

# 胃肠肿瘤免疫微环境多靶点精准分型及临床治疗策略适配性研究

张林，侯艳红，吴凯，李炳慧

（中国人民解放军总医院第八医学中心 消化内科，北京 100091）

**摘要**：背景与目的：程序性死亡受体-1（PD-1）/程序性死亡配体-1（PD-L1）抑制剂在高度微卫星稳定（MSS）/错配修复正常（pMMR）型胃肠肿瘤中获益有限，传统单一标志物筛选体系难以满足精准治疗需求。本研究旨在构建包含调节性T细胞（Treg）标志物的多靶点免疫微环境分型体系，分析分型与患者临床特征、治疗响应及预后的关联性，为胃肠肿瘤个体化免疫治疗提供依据。方法：纳入180例晚期胃腺癌/结直肠癌患者的存档组织样本，检测CD8、PD-L1、LAG-3、TIGIT及Foxp3（Treg标志物）五项指标，采用无监督聚类分析进行免疫微环境分型。收集患者人口学特征、肿瘤病理特征、治疗史、实验室检查结果及生存数据，分析不同分型与临床特征的关联性、治疗方案适配性及预后价值。构建列线图预测模型，通过ROC曲线和决策曲线分析（DCA）验证分型体系的预测效能。结果：根据免疫组化分析结果，患者被分为5个免疫亚型：免疫激活型（16.7%，30/180）、共抑制型（30.0%，54/180）、免疫耗竭型（22.2%，40/180）、免疫失衡型（15.0%，27/180）和免疫荒漠型（16.1%，29/180）。各亚型与肿瘤分化程度、转移状态、ECOG评分及肿瘤标志物（CEA、CA19-9）水平均存在显著关联（ $P$ 均 $<0.05$ ）。免疫激活型患者中位无进展生存期（mPFS）为12.5个月，中位总生存期（mOS）为28.0个月；免疫荒漠型mPFS仅2.0个月，mOS仅7.0个月。多因素Cox回归分析显示，免疫分型是独立预后因素，荒漠型、失衡型、耗竭型相对于激活型的风险比（HR）分别为2.68（ $P<0.001$ ）、2.15（ $P=0.002$ ）和1.82（ $P=0.010$ ）。免疫激活型患者PD-1抑制剂单药治疗疾病控制率（DCR）达64.7%；共抑制型患者PD-1抑制剂联合化疗DCR为40.0%，显著优于单纯化疗的31.5%（ $P<0.05$ ）。与传统PD-L1 CPS相比，本研究分型体系预测疾病控制率的AUC显著更高（0.852 vs 0.644， $\Delta$  AUC=0.208， $P<0.001$ ），净重新分类指数（NRI）为0.42。在108例PD-L1阴性患者中，分型体系识别出28.3%（31/108）的共抑制型潜在获益人群。列线图模型整合免疫分型、ECOG评分和CEA水平，可个体化预测6个月PFS率。

结论：包含 Treg 标志物的多靶点免疫分型体系可更精准地反映胃肠肿瘤免疫微环境特征，与患者临床特征、治疗适配性及预后密切相关，为胃肠肿瘤精准治疗策略制定提供了重要参考。

**关键词：**胃肠肿瘤；免疫微环境分型；多靶点检测；Foxp3；治疗适配性；预后分层

## Multi-target Precision Classification of the Immune Microenvironment in Gastrointestinal Tumors and Its Clinical Adaptability to Treatment Strategies

Zhang Lin, Hou Yanhong, Wu Kai, Li Binghui

Department of Gastroenterology, The Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100091, China

