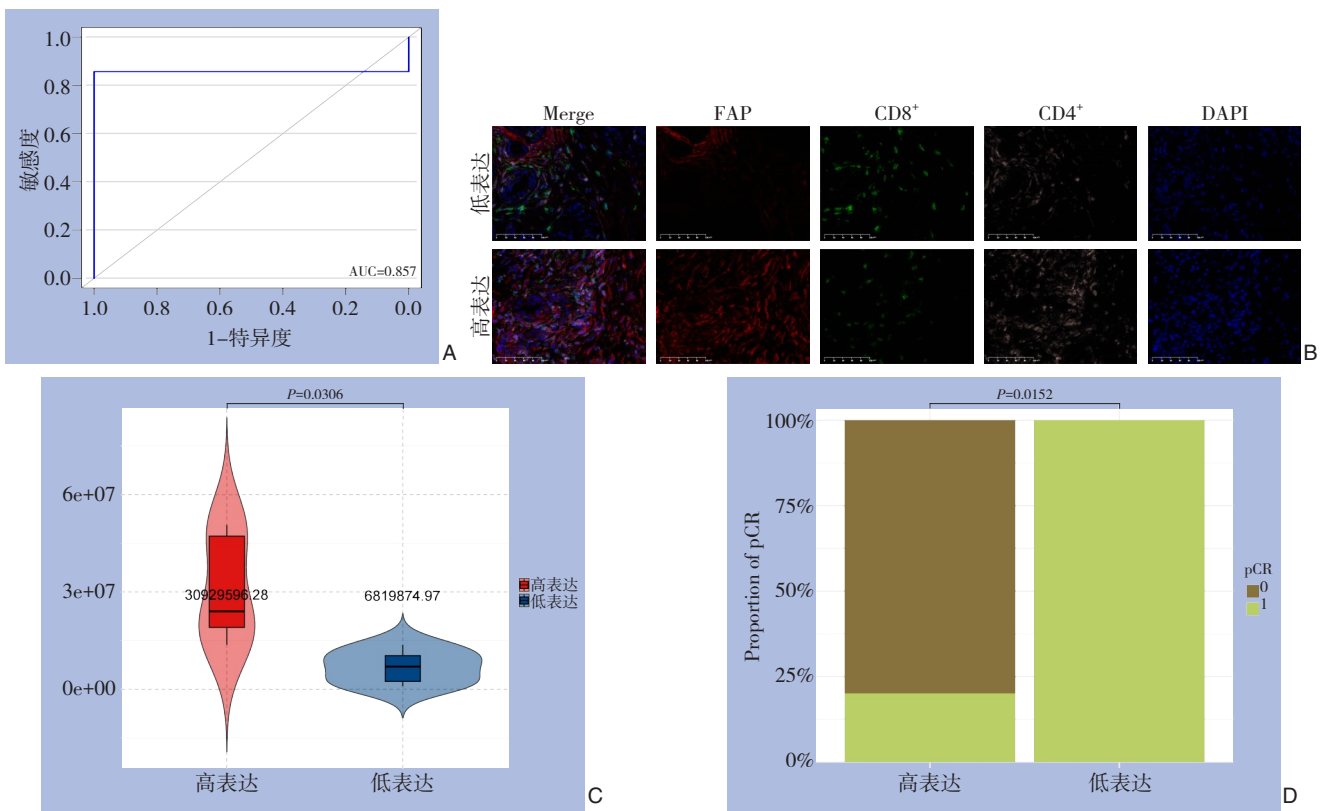


图6 FAP 表达水平对 TNBC 患者新辅助治疗疗效的预测价值 A: 评估 FAP 表达水平对 TNBC 患者新辅助治疗 pCR 的预测能力的 ROC 曲线; B: FAP 高低表达组的 mIHC 病理特征; C: FAP 高、低表达组的 FAP 平均 IntDen 差异; D: FAP 高、低表达组的 pCR 率差异

Figure 6 Predictive value of FAP expression levels for neoadjuvant treatment response in TNBC patients A: ROC curve evaluating the predictive ability of FAP expression levels for pCR in TNBC patients receiving neoadjuvant therapy; B: mIHC pathological features of the high and low FAP expression groups; C: Differences in mean IntDen of FAP between high and low expression groups; D: Differences in pCR rates between the high and low FAP expression groups

