

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.003

· 基础研究 ·

靶向FAP的CAR-T细胞通过重塑肿瘤微环境抑制乳腺癌生长的临床前研究

王海镭^{1,2,3}, 曲格希^{1,2,3}, 孙齐仟钰^{1,2,3}, 刘丹^{1,2,3}, 李思瑾^{1,2,3}, 施明^{1,2,3} (1. 徐州医科大学 细胞治疗药物产业学院, 江苏徐州 221004; 2. 徐州医科大学附属医院 临床肿瘤中心, 江苏徐州 221002; 3. 江苏省肿瘤生物治疗协同创新中心, 江苏徐州 221121)

[摘要] **目的:** 开发靶向成纤维细胞活化蛋白(FAP)的CAR-T细胞, 评价其通过重塑肿瘤微环境(TME)抑制乳腺癌生长的能力。**方法:** 将识别FAP不同抗原表位的纳米抗体VHH1和VHH2串联, 设计两种胞外识别区排列顺序不同的FAP-CAR1(VHH1-Linker-VHH2)和FAP-CAR2(VHH2-Linker-VHH1), 构建以二价FAP抗体为胞外识别域的CAR, 将其分别克隆至逆转录病毒载体并完成病毒包装。分离小鼠淋巴细胞, 经抗CD3/CD28抗体激活后进行转导, 制备FAP-CAR1-T和FAP-CAR2-T细胞。通过实时无标记动态细胞分析(RTCA)、流式细胞术(FCM)评估FAP-CAR-T细胞的靶向杀伤活性, ELISA检测其激活后IL-2分泌水平。分别用FAP-CAR1-T细胞(FAP-CAR-T组)、HER2-CAR-T细胞(HER2-CAR-T组)及未转导T细胞(Mock-T组)治疗4T1-HER2荷瘤小鼠, 分析FAP-CAR-T对肿瘤生长的抑制作用, 并通过免疫组织化学(IHC)检测肿瘤组织中T细胞浸润情况。进一步通过转录组分析差异表达基因。**结果:** FAP-CAR1-T与FAP-CAR2-T细胞体外扩增稳定, CAR阳性率>60%。两者均能特异、高效杀伤过表达鼠源FAP的小鼠成纤维细胞NIH3T3-mFAP, 且FAP-CAR1-T细胞在扩增和分泌IL-2方面优于FAP-CAR2-T细胞, 因此选用FAP-CAR1-T细胞进行后续体内实验。在小鼠4T1-HER2皮下移植瘤模型中, FAP-CAR-T治疗组小鼠肿瘤生长速度显著低于Mock-T组($P < 0.05$), 与HER2-CAR-T组肿瘤生长速度相当($P > 0.05$); 与Mock-T组相比, FAP-CAR-T治疗组小鼠肿瘤组织中CD3⁺T细胞浸润增加, 胶原沉积面积减少($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$)。转录组分析结果显示, FAP-CAR-T组相较Mock-T组的差异表达基因富集于细胞外基质、免疫应答等GO条目及ECM-受体相互作用等KEGG通路。**结论:** FAP-CAR-T细胞通过特异性靶向FAP相关基质细胞, 重塑肿瘤微环境, 显著抑制乳腺癌生长, 且在肿瘤体积控制上与HER2-CAR-T细胞相比无统计学差异。

[关键词] 乳腺癌; 成纤维细胞活化蛋白; CAR-T细胞; 单域抗体; 肿瘤微环境

[中图分类号] R737.9; R730.21 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2026)06-0611-08

Preclinical evaluation of FAP-targeted CAR-T cells that inhibit breast cancer growth by remodeling the tumor microenvironment

WANG Hairong^{1,2,3}, QU Gexi^{1,2,3}, SUN Qiqianyu^{1,2,3}, LIU Dan^{1,2,3}, LI Sijin^{1,2,3}, SHI Ming^{1,2,3} (1. Cellular Therapeutics School of Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, Jiangsu, China; 2. Center of Clinical Oncology, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China; 3. Jiangsu Center for the Collaboration and Innovation of Cancer Biotherapy, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221121, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To develop CAR-T cells targeting fibroblast activation protein (FAP) expressed by cancer-associated fibroblasts (CAFs) and evaluate their ability to inhibit breast cancer growth by remodeling the tumor microenvironment (TME), providing a new candidate strategy for breast cancer CAR-T cell therapy. **Methods:** Nanobodies VHH1 and VHH2, which recognize distinct antigenic epitopes of FAP, were linked in tandem to generate a bivalent FAP antibody and to construct two CARs with different extracellular domain arrangements: FAP-CAR1 (VHH1-Linker-VHH2) and FAP-CAR2 (VHH2-Linker-VHH1). The resulting CAR constructs, containing the bivalent FAP antibody as the extracellular antigen-recognition domain, were individually cloned into retroviral vectors and packaged into viral particles. Murine lymphocytes were isolated and activated with anti-CD3/CD28 antibodies, followed by transduction to generate FAP-CAR1-T and FAP-CAR2-T cells. Targeted cytotoxicity of FAP-CAR-T cells was evaluated using real-time label-free dynamic cell analysis (RTCA) and flow cytometry (FCM), and IL-2 secretion was measured by ELISA. In a mouse 4T1-HER2 subcutaneous tumor model, the inhibitory effects of FAP-CAR-T, HER2-CAR-T, and untransduced T cells (Mock-T) on tumor

[基金项目] 国家自然科学基金(82403846, 82471378)