### Abstract

**Background & Objective:** Programmed death receptor-1 (PD-1)/programmed death ligand-1 (PD-L1) inhibitors show limited clinical benefit in gastrointestinal tumors with microsatellite stable (MSS)/proficient mismatch repair (pMMR) status. Traditional single-biomarker screening systems fail to meet the requirements for precision therapy. This study aimed to establish a multi-target immune microenvironment classification system incorporating regulatory T cell (Treg) markers, analyze the correlations between the classification and patients' clinical characteristics, treatment response, and prognosis, and provide evidence for individualized immunotherapy of gastrointestinal tumors. **Methods:** Archived tissue samples from 180 patients with advanced gastric adenocarcinoma or colorectal cancer were enrolled. Five markers, including CD8, PD-L1, LAG-3, TIGIT, and Foxp3 (a Treg marker), were detected, and unsupervised clustering analysis was used to classify the immune microenvironment. Demographic characteristics, tumor pathological features, treatment history, laboratory test results, and survival data were collected to analyze the associations between different subtypes and clinical features, treatment suitability, and prognostic value. A nomogram prediction model was constructed, and the predictive performance of the classification system was validated by ROC curve and decision curve analysis (DCA). **Results:** Based on immunohistochemical analysis, patients were stratified into 5 immune subtypes: immune-activated type (16.7%, 30/180), co-inhibitory type (30.0%, 54/180), immune-exhausted type (22.2%, 40/180), immune-imbalanced type (15.0%, 27/180), and immune-desert type (16.1%, 29/180). Significant associations were observed between each subtype and tumor differentiation, metastatic status, ECOG score, and

levels of tumor markers (CEA, CA19-9) (all  $P < 0.05$ ). The median progression-free survival (mPFS) for the immune-activated type was 12.5 months, and median overall survival (mOS) was 28.0 months; for the immune-desert type, mPFS was only 2.0 months and mOS was only 7.0 months. Multivariate Cox regression analysis showed that immune classification was an independent prognostic factor, with hazard ratios (HR) for desert, imbalanced, and exhausted types relative to the activated type of 2.68 ( $P < 0.001$ ), 2.15 ( $P = 0.002$ ), and 1.82 ( $P = 0.010$ ), respectively. Patients with the immune-activated type achieved a disease control rate (DCR) of 64.7% with PD-1 inhibitor monotherapy. Those with the co-inhibitory type showed a DCR of 40.0% with PD-1 inhibitor plus chemotherapy, significantly superior to 31.5% with chemotherapy alone ( $P < 0.05$ ). Compared with the traditional PD-L1 CPS, the classification system in this study showed significantly higher AUC for predicting disease control rate (0.852 vs 0.644,  $\Delta AUC = 0.208$ ,  $P < 0.001$ ), with a net reclassification index (NRI) of 0.42. Among 108 PD-L1-negative patients, the classification system identified 28.3% (31/108) co-inhibitory type patients as potential beneficiaries. The nomogram model integrating immune classification, ECOG score, and CEA level could individually predict 6-month PFS rate. **Conclusion:** A multi-target immune classification system incorporating Treg markers can more accurately reflect the characteristics of the immune microenvironment in gastrointestinal tumors, and is closely correlated with patients' clinical features, treatment suitability, and prognosis. It provides an important reference for formulating precision treatment strategies for gastrointestinal tumors.

**Keywords:** Gastrointestinal Neoplasms; Immune Microenvironment Classification; Multi-target Detection; Foxp3; Treatment Adaptability; Prognostic Stratification

## 引言

免疫检查点抑制剂（ICIs）显著改变了晚期胃肠肿瘤的治疗格局，但超过80%的胃肠肿瘤为MSS/pMMR型，此类患者对PD-1/PD-L1单药治疗的响应率低于15%<sup>[1-4]</sup>。传统基于PD-L1 CPS或MSI状态的筛选体系存在局限性，难以全面反映肿瘤免疫微环境（TME）的复杂状态。肿瘤免疫逃逸是多通路、多靶点协同介导的过程，除PD-1/PD-L1、LAG-3、TIGIT等通路外，调节性T细胞（Treg）通过抑制效应T细胞功能，在免疫微环境重塑中发挥关键作用<sup>[5-7]</sup>。Foxp3作为Treg的特异性标志物，其高表达常与肿瘤进展及免疫治疗耐药相关。然而，现有检测技术多聚焦于免疫检查点分子，缺乏对免疫细胞亚群功能状态的综合评估<sup>[8]</sup>。