### 3 讨论

TNBC因其高度异质性和缺乏靶向治疗手段,整体预后较差。近年来,越来越多的研究关注TME在TNBC进展及治疗反应中的作用,特别是CAF在免疫逃逸中的重要性。CAF不仅通过分泌细胞因子重塑TME,还能调控免疫细胞功能,削弱抗肿瘤免疫反应。其中,FAP作为CAF的特征性标志物,在多种恶性肿瘤中被发现与免疫抑制密切相关。然而,目前针对FAP在TNBC中的具体作用机制及其对免疫治疗反应的影响仍缺乏系统研究。本研究通过整合临床数据、生物信息学分析及实验验证,深入探讨了FAP在TNBC中的生物学功能,重点分析其在免疫微环境中的作用及其对免疫治疗的影响。

本研究显示,FAP在TNBC肿瘤组织中的表达显著高于非瘤组织,且高表达患者的OS更短。既往研究表明,FAP在多种实体瘤(包括乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌等)中均与不良预后相关<sup>[27]</sup>,其高表达的CAF可能通过影响ECM重塑、细胞内信号传导、血管生成、EMT和免疫抑制等机制,推动肿瘤进展和转移<sup>[26]</sup>,进而增加患者的死亡风险。此外,GSEA分析进一步支持了这一观点,FAP高表达组中多条肿瘤促进通路(如TGF- $\beta$ 信号通路、EMT、血管生成)显著上调,这为肿瘤细胞的转移与侵袭提供了支持。已有研究<sup>[28]</sup>表明,FAP阳性CAF与乳腺癌细胞共培养时,癌细胞的迁移能力增强,并诱导EMT。这一过程使恶性上皮细胞获得间质表型,从而增强了肿瘤转移所需的迁移和侵袭能力<sup>[29]</sup>。另外,FAP还通过减少乳腺癌细胞对外源生长因子的依赖,促进癌细胞的异常生长并增加微血管密度;抑制FAP表达可促进细胞聚集并减少血管生成<sup>[30-31]</sup>。因此,FAP的高表达可能强化这些作用,导致EMT及血管生成通路上调,从而增加癌细胞侵袭性和肿瘤的血供,影响患者预后。

FAP在TME中的作用不仅体现在促进肿瘤细胞的侵袭性还通过抑制免疫细胞浸润、增强免疫逃逸以及调控ECM重塑,共同维持免疫抑制微环境。

首先,TGF- $\beta$ 信号通路在FAP阳性CAF的活化及免疫抑制微环境的形成中发挥核心作用。TGF- $\beta$ 可诱导NF向CAF转化,并促进FAP的高表达,而FAP的高表达反过来增强TGF- $\beta$ 信号的活性,形成持续性的正反馈环路<sup>[13]</sup>。CAF介导的TGF- $\beta$ 信号通

路不仅促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭<sup>[32]</sup>,还通过多种机制削弱抗肿瘤免疫反应,加剧肿瘤的免疫抑制状态。免疫细胞浸润分析进一步支持了这一机制:FAP高表达组中与有利的抗肿瘤免疫反应相关的CD8<sup>+</sup>T细胞、NK细胞以及T<sub>H</sub>细胞显著减少<sup>[33]</sup>。已有研究<sup>[34]</sup>表明,TGF- $\beta$ 是肿瘤内T细胞排斥的主要原因之一。TGF- $\beta$ 的基因特征与TME中的免疫抑制密切相关,它不仅促进CD8<sup>+</sup>T细胞在肿瘤内部的排斥,还导致T细胞被包裹在富含胶原蛋白的肿瘤周围基质中,从而限制其对肿瘤细胞的识别和攻击<sup>[34]</sup>。另外,FAP阳性CAF还能通过抑制树突状细胞的分化和成熟,阻碍T细胞向细胞毒性T细胞的转化,并降低主要组织相容性复合物(MHC)抗原的表达,进一步削弱抗肿瘤免疫反应<sup>[35]</sup>。基于此,笔者推测,靶向FAP以打破TGF- $\beta$ /CAF/FAP正反馈环路,可能是改善TNBC免疫抑制微环境的关键策略。本实验进一步验证了这一假设,FAP过表达的CAF显著降低CD8<sup>+</sup>T细胞的活性,并促进其凋亡;而敲低FAP的CAF则增强了CD8<sup>+</sup>T细胞的活性,减少其凋亡。这些结果表明,FAP过表达CAF通过促进TGF- $\beta$ 信号、抑制免疫细胞功能和增强免疫逃逸,共同塑造了TNBC的免疫抑制微环境。