[作者简介] 王海镭, 女, 硕士生

[通信作者] 施明; 李思瑾(扫码获取作者通信方式)



growth were compared. Immunohistochemistry (IHC) was used to assess T cell infiltration in tumor tissues, and RNA sequencing was performed to analyze differentially expressed genes. **Results:** FAP-CAR1-T and FAP-CAR2-T cells expanded stably *in vitro*, with CAR positivity exceeding 60%. Both CAR-T cells specifically and efficiently killed NIH3T3 cells overexpressing mouse FAP (NIH3T3-mFAP), with FAP-CAR1-T showing superior expansion and IL-2 secretion compared to FAP-CAR2-T. Based on these results, FAP-CAR1-T was selected for subsequent *in vivo* experiments. In the 4T1-HER2 subcutaneous tumor model, FAP-CAR-T treatment significantly slowed tumor growth compared to the Mock-T group ($P < 0.05$), with no significant difference compared to the HER2-CAR-T group ($P > 0.05$). Compared to the Mock-T group, FAP-CAR-T treatment increased CD3⁺ T cell infiltration and reduced collagen deposition areas in tumor tissues. Transcriptomic analysis revealed that differentially expressed genes in the FAP-CAR-T group, compared to the Mock-T group ($|\log_2FC| \geq 1$, $P < 0.05$), were primarily enriched in pathways related to extracellular matrix remodeling, immune response, and ECM-receptor interaction. **Conclusion:** FAP-CAR-T cells specifically target FAP-expressing stromal cells, remodel the tumor microenvironment, and significantly inhibit breast cancer growth. In terms of tumor volume control, FAP-CAR-T cells did not differ significantly from HER2-CAR-T cells, suggesting their potential as a candidate CAR-T approach for breast cancer.

[Key words] breast cancer; fibroblast activation protein (FAP); CAR-T cell; single-domain antibody; tumor microenvironment (TME)

[Chin J Cancer Biother, 2026, 33(6): 611-618. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2026.06.003]

以HER2为靶点的CAR-T细胞疗法在乳腺癌治疗中已展现出显著潜力,相关临床研究证实其具有良好的安全性和抗肿瘤活性^[1]。HER2-CAR-T中所采用的单链抗体可变区(single-chain variable fragment, scFv)多来源于曲妥珠单抗,该药物作为首个获批的HER2靶向单克隆抗体,其安全性与疗效已在多年临床实践中得到充分验证^[2-3]。然而,与血液系统恶性肿瘤相比,CAR-T细胞在实体瘤中的治疗效果仍受到多重限制。肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)中由肿瘤相关成纤维细胞(cancer-associated fibroblast, CAF)构成的致密基质屏障,是阻碍CAR-T细胞浸润并导致其功能耗竭的重要因素之一^[4]。CAF作为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的主要来源细胞,通过高表达成纤维细胞活化蛋白(fibroblast activation protein, FAP)促进基质重塑和免疫抑制性微环境形成,营造“冷肿瘤”状态,从而削弱免疫效应细胞的浸润与杀伤功能^[5]。FAP在多种实体瘤(如乳腺癌、胰腺癌等)CAF中呈高度特异性表达,而在大多数正常组织中为低水平表达或不表达^[6],因此被视为靶向CAF的理想治疗靶点。本研究利用自主研发的羊驼来源的FAP纳米抗体VHH1和VHH2,构建了由二者组成的二价纳米抗体作为CAR胞外抗原识别结构域^[7],分别获得两种构型的FAP-CAR1-T细胞(VHH1-Linker-VHH2)和FAP-CAR2-T细胞(VHH2-Linker-VHH1),并从体外杀伤活性、体内抗肿瘤效应及对肿瘤微环境改变的转录组学特征等方面,系统评价FAP-CAR-T疗法的应用潜力,为乳腺癌CAR-T治疗提供理论基础与转化依据。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞及主要试剂

雌性,6~8周龄,18~22 g的SPF级BALB/c小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司[生产许可证编号:SCXK(苏)2023-0009],饲养于徐州医科大学实验动物中心[实验动物使用许可证:SYXK(苏)2020-0048]。小鼠饲养于12 h光照/12 h黑暗循环条件下,温度为20~26 °C、相对湿度为40%~70%。动物实验流程符合动物福利伦理要求,经徐州医科大学伦理委员会批准(审批号:202308T025)。

小鼠成纤维细胞NIH3T3购自美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)细胞库,稳定过表达小鼠FAP及GFP的NIH3T3-mFAP细胞由本实验室构建并保存,稳定过表达人HER2的小鼠乳腺癌细胞4T1-HER2由本实验室保存。DMEM培养基购自以色列Biological Industries公司,新生牛血清购自南京生航生物技术有限公司。RPMI 1640培养基、重组小鼠IL-2、IL-7和IL-15,以及小鼠CD28抗体、小鼠CD3 ϵ 抗体均购自美国Biolegend公司。抗FAP抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 FAP-CAR质粒构建

本研究构建两种FAP-CAR,胞外识别区为FAP纳米抗体VHH1和VHH2,二者通过Linker前后串联。两种FAP-CAR胞外识别区排列顺序不同,分别命名为FAP-CAR1(VHH1-Linker-VHH2)与FAP-CAR2(VHH2-Linker-VHH1)。同时,采用小鼠CD28作为铰链/跨膜区及共刺激结构域,并以小鼠CD3 ζ 作为胞内信号转导结构域,通过T2A与RQR8相连(图1A)。

1.3 CAR-T细胞制备及增殖监测

取处于对数生长期的293T细胞,以 6×10^6 个/皿接种于10 cm培养皿中,培养过夜。待细胞汇合度达70%~80%时,将CAR质粒及辅助质粒pCL-Eco共转

染293T细胞,转染6 h后更换新鲜DMEM完全培养基。继续培养,于48 h和72 h分别收集培养上清液,经0.45 μm 滤膜过滤去除细胞碎片,即得CAR逆转录病毒液。颈椎脱臼处死小鼠后,取小鼠腹股沟及肠系膜淋巴结,于40 μm 滤网上轻柔研磨成单细胞悬液,300 $\times g$ 离心5 min后弃上清液,以T细胞培养基重悬细胞并计数,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL(后续将该未感染逆转录病毒的T细胞命名为Mock-T组)。将细胞以 1×10^6 个/孔接种于48孔板,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h后,将各孔细胞均匀分成3孔,补足培养基至500 μL 。将FAP-CAR1和FAP-CAR2逆转录病毒液按不同体积加入各孔细胞悬液中,在30 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 $\times g$ 条件下离心感染2 h,感染结束后,将细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱继续培养。48 h后300 $\times g$ 离心5 min,弃上清液、收集CAR-T细胞,并更换新鲜培养基。分别于病毒感染2、3、4、5 d进行细胞计数,记录CAR-T细胞扩增倍数。