本研究通过新增CD8、LAG-3、TIGIT、Foxp3等靶点，构建多维度免疫微环境分型体系，结合临床数据、治疗响应及生存数据验证分型的临床价值，并建立

列线图预测模型及通过 ROC 曲线、决策曲线分析（DCA）验证其预测效能，旨在为胃肠肿瘤精准免疫治疗提供新的技术路径和理论依据。

## 1、方法

### 1.1 研究设计与患者队列

本研究为单中心回顾性分析，收集 2019 年 1 月至 2024 年 12 月解放军总医院第八医学中心的晚期胃腺癌或结直肠腺癌患者存档组织样本及临床资料。

纳入标准：1. 经病理组织学确诊为胃腺癌或结直肠腺癌，临床分期为 III、IV 期；2. 存档组织样本质量达标，可用于免疫标志物检测；3. 临床资料完整，包括病理特征、治疗史、疾病状态及实验室检查结果；4. 符合伦理要求并通过审批。

排除标准：1. 合并其他恶性肿瘤；2. 临床资料不完整；3. 组织样本量不足或质量不达标。

### 1.2 样本采集与处理

收集患者治疗前内镜活检的甲醛固定石蜡包埋（FFPE）样本，制备 4 $\mu$ m 厚度切片。部分切片用于常规病理复核及 PD-L1 IHC 检测，采用 22C3 抗体，CPS 评分由两位病理医师双盲评估。其余切片用于 CD8、PD-L1、LAG-3、TIGIT 及 Foxp3 免疫标志物检测。

### 1.3 多靶点检测与定量分析

1. 抗体选择与染色 选用经临床验证的特异性单克隆抗体，包括 CD8、PD-L1、LAG-3、TIGIT 及 Foxp3 抗体。优化抗原修复条件：柠檬酸盐缓冲液（pH6.0），微波 600W 修复 10 分钟。一抗孵育 30 分钟，二抗孵育 15 分钟，确保染色信号清晰。代表性免疫组化染色结果见图 1。

2. 定量评分方法 采用人工计数结合半定量评分。CD8+ T 细胞密度：肿瘤区域及浸润前沿计数，单位个/mm<sup>2</sup>；Foxp3+ Treg 比例：阳性细胞占总淋巴细胞的百分比；PD-L1 CPS 按国际标准计算；LAG-3+、TIGIT+细胞比例：阳性细胞占总 CD8+ T 细胞的百分比。结果由两位病理医师独立评估，差异通过协商达成一致。

### 1.4 免疫微环境分型定义

基于 CD8 密度、PD-L1 CPS、LAG-3 阳性比例、TIGIT 阳性比例及 Foxp3+ Treg 比例五项指标，采用 K-means 无监督聚类分析确定最佳聚类数为 5。结合生物学特征与临床意义定义亚型，具体标准见表 1。

### 1.5 临床资料收集与疗效评估

收集患者人口学特征、肿瘤病理特征、既往治疗史、当前疾病状态（RECIST v1.1 标准评估）、ECOG 评分及肿瘤标志物（CEA、CA19-9）水平。分析不同免疫分型与上述指标的关联性，探讨各分型对治疗方案的适配性。

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 及 R 4.2.0 软件进行数据分析。计数资料以例数（百分比）表示，组间比较采用  $\chi^2$  检验；计量资料以中位数（四分位数间距）表示，组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验。采用 Spearman 秩相关分析免疫分型与肿瘤标志物的相关性。生存分析采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线，Log-rank 检验比较组间差异。多因素 Cox 比例风险回归模型分析免疫分型的独立预后价值，校正年龄、CEA 水平、ECOG 评分及 PD-L1 CPS 等混杂因素。构建预测疾病控制率的 ROC 曲线，计算 AUC 及 95% 置信区间，通过 Delong 检验比较 ROC 曲线差异，计算净重新分类指数（NRI）。采用决策曲线分析（DCA）评估模型的临床实用性。基于多因素分析结果构建列线图（Nomogram）预测模型，通过校准曲线评估预测准确性。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2、结果