其次,FAP的高表达伴随免疫检查点分子CD276(B7-H3)和TIM-3的显著上调,进一步加剧免疫抑制。TIM-3作为负调节检查点分子,其上调与T细胞耗竭和先天免疫反应抑制有关<sup>[36]</sup>。而CD276不仅能够抑制T细胞的增殖和活化<sup>[37-38]</sup>,其高表达还可通过促进IL-10和TGF- $\beta$ 1的分泌,抑制NK细胞活性,从而减弱NK细胞介导的细胞杀伤作用<sup>[39]</sup>,形成免疫抑制微环境<sup>[40]</sup>,并且与乳腺癌的不良预后和复发密切相关<sup>[41-42]</sup>。另外,在头颈鳞状细胞癌(HNSCC)中发现,CD276的表达与CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润呈负相关,阻断CD276可显著增加CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润,而CD8<sup>+</sup>T细胞的耗竭则削弱了CD276阻断的抗肿瘤免疫效果<sup>[43]</sup>。这些结果表明,相关免疫检查点的上调可能是造成TME中抗肿瘤免疫细胞浸润减少的重要原因之一,并且再次强调了TGF- $\beta$ /CAF/FAP正反馈环路在免疫抑制微环境中的重要性。有研究<sup>[44]</sup>表明,对于当前免疫治疗方案中出现适应性抵抗的患者,靶向新兴免疫检查点并结合抗PD-1/PD-L1治疗可能有助于改善临床治疗效果,克服免疫耐药性。或许,针对



CD276的阻断治疗与抗PD-1/PD-L1治疗的联合应用,未来能够提高FAP高表达TNBC患者的免疫治疗效果,改善患者预后。

此外,FAP通过调控ECM成分重塑TME,进一步阻碍免疫细胞浸润。胶原蛋白I作为ECM中的重要结构蛋白,是FAP的已知底物之一,可以被FAP裂解<sup>[45]</sup>。而COL1A1是I型胶原的主要成分。本研究发现,FAP高表达组中COL1A1显著上调,且在TNBC中高表达,并与FAP呈显著正相关。这与之前的研究<sup>[46]</sup>一致。COL1A1蛋白主要由CAF分泌和沉积<sup>[47-48]</sup>,而本研究结果首次表明FAP表达直接影响CAF对COL1A1的分泌,FAP过表达CAF COL1A1的表达显著增多。COL1A1通过与整合素的 $\beta 1$ 亚基结合来激活粘着斑激酶(FAK)<sup>[49]</sup>。磷酸化FAK促进E-钙黏蛋白/连环蛋白复合物的分解,这是EMT的重要标志。因此,FAP过表达CAF可能通过促进COL1A1的表达促进EMT进程,增加肿瘤侵袭性。在FAP对ECM胶原蛋白的降解与合成的动态平衡中,FAP不仅通过其蛋白酶活性降解胶原蛋白I,构建促肿瘤的ECM环境;还可能通过增强COL1A1的表达来重塑ECM结构,进而促进肿瘤进展。此外,COL1A1的上调还可能通过形成机械屏障限制免疫细胞的浸润,这进一步支持了FAP在TME中的多重作用。