1.4 流式细胞术检测CAR-T细胞阳性率

在CAR病毒感染T细胞后第2天进行细胞计数,各取 1×10^5 个细胞置于1.5 mL离心管中,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、300 $\times g$ 离心5 min,弃上清液后,向沉淀中加入50 μL anti-Linker-PE抗体,冰上避光处理30 min。经洗涤、离心弃上清液后,用200 μL PBS重悬并转移至流式管中,采用流式细胞术检测Linker阳性细胞的占比,作为CAR阳性率。

1.5 实时无标记动态细胞分析(real-time label-free dynamic cell analysis, RTCA)检测FAP-CAR-T细胞体外杀伤活性

将NIH3T3及NIH3T3-mFAP细胞分别按 6×10^3 个/孔接种于RTCA专用细胞培养板中,置于培养箱内培养约18 h,使用实时无标记细胞分析仪记录细胞贴壁与增殖的基础阻抗曲线。随后分别按效靶比(E:T)=2:1和1:1向NIH3T3或NIH3T3-mFAP细胞中加入FAP-CAR-T细胞,同步设置相同效靶比的Mock-T对照组,继续培养72 h,实时监测细胞指数变化,以反映剩余靶细胞的存活数量,评估FAP-CAR-T细胞对不同靶细胞的杀伤效果。

1.6 基于GFP荧光信号的FAP-CAR-T细胞体外杀伤活性检测

将过表达小鼠FAP及GFP的NIH3T3-mFAP细胞按 5×10^4 个/孔接种于96孔黑色板中,待细胞贴壁后分别按照效靶比(E:T)=1:1和1:3加入FAP-CAR-T细胞,同步设置相同效靶比的Mock-T对照组,于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养24 h和48 h。终止培养后,酶标仪检测各孔剩余靶细胞的GFP荧光信号强度。按照公式“靶细胞存活率=(CAR-T细胞共培养组信号强度/

Mock-T共培养组信号强度) $\times 100\%$ ”,计算靶细胞存活率,反映FAP-CAR-T细胞体外杀伤活性。

1.7 4T1-HER2细胞小鼠皮下移植瘤模型构建

将 2×10^5 个4T1-HER2肿瘤细胞悬浮于100 μL PBS中,经皮下注射至BALB/c小鼠右肋腹建立移植瘤模型。当肿瘤体积达80 mm^3 时,视为造模成功。小鼠皮下移植瘤模型经腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide, CTX)进行预处理,剂量为150 mg/kg,以清除快速增殖的淋巴细胞,为后续CAR-T细胞输注创造免疫空间。采用随机盲法将小鼠分为3组($n=7$),分别命名为FAP-CAR-T、HER2-CAR-T和Mock-T组,24 h后按照分组将 5×10^6 个对应细胞经尾静脉注射给药。治疗期间每3 d以游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),并记录小鼠体重,肿瘤体积(V)按照公式 $V=(a \times b^2)/2$ 计算。

1.8 免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)染色法检测小鼠肿瘤组织中T细胞浸润及FAP表达

取小鼠肿瘤组织,经4%多聚甲醛固定、石蜡包埋后切片,进行抗原修复、封闭,分别加入CD3抗体或FAP抗体4 $^{\circ}\text{C}$ 处理过夜,次日加入HRP标记二抗,室温处理1 h,滴加DAB显色液,经苏木精复染、梯度脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片。显微镜下观察特异性棕黄色染色,并采集图像,采用ImageJ软件对图片进行定量分析。

1.9 Masson染色法检测小鼠肿瘤组织纤维化程度

经颈椎脱臼处死小鼠后完整剥离皮下移植瘤组织,置于4%多聚甲醛溶液中固定24 h。组织依次经梯度乙醇,二甲苯透明处理,石蜡包埋,制备4 μm 厚连续切片。切片脱蜡至水后,首先以苏木精染核5 min,盐酸酒精分化,氨水返蓝。随后使用丽春红酸性复红染液染色8 min,以磷钼酸溶液处理5 min进行分化,最后直接置入苯胺蓝染液染色5 min,再以弱酸乙醇溶液漂洗。染色结束后,切片依次经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每组随机选取5个非重叠视野采集图像,通过光学显微镜观察胶原纤维(蓝绿色)与细胞(红色)的分布特征,ImageJ软件定量分析胶原纤维占比,评估组织纤维化程度。

1.10 RNA测序(RNA sequencing, RNA-seq)检测FAP-CAR-T治疗相关基因及信号通路

取FAP-CAR-T及Mock-T组荷瘤小鼠肿瘤组织,提取总RNA并构建文库,进行高通量RNA-seq测序(由杭州联川生物技术股份有限公司Illumina NovaSeq X plus PE150平台检测)。对测序数据质控后,使用STAR软件进行参考基因组比对并获得基因表达矩阵,采用DESeq2进行差异表达分析。计算FAP-CAR-T组相对于Mock-T组的基因表达倍数变

化,以对数倍数变化(logarithmic fold change, $\log_2FC$)表示,并行多重检验校正获得校正 P 值即错误发现率(false discovery rate, FDR)。定义 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $FDR < 0.05$ 为显著上调基因, $\log_2FC \leq -1$ 且 $FDR < 0.05$ 为显著下调基因。将差异表达基因用于后续GO及KEGG通路富集分析,挖掘与FAP-CAR-T治疗相关的关键生物学过程和信号通路。