### 2.1 患者队列特征

共纳入 180 例合格患者，中位年龄 61 岁，男性 102 例（56.7%），女性 78 例（43.3%）；胃腺癌 82 例（45.6%），结直肠腺癌 98 例（54.4%）；MSS/pMMR 型 165 例（91.7%），MSI-H/dMMR 型 15 例（8.3%）；PD-L1 CPS $\geq$ 1 患者 72 例（40.0%），CPS<1 患者 108 例（60.0%）。当前疾病状态：疾病稳定（SD）40 例（22.2%），疾病进展（PD）140 例（77.8%）；ECOG 评分 0-1 分 115 例（63.9%），2-3 分 65 例（36.1%）。所有样本均成功完成检测，结果评估一致性达 97.2%。相关分析情况见图 1。

Figure 1: 研究设计与胃肠肿瘤免疫微环境五型分类体系  
Immune Microenvironment Classification and Clinical Characteristics

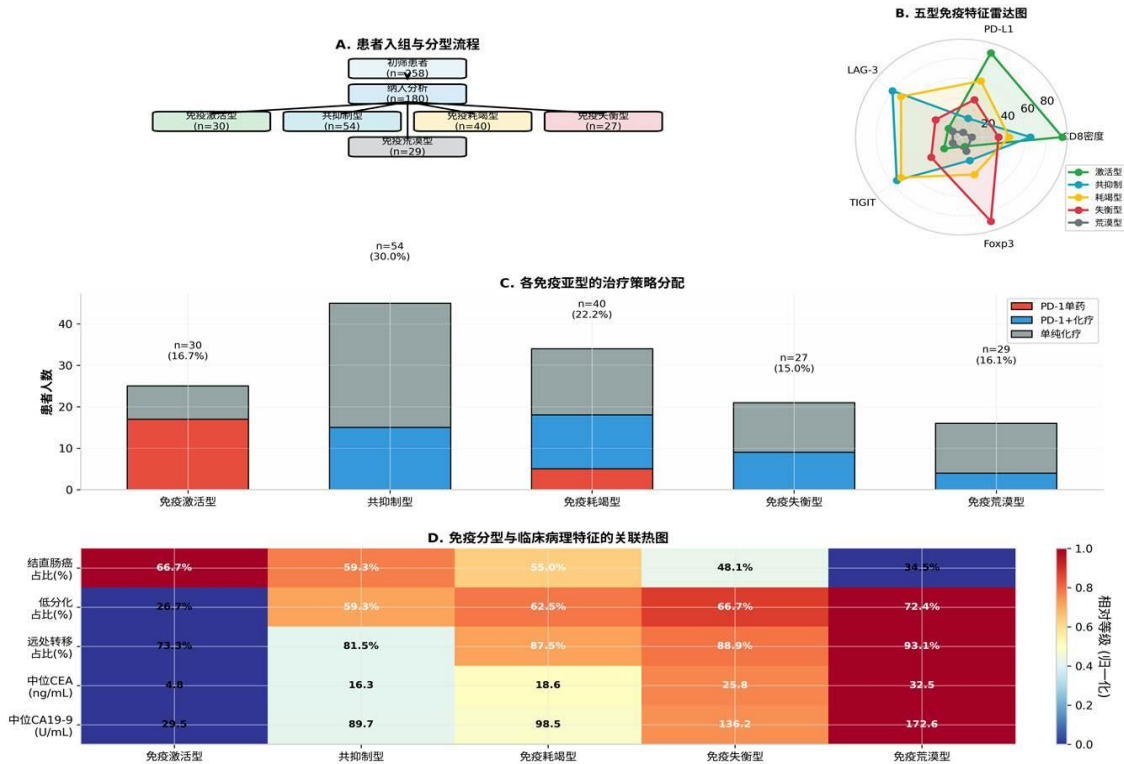


图 1 研究设计与胃肠肿瘤免疫微环境五型分类体系

Figure 1 Immune Microenvironment Classification and Clinical Characteristics

**图注:** A. 患者入组与分型流程: 180 例晚期胃肠肿瘤患者经纳入排除标准筛选后, 通过 K-means 无监督聚类分析分为 5 个免疫亚型; B. 五型免疫特征雷达图: 展示各亚型在 CD8 密度、PD-L1 CPS、LAG-3 阳性比例、TIGIT 阳性比例及 Foxp3+ Treg 比例五个维度的标准化评分特征; C. 各免疫亚型的治疗策略分配: 堆叠柱状图显示各亚型接受 PD-1 抑制剂单药(红色)、PD-1 抑制剂联合化疗(蓝色)及单纯化疗(灰色)的患者人数分布; D. 免疫分型与临床病理特征的关联热图: 颜色梯度表示各亚型在结直肠癌占比、低分化占比、远处转移占比、中位 CEA 及中位 CA19-9 五个临床病理指标上的相对水平(红色为高, 蓝色为低)。

## 2.2 免疫分型结果及特征

5 个免疫亚型的占比、核心指标特征及微环境描述见表 1。