I-SPY2临床试验数据显示,在接受ganitumab(IGF-1R单抗)治疗的TNBC患者中,FAP低表达组的pCR率显著高于高表达组,提示FAP可能是IGF-1R单抗治疗TNBC疗效的潜在预测因子。已有研究表明,IGF-I可以通过PI3K/Akt通路阻断TGF- $\beta$ 诱导的细胞凋亡<sup>[50]</sup>,从而促进肿瘤细胞存活。ganitumab可通过阻断IGF-I和IGF-II与IGF-1R的结合抑制下游信号通路,从而增强TGF- $\beta$ 诱导的细胞凋亡效应,增强抗肿瘤效果。然而,在FAP高表达组,TGF- $\beta$ 信号通路的持续激活,CAF表型和免疫抑制状态被进一步强化,从而削弱了ganitumab所产生的抗肿瘤效果。相比之下,FAP低表达组的患者TME具有较低的免疫抑制状态,使其对治疗的免疫响应更敏感,从而显著提高pCR率。此外,无论FAP表达水平如何,加用帕博利珠单抗均能显著提高pCR率。这种ICB通过激活T细胞功能增强抗肿瘤免疫反应,尤其在FAP低表达组中,其疗效尤为显著。这说明FAP可以通过影响信号通路及其调控的TME进而改变患者对免疫治疗的敏

感度。随后,在湘雅临床病理数据中,再次证明了FAP高低表达是TNBC患者新辅助免疫治疗疗效的预测指标,并且观察到FAP高表达TNBC患者的TME中CD8<sup>+</sup>T细胞浸润减少,而这也是免疫治疗效果不佳的主要原因之一<sup>[43]</sup>。这一现象可能与FAP阳性CAF在TME中介导的免疫抑制作用有关。本研究已表明FAP低表达或靶向敲低FAP在CAF上的表达可以显著提高CD8<sup>+</sup>T细胞的浸润和活性,并抑制其凋亡。这证明FAP表达水平不仅可以作为TNBC患者生存预后的独立预测指标,还可能作为其接受免疫治疗时的分层依据。在FAP高表达患者中,联合靶向FAP和TGF- $\beta$ 的疗法可能进一步提升治疗效果。

综上所述,本研究通过分析FAP在TNBC中的表达特征,首次揭示了FAP高表达与TME的免疫抑制特征之间的密切关系。FAP高表达通过TGF- $\beta$ /FAP正反馈环路促进CAF活化,增强免疫检查点分子表达,降低CD8<sup>+</sup>T细胞浸润,并通过ECM重塑强化物理屏障,最终形成免疫抑制性微环境。另外,本研究首次证明了FAP在CAF上的表达直接调控CD8<sup>+</sup>T细胞的活性与凋亡以及COL1A1的表达与分泌。这些机制的协同作用解释了FAP高表达TNBC患者的较差预后和新辅助治疗疗效,并提示靶向FAP及其相关通路可能是改善TNBC免疫治疗效果的重要策略。

尽管本研究揭示了FAP高表达在TNBC中的潜在作用,尤其是其对TME和新辅助治疗效果的影响,但仍存在一些局限性。首先,本研究主要依赖生物信息学分析、体外实验和临床样本,未能在动物模型中验证FAP作为预测因子的独立性及其临床应用价值。因此,未来的研究应通过临床前动物模型进一步验证,评估FAP作为预后标志物及新辅助治疗疗效预测因子的实际应用潜力。其次,尽管本研究阐述了部分FAP高表达CAF免疫抑制性微环境的形成机制,但其中如何调控CD8<sup>+</sup>T细胞活性与凋亡的机制并不明确。最后,鉴于FAP在多种肿瘤类型中作为免疫抑制和预后不良的标志物,针对FAP的治疗策略无疑将是研究的一个重要方向。针对FAP的靶向治疗可能成为改善TNBC免疫微环境的有效策略。结合ICB(如PD-1/PD-L1抗体)和FAP靶向治疗的联合治疗方案,有望提高TNBC患者的免疫治疗反应和生存率。此外,基于FAP高表达的免疫逃逸机制,未



来希望设计更精准的治疗策略,以期在临床上取得更好的治疗效果。

作者贡献声明:李梦茜参与实验实施、数据分析、作图、文稿撰写;张克兢参与实验设计、研究指导、论文审阅、经费支持;夏凡参与实验设计、研究指导、论文审阅。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## 参考文献