1.11 统计学处理

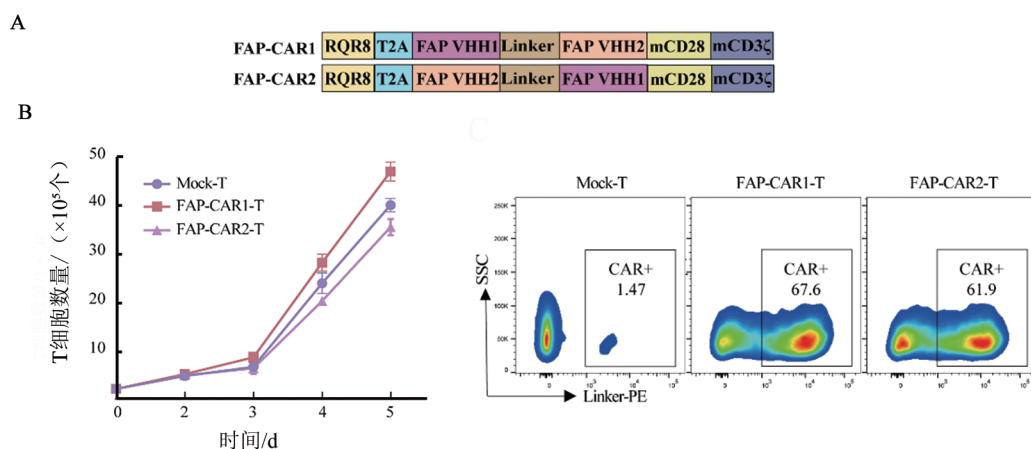
所有实验均至少独立重复3次。流式细胞术数据采用FlowJo V10.8.1软件分析,图像及统计图由GraphPad Prism 9.5软件绘制。两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 FAP-CAR1-T和FAP-CAR2-T细胞的构建

按图1A所示CAR结构构建FAP-CAR1和FAP-CAR2质粒,并包装逆转录病毒。在CAR逆转录病毒感染小鼠T细胞5 d后,FAP-CAR1-T与FAP-CAR2-T细胞扩增倍数分别约为70.6倍和54.0倍,FAP-CAR1-T略高于FAP-CAR2-T细胞(图1B)。FCM检测结果(图1C)显示,逆转录病毒感染小鼠T细胞2 d后,FAP-CAR1-T和FAP-CAR2-T细胞CAR阳性率分别为67.6%和61.9%。以上结果表明,两种构型的FAP-CAR-T均可稳定表达CAR。



A: CAR结构示意图; B: CAR-T细胞增殖统计图; C: 流式细胞术检测FAP-CAR1-T及FAP-CAR2-T细胞CAR阳性率。

图1 FAP-CAR-T细胞的构建与鉴定

2.2 FAP-CAR-T细胞对NIH3T3-mFAP细胞的体外杀伤作用

荧光显微镜和流式细胞术结果(图2A、B)显示,NIH3T3-mFAP细胞中GFP及FAP阳性率可达96.6%,并且WB可检测到NIH3T3-mFAP细胞中mFAP表达(图2C)。以上说明NIH3T3-mFAP靶细胞可高效表达GFP和FAP。

RTCA全程监测FAP-CAR-T对NIH3T3或NIH3T3-mFAP细胞的杀伤能力,结果显示,在效靶比E:T=2:1和1:1条件下,两种FAP-CAR-T细胞对母本NIH3T3细胞几乎不产生影响(图2D),而均能导致NIH3T3-mFAP细胞的细胞指数下降(图2E),说明FAP-CAR-T杀伤作用具有显著FAP依赖性。

由于NIH3T3-mFAP细胞表达GFP,进一步通过CAR-T细胞与NIH3T3-mFAP细胞共培养,检测杀伤后剩余NIH3T3-mFAP细胞的GFP表达强度以评估CAR-T细胞杀伤效率。结果显示,在共培养24 h及48 h时,无论E:T=1:1或1:3,两种FAP-CAR-T

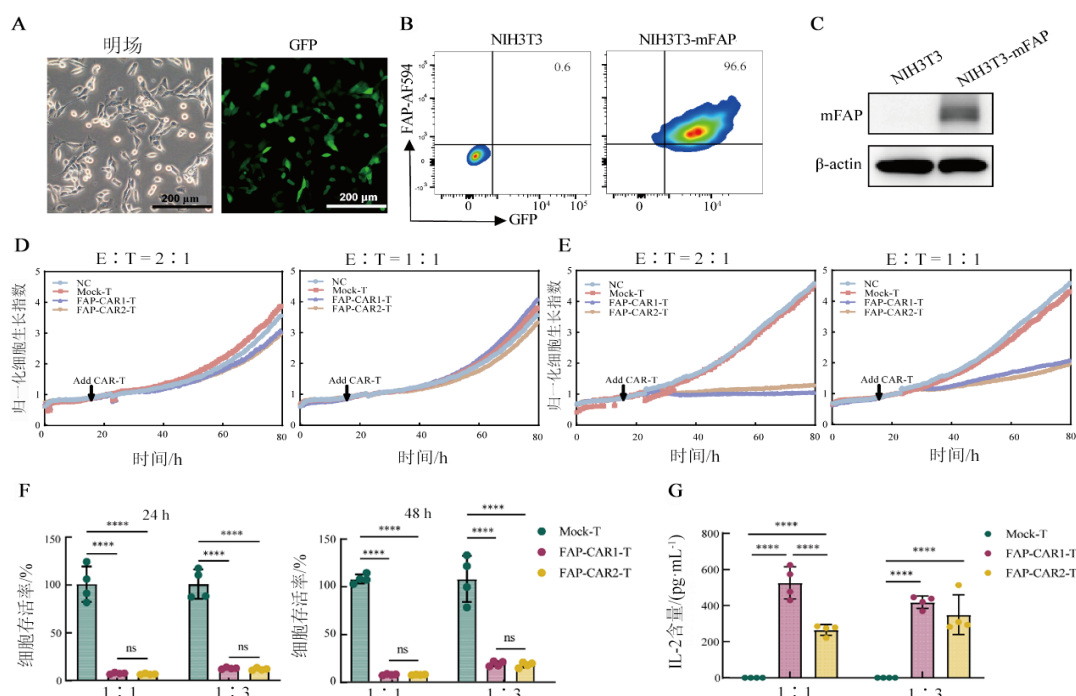
细胞均可特异且高效地杀伤NIH3T3-mFAP细胞($P < 0.0001$),而Mock-T对照组靶细胞存活率维持较高水平(图2F)。ELISA结果(图2G)显示,共培养24 h后,在E:T=1:1时,FAP-CAR1-T组上清中IL-2含量约为 (493 ± 73) pg/mL, FAP-CAR2-T组约为 (261 ± 35) pg/mL,在E:T=1:3时,FAP-CAR1-T组上清中IL-2含量约为 (409 ± 35) pg/mL, FAP-CAR2-T组约为 (372 ± 122) pg/mL,两种效靶比下Mock-T组均几乎检测不到IL-2,说明FAP-CAR-T在特异性识别靶细胞后发生明显功能激活,且FAP-CAR1-T的IL-2分泌水平更高。因此,后续采用FAP-CAR1-T细胞(以下简称FAP-CAR-T)进行动物实验进一步验证其抗肿瘤疗效。