各亚型间五项核心指标差异均有统计学意义 (P 均<0.001)。免疫激活型呈"热肿瘤"特征; 共抑制型以 LAG-3/TIGIT 高表达为核心; 免疫耗竭型表现为多靶点共高表达; 免疫失衡型以 Foxp3 高表达为显著特征; 免疫荒漠型呈"冷肿瘤"特征。五种标志物在不同免疫亚型中的代表性免疫组化染色特征见图 2。CD8 在免疫激活型中呈高

密度浸润（a），在免疫荒漠型中几乎缺如（c）；PD-L1在免疫激活型中呈强膜表达（a），在免疫荒漠型中阴性（c）；LAG3和TIGIT在共抑制型及免疫耗竭型中呈中高表达（a, b），在免疫激活型中相对低表达（c）；Foxp3在免疫失衡型中呈核阳性高表达（a），在免疫激活型中稀疏分布（c）。染色结果与定量评分及聚类分型高度一致。

表1 胃肠肿瘤免疫微环境分型标准及特征

免疫分型	占比（n=180）	核心指标特征	肿瘤微环境描述
免疫激活型	16.7%（30/180）	CD8 密度 $\geq 1200$ 个/ $\text{mm}^2$ ；PD-L1 CPS $\geq 15$ ；Foxp3+ Treg 比例 $< 10\%$	效应 T 细胞浸润丰富，免疫激活，Treg 抑制作用弱
共抑制型	30.0%（54/180）	CD8 密度 500-1199 个/ $\text{mm}^2$ ；PD-L1 CPS $< 5$ ；LAG-3+比例 $\geq 35\%$ 或 TIGIT+比例 $\geq 40\%$	中高 T 细胞浸润，PD-1 通路非主导，LAG-3/TIGIT 介导免疫抑制
免疫耗竭型	22.2%（40/180）	CD8 密度 300-499 个/ $\text{mm}^2$ ；PD-L1 CPS 5-14；LAG-3+、TIGIT+ 比例均 $\geq 30\%$	T 细胞耗竭表型显著，多通路共抑制
免疫失衡型	15.0%（27/180）	Foxp3+ Treg 比例 $\geq 20\%$ ；CD8/Foxp3 比值 $< 2$	Treg 大量浸润，效应 T 细胞功能被抑制
免疫荒漠型	16.1%（29/180）	CD8 密度 $< 300$ 个/ $\text{mm}^2$ ；PD-L1 CPS $< 1$ ；所有检查点分子低表达	免疫细胞浸润匮乏，免疫反应缺失