- [1] Ginsburg O, Bray F, Coleman MP, et al. The global burden of women's cancers: a grand challenge in global health[J]. *Lancet*, 2017, 389(10071):847–860. doi:10.1016/S0140-6736(16)31392-7.
- [2] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3):209–249. doi:10.3322/caac.21660.
- [3] Leon-Ferre RA, Goetz MP. Advances in systemic therapies for triple negative breast cancer[J]. *BMJ*, 2023, 381: e071674. doi:10.1136/bmj-2022-071674.
- [4] Pang K, Shi ZD, Wei LY, et al. Research progress of therapeutic effects and drug resistance of immunotherapy based on PD-1/PD-L1 blockade[J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 66:100907. doi:10.1016/j.drug.2022.100907.
- [5] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance[J]. *Nature*, 2014, 515(7528):568–571. doi:10.1038/nature13954.
- [6] Gogishvili M, Melkadze T, Makharadze T, et al. Cemiplimab plus chemotherapy versus chemotherapy alone in non-small cell lung cancer: a randomized, controlled, double-blind phase 3 trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(11):2374–2380. doi:10.1038/s41591-022-01977-y.
- [7] Luke JJ, Rutkowski P, Queirolo P, et al. Pembrolizumab versus placebo as adjuvant therapy in completely resected stage IIB or IIC melanoma (KEYNOTE-716): a randomised, double-blind, phase 3 trial[J]. *Lancet*, 2022, 399(10336):1718–1729. doi:10.1016/S0140-6736(22)00562-1.
- [8] Voorwerk L, Slagter M, Horlings HM, et al. Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial[J]. *Nat Med*, 2019, 25(6):920–928. doi:10.1038/s41591-019-0432-4.
- [9] Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(9):582–598. doi:10.1038/nrc.2016.73.
- [10] Costa A, Scholer-Dahirel A, Mechta-Grigoriou F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment[J]. *Semin Cancer Biol*, 2014, 25: 23–32. doi:10.1016/j.semcancer.2013.12.007.
- [11] Toullec A, Gerald D, Despouy G, et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading[J]. *EMBO Mol Med*, 2010, 2(6):211–230. doi:10.1002/emmm.201000073.
- [12] Kanzaki R, Pietras K. Heterogeneity of cancer-associated fibroblasts: opportunities for precision medicine[J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(8):2708–2717. doi:10.1111/cas.14537.
- [13] Wu F, Yang J, Liu J, et al. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1):218. doi:10.1038/s41392-021-00641-0.
- [14] Zhang HY, Deng T, Liu R, et al. CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1):43. doi:10.1186/s12943-020-01168-8.
- [15] Galbo PM Jr, Zang XX, Zheng DY. Molecular features of cancer-associated fibroblast subtypes and their implication on cancer pathogenesis, prognosis, and immunotherapy resistance[J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(9):2636–2647. doi:10.1158/1078-0432.ccr-20-4226.
- [16] Dominguez CX, Müller S, Keerthivasan S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals stromal evolution into LRRC15+ myofibroblasts as a determinant of patient response to cancer immunotherapy[J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(2): 232–253. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0644.
- [17] Zhu GQ, Tang Z, Huang R, et al. CD36<sup>+</sup> cancer-associated fibroblasts provide immunosuppressive microenvironment for hepatocellular carcinoma via secretion of macrophage migration inhibitory factor[J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 25. doi:10.1038/s41421-023-00529-z.
- [18] Chen Y, Kim J, Yang SJ, et al. Type I collagen deletion in  $\alpha$ SMA+ myofibroblasts augments immune suppression and accelerates progression of pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2021, 39(4):548–565.e6. doi:10.1016/j.ccell.2021.02.007.
- [19] Fitzgerald AA, Weiner LM. The role of fibroblast activation protein in health and malignancy[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2020, 39(3): 783–803. doi:10.1007/s10555-020-09909-3.
- [20] Garin-Chesa P, Old LJ, Rettig WJ. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(18):7235–7239. doi:10.1073/pnas.87.18.7235.
- [21] Aertgeerts K, Levin I, Shi LH, et al. Structural and kinetic analysis of the substrate specificity of human fibroblast activation protein alpha[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(20):19441–19444. doi:10.1074/jbc.C500092200.
- [22] Puré E, Lo A. Can targeting stroma pave the way to enhanced