2.3 FAP-CAR-T对乳腺癌4T1-HER2移植瘤的体内抗肿瘤作用

WB结果(图3A)显示,4T1-HER2细胞高表达HER2,不表达FAP。按照图3B实验流程,评估FAP-CAR-T(FAP-CAR1-T细胞)在4T1-HER2同种异体移

植瘤的BALB/c小鼠模型中的抗肿瘤活性。结果(图3C)显示,在T细胞治疗第36天,FAP-CAR-T组肿瘤生长速度相较Mock-T组,明显延缓($P < 0.05$),而与HER2-CAR-T组的肿瘤生长曲线相近,差异无

统计学意义($P > 0.05$)。在实验终点收取小鼠皮下瘤进行称重拍照,结果(图3D)显示肿瘤的大小变化趋势与肿瘤体积数据基本一致。治疗过程中各组小鼠体质量稳定,无明显下降(图3E)。



A: 荧光显微镜检测 NIH3T3-mFAP 细胞中 GFP 表达; B: 流式术检测 NIH3T3-mFAP 细胞中 mFAP 表达; C: WB 实验检测 NIH3T3-mFAP 细胞中 mFAP 表达情况; D: RTCA 实时监测 E:T = 2:1 及 1:1 条件下 FAP-CAR-T 细胞对 NIH3T3 细胞的杀伤作用; E: RTCA 实时监测 E:T = 2:1 及 1:1 条件下 FAP-CAR-T 细胞对 NIH3T3-mFAP 细胞的杀伤作用; F: 将 FAP-CAR-T 细胞和 Mock-T 细胞, 以 E:T = 1:1、1:3 分别与 NIH3T3-mFAP 细胞共培养, 在 24、48 h 后, 检测剩余的靶细胞数, 计算各组相对细胞存活率; G: ELISA 检测 FAP-CAR-T 细胞和 Mock-T 细胞, 以 E:T = 1:1、1:3 分别与 NIH3T3-mFAP 细胞共培养 24 h 后上清中 IL-2 含量。**** $P < 0.0001$ 。

图2 NIH3T3-mFAP靶细胞鉴定及FAP-CAR-T细胞体外杀伤活性检测

免疫组化染色结果(图3F、G)进一步表明,FAP-CAR-T细胞治疗组肿瘤组织中CD3⁺T细胞浸润明显增多,其数量高于HER2-CAR-T组($P < 0.01$),并显著高于Mock-T组($P < 0.001$);并且肿瘤组织中FAP阳性基质细胞占比显著低于阳性对照HER2-CAR-T组($P < 0.05$)及Mock-T组($P < 0.001$)。Masson染色发现FAP-CAR-T细胞治疗组肿瘤组织中胶原沉积显著低于Mock-T组及阳性对照HER2-CAR-T组($P < 0.01$,图3H、I)。

2.4 FAP-CAR-T治疗对肿瘤微环境转录组的影响

鉴于FAP-CAR-T体内抗肿瘤作用与HER2-CAR-T无显著差异,进一步对FAP-CAR-T治疗后的肿瘤微环境调控机制进行转录组分析。收集FAP-CAR-T组及Mock-T组小鼠肿瘤组织,进行转录组测序。结果(图4A)显示,与Mock-T组相比,FAP-CAR-T组共鉴定出440个显著上调基因及1648个显著下调基因($|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P < 0.05$)。无监督层次聚类分

析(图4B)显示,两组样本在转录特征上可明显区分,提示FAP-CAR-T治疗显著重塑了肿瘤组织的基因表达谱。

GO富集分析结果(图4C)表明,差异表达基因显著富集于细胞外空间、细胞外区域、ECM及免疫应答等相关条目,提示FAP-CAR-T参与调节肿瘤基质组成和免疫微环境。KEGG通路富集分析(图4D)显示,差异表达基因主要富集于肌细胞的细胞骨架、蛋白质消化吸收和ECM-受体相互作用等通路,提示FAP-CAR-T细胞通过干预FAP相关基质细胞、促进ECM降解,从而有利于免疫细胞浸润和抗肿瘤免疫反应的维持。

3 讨论

本研究基于自主获得的FAP纳米抗体VHH1和VHH2,构建了二价FAP-CAR,分别制备FAP-CAR1-T与FAP-CAR2-T,并系统评价其体内外抗肿瘤效应。采用二价纳米抗体CAR的目的在于同时覆盖不同表

位,以提高其与靶抗原结合的稳定性与亲和力,进而增强与TME中异质性表达FAP的识别与激活效率,同时降低因单表位遮蔽或亲和力不足导致的抗原逃逸风险。结果表明,FAP-CAR1-T与FAP-CAR2-T均可特异识别并高效杀伤NIH3T3-mFAP靶细胞,对FAP阴性的亲本NIH3T3细胞几乎无影响,提示FAP-CAR-T具备良好靶向性与安全性基础。需要指出的是,本研究的重点是比较两种二价VHH排列方式对CAR表达与功能的影响,以优化二价结构内部构型,因此,未设置单价VHH-CAR作为直接对照。此外,本研究尚未开展关于CAF不同表位的竞争结合及亲

