

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1,2,张克兢1,2,夏凡1,2

[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*T细胞共培养,检测其对CD8*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+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+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* 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* 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 triplenegative breast cancer

LI Mengxi^{1,2}, ZHANG Kejing^{1,2}, XIA Fan^{1,2}

- [1. Department of General Surgery (Breast Surgery), Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 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⁺ T cells to evaluate FAP's regulatory effects on CD8⁺ 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+ 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+ 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+ 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⁺ 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[1-2], 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^[3]。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[4]。临床研 究[5-7] 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[8]。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[9-11], 其异质性主要来源于 不同的细胞起源[12]。其中主要转化途径主要依靠 大量癌细胞分泌的TGF-β蛋白,诱导正常成纤维 细胞 (normal fibroblasts, NF) 向 CAF 转化[13]。 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[13-14]。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[15-18]。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[19], 而在超过90%的上皮性癌[20]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[21]。已有研究^[22]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^[23]。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^[24],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^[25-26],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 $\log 2$ (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: llog2FCl>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: 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+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% CO₂、 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 gRT-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^{-ΔΔCT}法进行分析。所用引物信息见表1。

表 1 引物信息表 Table 1 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 μL 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 μL 含 PMSF 的裂解液,于冰上裂解 30 min。裂解后, 4 ℃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℃。 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 μg), 并用1× 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 µm 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℃过夜。使用5% BSA-PBST稀释一抗,4℃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ECLA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⁺ 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+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 5×10^5 个细胞/孔。使用Cell Staining Buffer 重悬细胞,将细胞密度调整至1× 10⁷个/mL。每管取 100 μL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, 2000 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1h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+ 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 ℃烤片机中烘烤2h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℃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 χ^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

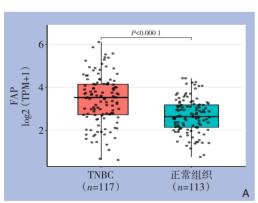
2.1 FAP在TNBC中的表达及其与预后的关系

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<0.000 1)。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=0.001 3)。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 = 0.034 7) (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 (epithelialmesenchymal transition, EMT)、TGF-β信号通路、 血管生成、IL2-STAT5信号通路和炎症反应等,这 些通路与肿瘤基质重塑、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+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)。



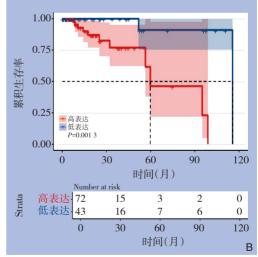


图1 TCGA **队列** TNBC **患者** FAP **的表达情况及其与预后的关系** A: FAP 在 TNBC 肿瘤组织和瘤旁正常组织中的表达差异; B: TNBC 中 FAP 高表达组(n=72)和低表达组(n=43)患者的生存曲线

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)		0.763		
肿瘤分期					
I	19(16.52)				
II	73(63.48)	3.29(1.48~7.31)	0.002.4	1.09(0.28~4.20)	0.897 4
III	21(18.26)		0.003 4		
IV	2(1.74)				
T分期					
1	26(22.61)				
2	73(63.48)	1.53(0.78~3.01)	0.218	_	_
3	12(10.43)				
4	4(3.48)				
N分期					
0	74(64.35)				
1	25(21.74)	3.09(1.61~5.92)	0.000 672	2.23(0.82~6.61)	0.112 7
2	12(10.43)				
3	4(3.48)				
M分期					
0	113(98.26)	6.73(0.80~56.4)	0.070 (
1	2(1.74)		0.078 6	_	
FAP表达					
高	72(62.61)	0.07(0.009~0.55)	0.044.5	0.40(0.040.0.05)	0.004 =
低	43(37.39)		0.011 7	0.10(0.013~0.85)	0.034 7

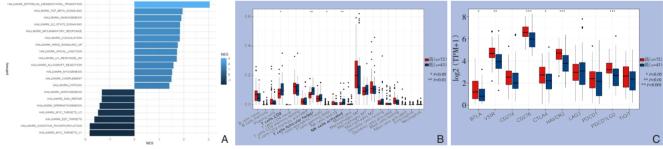


图2 FAP表达与TME的关系 A: FAP高低表达分组的通路GSEA分析; B: FAP高表达组和低表达组之间免疫细胞浸润 亚群的差异; C: FAP高表达组和低表达组之间检查点基因表达的差异

Figure 2 Association between FAP expression and the TME A: GSEA of signaling pathways in high *vs.* low FAP expression groups; B: Differences in immune cell infiltration subpopulations between high and low FAP expression groups; C: Differential expression of immune checkpoint genes between high and low FAP expression group