- antitumor immunity and immunotherapy of solid tumors? [J]. *Cancer Immunol Res*, 2016, 4(4):269–278. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0011.
- [23] Shahvali S, Rahiman N, Jaafari MR, et al. Targeting fibroblast activation protein (FAP): advances in CAR-T cell, antibody, and vaccine in cancer immunotherapy[J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2023, 13(7):2041–2056. doi:10.1007/s13346-023-01308-9.
- [24] Tchou J, Zhang PJ, Bi YT, et al. Fibroblast activation protein expression by stromal cells and tumor-associated macrophages in human breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(11):2549–2557. doi:10.1016/j.humpath.2013.06.016.
- [25] Huang Y, Simms AE, Mazur A, et al. Fibroblast activation protein- $\alpha$  promotes tumor growth and invasion of breast cancer cells through non-enzymatic functions[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(6):567–579. doi:10.1007/s10585-011-9392-x.
- [26] Xin L, Gao JF, Zheng ZL, et al. Fibroblast activation protein- $\alpha$  as a target in the bench-to-bedside diagnosis and treatment of tumors: a narrative review[J]. *Front Oncol*, 2021, 11:648187. doi:10.3389/fonc.2021.648187.
- [27] Busek P, Mateu R, Zubal M, et al. Targeting fibroblast activation protein in cancer-Prospects and caveats[J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2018, 23(10):1933–1968. doi:10.2741/4682.
- [28] Gao MQ, Kim BG, Kang S, et al. Stromal fibroblasts from the interface zone of human breast carcinomas induce an epithelial-mesenchymal transition-like state in breast cancer cells in vitro[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 20):3507–3514. doi:10.1242/jcs.072900.
- [29] Suarez-Carmona M, Lesage J, Cataldo D, et al. EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(7):805–823. doi:10.1002/1878-0261.12095.
- [30] Goodman JD, Rozypal TL, Kelly T. Seprase, a membrane-bound protease, alleviates the serum growth requirement of human breast cancer cells[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2003, 20(5):459–470. doi:10.1023/a:1025493605850.
- [31] Huang Y, Wang S, Kelly T. Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(8):2712–2716. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3184.
- [32] Shi X, Young CD, Zhou H, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signaling in fibrotic diseases and cancer-associated fibroblasts[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(12):1666. doi:10.3390/biom10121666.
- [33] Hendry S, Salgado R, Gevaert T, et al. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the international immuno-oncology biomarkers working group: part 1: assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research[J]. *Adv Anat Pathol*, 2017, 24(5):235–251. doi:10.1097/PAP.0000000000000162.
- [34] Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, et al. TGF $\beta$  attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells[J]. *Nature*, 2018, 554(7693):544–548. doi:10.1038/nature25501.
- [35] Chen LL, Qiu XT, Wang XH, et al. FAP positive fibroblasts induce immune checkpoint blockade resistance in colorectal cancer via promoting immunosuppression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 487(1):8–14. doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.039.
- [36] Das M, Zhu C, Kuchroo VK. Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity[J]. *Immunol Rev*, 2017, 276(1):97–111. doi:10.1111/imr.12520.
- [37] Suh WK, Gajewska BU, Okada H, et al. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(9):899–906. doi:10.1038/ni967.
- [38] Loos M, Hedderich DM, Friess H, et al. B7-h3 and its role in antitumor immunity[J]. *Clin Dev Immunol*, 2010, 2010:683875. doi:10.1155/2010/683875.
- [39] Lee CC, Ho KH, Huang TW, et al. A regulatory loop among CD276, miR-29c-3p, and Myc exists in cancer cells against natural killer cell cytotoxicity[J]. *Life Sci*, 2021, 277:119438. doi:10.1016/j.lfs.2021.119438.
- [40] Han S, Wang Y, Shi XJ, et al. Negative roles of B7-H3 and B7-H4 in the microenvironment of cervical cancer[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1):222–230. doi:10.1016/j.yexcr.2018.08.014.
- [41] Arigami T, Narita N, Mizuno R, et al. B7-h3 ligand expression by primary breast cancer and associated with regional nodal metastasis[J]. *Ann Surg*, 2010, 252(6):1044–1051. doi:10.1097/SLA.0b013e3181f1939d.
- [42] Maeda N, Yoshimura K, Yamamoto S, et al. Expression of B7-H3, a potential factor of tumor immune evasion in combination with the number of regulatory T cells, affects against recurrence-free survival in breast cancer patients[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(Suppl 4):S546–S554. doi:10.1245/s10434-014-3564-2.
- [43] Wang C, Li Y, Jia LF, et al. CD276 expression enables squamous cell carcinoma stem cells to evade immune surveillance[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(9):1597–1613. doi:10.1016/j.stem.2021.04.011.
- [44] Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, et al. Coinhibitory pathways in immunotherapy for cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2016, 34:539–573. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112049.
- [45] Bou-Gharios G, Abraham D, de Crombrughe B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation[A]//Bilezikian JP, Martin TJ,