和力测定的直接验证。在4T1-HER2移植瘤模型中,FAP-CAR-T显著抑制肿瘤生长,其肿瘤控制效果与HER2-CAR-T相比无显著差异。除此之外,FAP-CAR-T细胞可提高肿瘤组织CD3⁺T细胞浸润、减少胶原沉积面积,为靶向TME的CAR-T细胞策略提供了临床前证据。本研究采用CD3免疫组化评估肿瘤组织T细胞浸润,后续可通过流式细胞术对外周血T细胞、肿瘤浸润T细胞的亚群构成,以及其功能/耗竭表型进行定量分析,从而更系统地阐明CAR-T细胞持续性与功能状态。

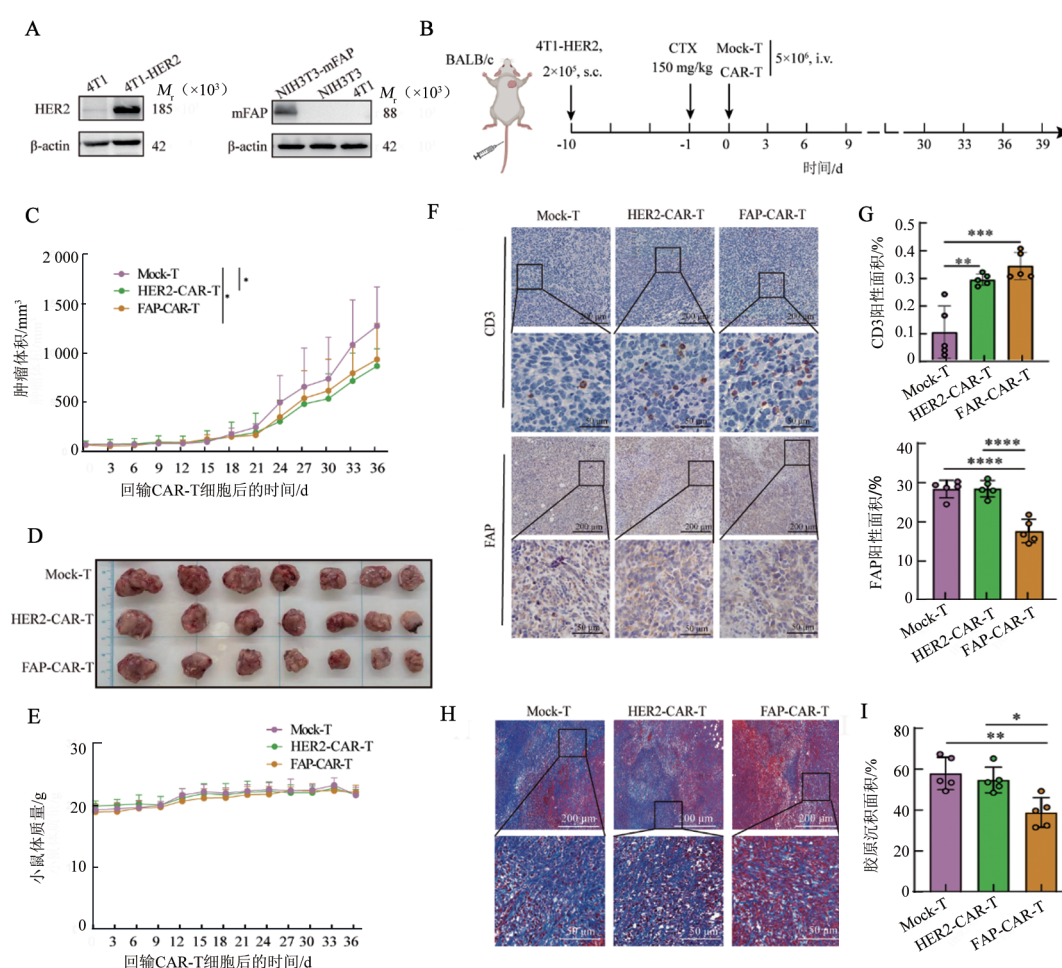
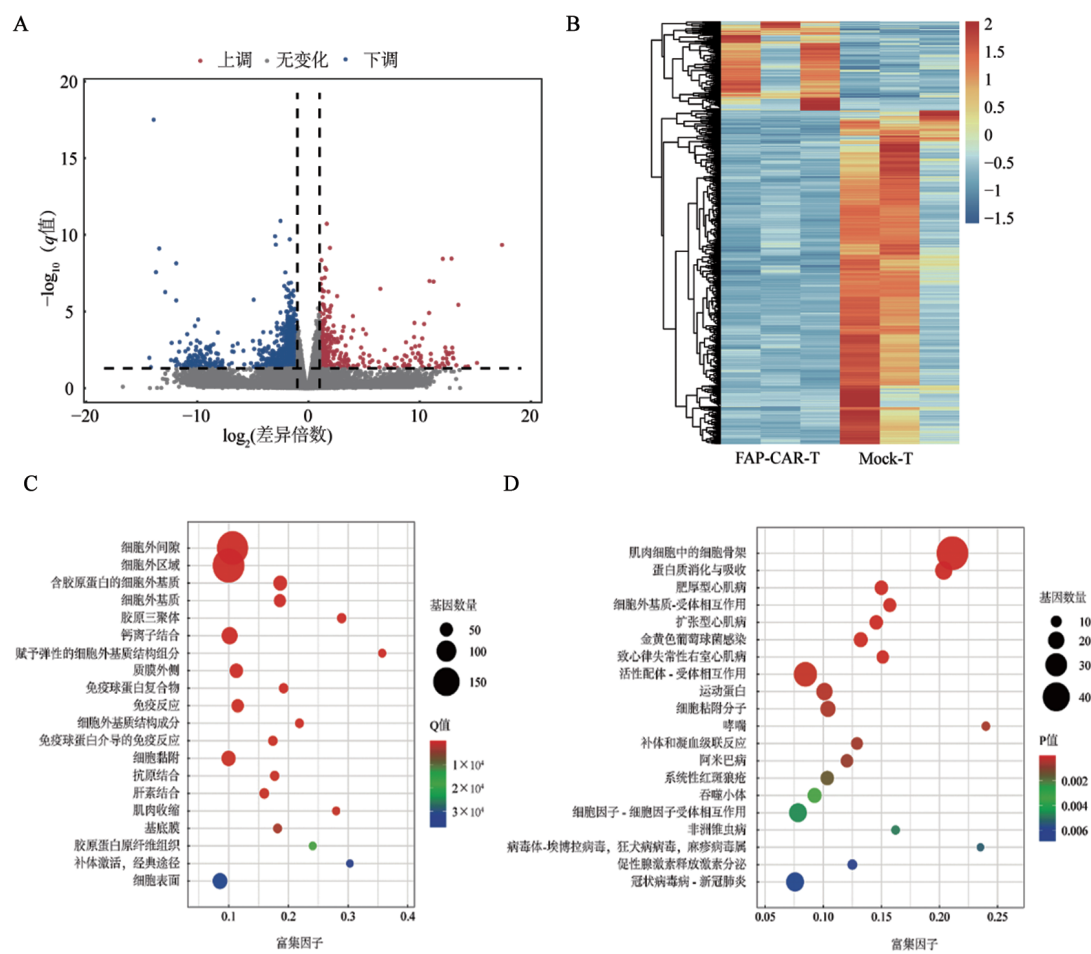