2.3 FAP表达与CD8+T细胞的活性及凋亡的关系

qRT-PCR与Western blot结果显示,与空白对照组 CAF细胞比较,CAF+shFAP组 CAF细胞FAP的mRNA与蛋白表达均明显降低,CAF+oeFAP组CAF细胞FAP的mRNA与蛋白表达均明显升高(均P<0.05),而各自的阴性对照组(CAF+shNC组、CAF+oeNC组)细胞FAP的mRNA与蛋白表达无明

显变化(均P>0.05)(图 3A-B)。将以上不同处理组的 CAF与 $CD8^+$ T 细胞共培养后结果显示,与 FAP 过表达 CAF 共培养的 $CD8^+$ T 细胞活性降低、凋亡率升高,而与 FAP 敲降 CAF 共培养的 $CD8^+$ T 细胞活性增加、凋亡率降低(均P<0.05)(图 3C-D)。

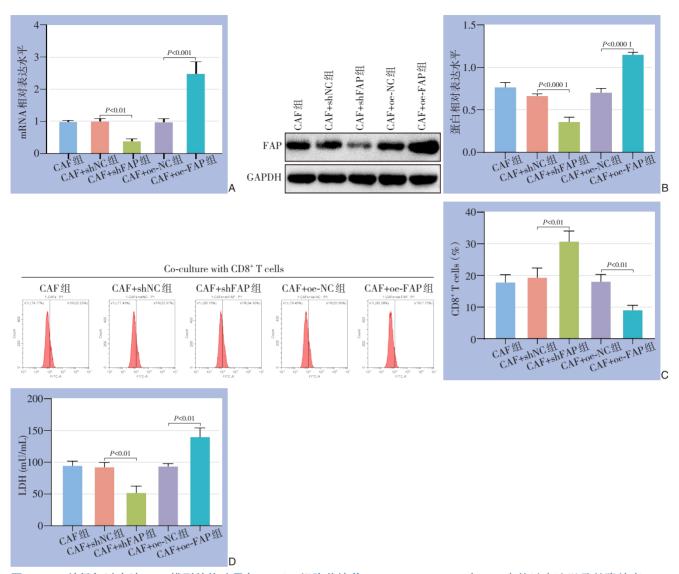


图3 FAP 敲低与过表达 CAF 模型的构建及与 CD8⁺ T 细胞共培养 A: FAP mRNA 在 CAF 中的过表达以及敲降效率; B: FAP蛋白在 CAF 中的过表达以及敲降效率; C: FAP过表达和敲降后 CD8⁺ T 细胞的活性变化; D: FAP 过表达和敲降后 CD8⁺ T 细胞的凋亡率变化

Figure 3 Construction of CAF models with FAP knockdown and overexpression and co-culture with CD8⁺ T cells

Efficiency of FAP mRNA overexpression and knockdown in CAFs; B: Efficiency of FAP protein overexpression and knockdown in CAFs; C: Changes in CD8⁺ T cell activity after FAP overexpression or knockdown; D: Changes in CD8⁺ 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,llog2FCl>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=0.027 9)。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=0.024 3;FAP 低表达组,P=7.344 921e-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 的表达能够较好地区分 pCR 与 non-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+ 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=0.030 6)(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=0.015 2)(图 6D)。

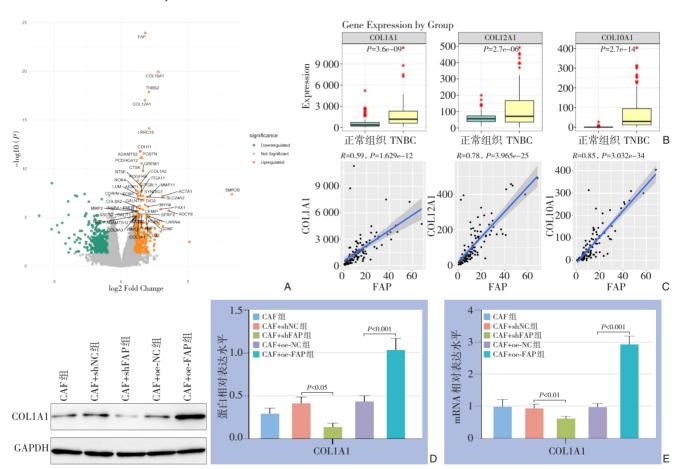


图4 FAP表达对胶原蛋白基因的影响 A: 转录组学差异分析显示 FAP高表达时前50个显著上调基因; B: COL1A1、COL12A1、COL10A1在TNBC与非瘤组织间的表达差异; C: COL1A1、COL12A1、COL10A1在TNBC中与FAP表达的相关性; D: FAP过表达和敲低 CAF对 COL1A1蛋白表达的影响; E: FAP过表达和敲低 CAF对 COL1A1 mRNA表达的影响