- Clemens TL, et al. Principles of Bone Biology (Fourth Edition)[M]. PressAcademic, 2020:295–337. doi:10.1016/B978-0-12-814841-9.00013-0.
- [46] Li X, Sun X, Kan C, et al. COL1A1 A novel oncogenic gene and therapeutic target in malignancies[J]. Pathol Res Pract, 2022, 236: 154013. doi:10.1016/j.prp.2022.154013.
- [47] Piersma B, Hayward MK, Weaver VM. Fibrosis and cancer: a strained relationship[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(2):188356. doi:10.1016/j.bbcan.2020.188356.
- [48] Li M, Wang J, Wang C, et al. Microenvironment remodeled by tumor and stromal cells elevates fibroblast-derived COL1A1 and facilitates ovarian cancer metastasis[J]. Exp Cell Res, 2020, 394(1): 112153. doi:10.1016/j.yexcr.2020.112153.
- [49] Imamichi Y, Menke A. Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(1/2/3): 180–190. doi:10.1159/000101319.
- [50] Chen RH, Su YH, Chuang RL, et al. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway[J]. Oncogene, 1998, 17(15):1959–1968. doi:10.1038/sj.onc.1202111.
- ( 本文编辑 熊杨 )
- 本文引用格式:**李梦茜, 张克兢, 夏凡. FAP介导的肿瘤相关成纤维细胞功能在三阴性乳腺癌免疫微环境及治疗应答中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2025, 34(5): 963–977. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.250023

**Cite this article as:** Li MX, Zhang KJ, Xia F. Role of FAP-mediated cancer-associated fibroblast function in the immune microenvironment and therapeutic response of triple-negative breast cancer[J]. Chin J Gen Surg, 2025, 34(5): 963–977. doi: 10.7659/j. issn. 1005-6947.250023

## 关于一稿两投和一稿两用问题处理的声明

本刊编辑部发现仍有个别作者一稿两投和一稿两用, 为了维护本刊的声誉和广大读者的利益, 本刊就一稿两投和一稿两用问题的处理声明如下。

1. 一稿两投和一稿两用的认定: 凡属原始研究的报告, 同语种一式两份投寄不同的杂志, 或主要数据和图表相同、只是文字表述可能存在某些不同之处的两篇文稿, 分别投寄不同的杂志, 属一稿两投; 一经为两杂志刊用, 则为一稿两用。会议纪要、疾病的诊断标准和防治指南、有关组织达成的共识性文件、新闻报道类文稿分别投寄不同的杂志, 以及在一种杂志发表过摘要而将全文投向另一杂志, 不属一稿两投。但作者若要重复投稿, 应向有关杂志编辑部作出说明。

2. 作者在接到收稿回执后满3个月未接到退稿通知, 表明稿件仍在处理中, 若欲投他刊, 应先与本刊编辑部联系。

3. 编辑部认为文稿有一稿两投或两用嫌疑时, 应认真收集有关资料并仔细核对后再通知作者, 在作出处理决定前请作者就此问题作出解释。编辑部与作者双方意见发生分歧时, 由上级主管部门或有关权威机构进行最后仲裁。

4. 一稿两投一经证实, 则立即退稿, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2年内将拒绝在本刊发表; 一稿两用一经证实, 将择期在杂志中刊出作者姓名、单位以及该论文系重复发表的通告, 对该作者作为第一作者所撰写的论文, 2年内拒绝在本刊杂志发表。本刊将就此事向作者所在单位和该领域内的其他科技期刊进行通报。

中国普通外科杂志编辑部