图3 FAP-CAR-T抑制小鼠肿瘤生长并改善肿瘤微环境特征

既往实体瘤CAR-T治疗多聚焦于HER2、EGFR等肿瘤细胞抗原,但其整体疗效常受免疫抑制性TME的限制^[8]。CAF可分泌ECM形成基质屏障阻碍T细胞浸润,并释放免疫抑制因子削弱T细胞功能^[9]。FAP在多种实体瘤基质区高表达、在多数正常组织低

表达,因此被认为是重要的TME干预靶点^[10]。本研究强调通过靶向FAP阳性基质细胞实现TME重塑,这一思路与当前靶向基质/免疫抑制细胞的联合免疫治疗策略相一致^[11-12]。转录组测序结果显示,治疗后肿瘤组织中与ECM结构组装、免疫应答调节及

ECM-受体相互作用相关的通路发生显著改变,提示基质屏障可能被削弱,免疫抑制状态得到缓解^[13]。未来可通过对CAF进行免疫荧光定量,并结合胶原降解相关基因及趋化因子轴的检测,进一步阐明“FAP阳性基质细胞变化-ECM重塑-免疫浸润改善”的机制。



A: FAP-CAR-T组与Mock-T组差异基因火山图; B: 差异表达基因无监督层次聚类分析热图; C: 差异表达基因GO富集分析气泡图; D: 差异表达基因的KEGG通路富集分析气泡图。

图4 FAP-CAR-T治疗对肿瘤微环境转录组的影响

在CAR结构设计上,本研究采用羊驼来源的VHH作为识别结构域,并通过调整VHH1/VHH2排列顺序构建二价胞外识别区^[14]。相较scFv,纳米抗体分子量更小、免疫原性更低且更易工程化^[15-16]。本研究结果表明VHH排列顺序会影响CAR表达与功能,FAP-CAR1-T在扩增能力与IL-2分泌方面略优于FAP-CAR2-T,后续将结合多参数流式细胞术与功能实验完善对CAR-T效应谱的评价。同时,在后续优化过程中,还需关注识别结构域空间构型与亲和力调控,以期在安全性与活性间取得更佳平衡^[17-18]。需注意的是,FAP在骨髓基质、胰腺、子宫及创伤修复组织中也存在低水平表达,因此其临床应用可能存在脱靶风险^[19]。目前仍以临床前研究为主,长期安全性评估仍需更长期随访与更接近临床的模型来验证^[20]。4T1-HER2小鼠荷瘤模型与人乳腺癌的TME之间仍

存在差异,未来可在患者来源类器官或人源化小鼠模型中进一步评估其转化价值^[21]。

结合近年的研究进展,FAP靶向治疗的临床潜力进一步凸显。有研究^[22]报道,靶向FAP阳性肌成纤维细胞的CAR-巨噬细胞疗法可有效减少心脏纤维化,提示FAP靶向策略有望拓展至非肿瘤纤维化疾病领域。同期临床研究^[23]证实,共价靶向放射性核素药物CTR-FAPI显著提升甲状腺髓样癌病灶检出灵敏度,为FAP靶向“诊疗一体化”提供了临床证据。另有研究^[24]显示FAP⁺巨噬细胞通过调控PD-L1和T细胞衰老驱动免疫逃逸,而FAP抑制联合PD-1/PD-L1阻断在淋巴瘤、结直肠癌模型中疗效显著。此外,有研究团队针对FAP-CAR-T细胞和抗体药物偶联物进行了初步临床试验,进一步凸显了CAF靶向免疫治疗的转化潜力^[25]。这些新进