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

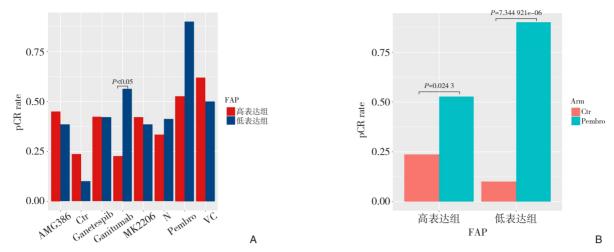


图5 I-SPY2 **临床试验数据中** FAP **表达高低与** TNBC **新辅助治疗疗效的关系** A:各治疗组中 FAP 高、低表达间的 pCR 率差 异;B:在 FAP 高、低表达组中 Ctr组和 Pembro 组间的 pCR 率差异

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

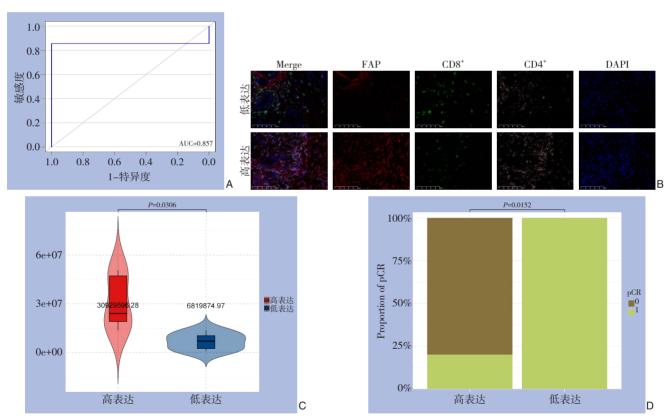


图6 FAP表达水平对TNBC患者新辅助治疗疗效的预测价值 A:评估FAP表达水平对TNBC患者新辅助治疗pCR的预测能力的ROC曲线;B:FAP高低表达组的mIHC病理特征;C:FAP高、低表达组的FAP平均IntDen差异;D:FAP高、低表达组的pCR率差异

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[27],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[26],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-B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[28]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^[29]。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[30-31]。因此, FAP的高表达可能强 化这些作用,导致EMT及血管生成通路的上调,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-β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-β 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-β信号的活性,形成 持续性的正反馈环路^[13]。CAF 介导的 TGF-β信号通 路不仅促进癌细胞的增殖、迁移和侵袭[32],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+T细胞、NK细胞以及 Tfh细胞显著减 少[33]。已有研究[34]表明, TGF-β 是肿瘤内T细胞排 斥的主要原因之一。TGF-β的基因特征与TME中 的免疫抑制密切相关,它不仅促进CD8+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[34]。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^[35]。基于此, 笔者推测, 靶向 FAP 以打破 TGF-β/ 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+T细胞的活 性,并促进其凋亡;而敲低 FAP 的 CAF 则增强了 CD8+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-β 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[36]。而 CD276不仅能够抑制 T 细胞的增殖和活化[37-38], 其 高表达还可通过促进IL-10和TGF-β1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[39],形成免疫抑制微环境[40],并且与乳腺癌的 不良预后和复发密切相关[41-42]。另外,在头颈鳞状 细胞癌(HNSCC)中发现, CD276的表达与 CD8+ T细胞的浸润呈负相关,阻断 CD276 可显著 增加CD8+T细胞的浸润,而CD8+T细胞的耗竭则 削弱了CD276阻断的抗肿瘤免疫效果[43]。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-β/CAF/FAP正反馈环路在免疫抑制 微环境中的重要性。有研究[44]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^[45]。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[46]一致。COL1A1蛋白主要由CAF分 泌和沉积[47-48], 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 β1亚基结合来激活粘着斑激酶 (FAK) [49]。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-β 诱导的细胞凋亡[50],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-β 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-β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+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^[43]。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+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-β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-β/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+ 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+ 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+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. drup.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 cancerassociated 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⁺ 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 αSMA+ 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- α 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-α 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 epithelialmesenchymal 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-β 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 immunooncology 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.000000000000162.
- [34] Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, et al. TGFβ 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 antitumor 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 Crombrugghe 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 collageninduced disruption of the E-cadherin complex during epithelialmesenchymal 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。本刊将就此事件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