展与本研究结论形成相互印证。综上,本研究为靶向基质或免疫抑制细胞的CAR-T细胞策略拓展至更多实体瘤提供了实验依据。

参考文献

- [1] SLAMON D J, CLARK G M, WONG S G, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene[J]. *Science*, 1987, 235(4785): 177-182. DOI: 10.1126/science.3798106.
- [2] SLAMON D J, LEYLAND-JONES B, SHAK S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(11): 783-792. DOI:10.1056/nejm200103153441101.
- [3] ZHAO Z G, CONDOMINES M, VAN DER STEGEN S J C, et al. Structural design of engineered costimulation determines tumor rejection kinetics and persistence of CAR T cells[J]. *Cancer Cell*, 2015, 28(4): 415-428. DOI:10.1016/j.ccell.2015.09.004.
- [4] ZHAO S B, LI R K, XIA Y, et al. Targeting ECM-producing cells with CAR-T therapy alleviates fibrosis in chronic kidney disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2025, 32(9): 1390-1402. e9. DOI: 10.1016/j.stem.2025.07.014.
- [5] LIU Y F, SUN Y S, WANG P, et al. FAP-targeted CAR-T suppresses MDSCs recruitment to improve the antitumor efficacy of claudin18.2-targeted CAR-T against pancreatic cancer[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 255. DOI:10.1186/s12967-023-04080-z.
- [6] BRENNEN W N, ISAACS J T, DENMEADE S R. Rationale behind targeting fibroblast activation protein-expressing carcinoma-associated fibroblasts as a novel chemotherapeutic strategy[J]. *Mol Cancer Ther*, 2012, 11(2): 257-266. DOI:10.1158/1535-7163.mct-11-0340.
- [7] HANSSENS H, MEEUS F, GESQUIERE E L, et al. Anti-idiotypic VHHs and VHH-CAR-T cells to tackle multiple myeloma: different applications call for different antigen-binding moieties [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5634. DOI:10.3390/ijms25115634.
- [8] BEATTY G L, GLADNEY W L. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 687-692. DOI:10.1158/1078-0432.ccr-14-1860.
- [9] WEHRLI M, GUINN S, BIROCCHI F, et al. Mesothelin CAR-T cells secreting anti-FAP/Anti-CD3 molecules efficiently target pancreatic adenocarcinoma and its stroma [J]. *Clin Cancer Res*, 2024, 30(9): 1859-1877. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-23-3841.
- [10] SHAHVALI S, RAHIMAN N, JAAFARI M R, 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.
- [11] JUNE C H, O'CONNOR R S, KAWALEKAR O U, et al. CAR T cell immunotherapy for human cancer[J]. *Science*, 2018, 359(6382): 1361-1365. DOI:10.1126/science.aar6711.
- [12] FRANCESCONI R, BARBOSA VENDRAMINI-COSTA D, FRANCO-BARRAZA J, et al. Netrin G1 promotes pancreatic tumorigenesis through cancer-associated fibroblast-driven nutritional support and immunosuppression[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(2): 446-479. DOI:10.1158/2159-8290.cd-20-0775.
- [13] MA J C, HUANG Y, CHEN J, et al. FAP⁺ fibroblasts orchestrate tumor microenvironment remodeling in renal cell carcinoma with tumor thrombus[J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 9387. DOI: 10.1038/s41467-025-64447-2.
- [14] HONG M H, CLUBB J D, CHEN Y Y. Engineering CAR-T cells for next-generation cancer therapy[J]. *Cancer Cell*, 2020, 38(4): 473-488. DOI:10.1016/j.ccell.2020.07.005.
- [15] MA S, LI X C, WANG X Y, et al. Current progress in CAR-T cell therapy for solid tumors[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(12): 2548-2560. DOI:10.7150/ijbs.34213.
- [16] ABBASI S, KHADEMI S, MONTAZERABADI A, et al. FAP-targeted nanoparticle-based imaging in cancer: a systematic review [J]. *J Biomed Phys Eng*, 2024, 14(4): 323-334. DOI: 10.31661/jbpe.v0i0.2404-1754
- [17] XIAO Z B, TODD L, HUANG L, et al. Desmoplastic stroma restricts T cell extravasation and mediates immune exclusion and immunosuppression in solid tumors[J]. *Nat Commun*, 2023, 14: 5110. DOI:10.1038/s41467-023-40850-5.
- [18] AKIYAMA T, YASUDA T, UCHIHARA T, et al. Stromal reprogramming through dual PDGFR α / β blockade boosts the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy in fibrotic tumors [J]. *Cancer Res*, 2023, 83(5): 753-770. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-22-1890.
- [19] HAMSON E J, KEANE F M, THOLEN S, et al. Understanding fibroblast activation protein (FAP): Substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2014, 8(5/6): 454-463. DOI:10.1002/prca.201300095.
- [20] BUGHDA R, DIMOU P, D' SOUZA R R, et al. Fibroblast activation protein (FAP)-targeted CAR-T cells: launching an attack on tumor stroma[J]. *ImmunoTargets Ther*, 2021, 10: 313-323. DOI: 10.2147/itt.s291767.
- [21] BAKHTIARVAND V K, AKBARI K R, SADRI F, et al. Establishment of a murine model of breast cancer expressing human epidermal growth factor receptor 2 (4T1-HER2)[J]. *J Cancer Res Ther*, 2024, 20(3): 984-992. DOI:10.4103/jert.jert_1303_22.
- [22] GAO Z, YAN L, MENG J, et al. Targeting cardiac fibrosis with chimeric antigen receptor macrophages. *Cell Discov*. 2024; 10(1): 86. DOI:10.1038/s41421-024-00718-4.
- [23] ZHANG Z Y, TAO J X, QIU J D, et al. From basic research to clinical application: targeting fibroblast activation protein for cancer diagnosis and treatment[J]. *Cell Oncol*, 2024, 47(2): 361-381. DOI:10.1007/s13402-023-00872-z.
- [24] GAO Y, LUO C J, YANG H, et al. Enhanced efficacy of dual chimeric antigen receptor-T cells targeting programmed death-ligand 1 and cancer-associated fibroblasts in colorectal cancer *in vitro*[J]. *Cytojournal*, 2025, 22: 29. DOI:10.25259/cytojournal_245_2024.
- [25] XU J Q, CHEN Z, QIN Y, et al. Nano-strategies targeting cancer-associated fibroblasts to enhance immunotherapy and reverse resistance[J]. *Front Immunol*, 2025, 16: 1668199. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1668199.

[收稿日期] 2025-08-30

[修回日期] 2026-01-29

[本文编辑] 邢一凡