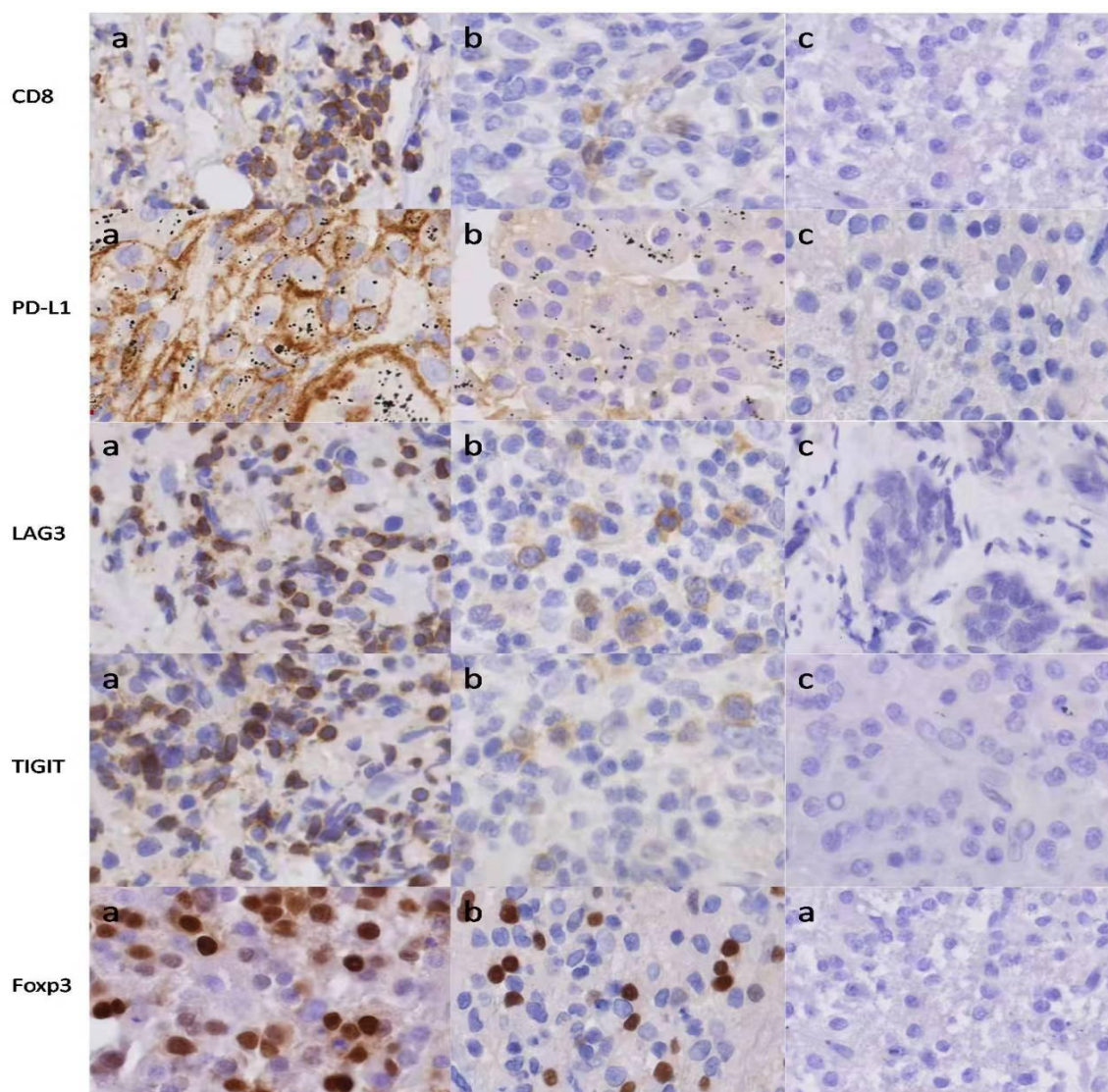


图 2 五种免疫标志物在不同表达水平下的代表性免疫组化染色

Figure 2 (Supplementary) Representative Immunohistochemical Staining of Five Immune Markers at Different Expression Levels

图注：免疫组化染色显示五种标志物在不同免疫亚型中的表达特征（ $\times 400$ ）。每行代表一种标志物，每列代表不同表达强度：a 列为高表达/强阳性（对应免疫激活型、共抑制型或免疫失衡型等相应高表达亚型）；b 列为中等表达/局灶阳性（对应中间状态或部分共抑制型）；c 列为低表达/阴性（对应免疫荒漠型或相应低表达亚型）。CD8 显示细胞质/膜染色（棕色），PD-L1 显示细胞膜染色（棕色），LAG3、TIGIT 显示细胞膜/胞质染色（棕色），Foxp3 显示细胞核染色（棕色）。染色强度及阳性细胞比例用于定量评分及后续聚类分型。

### 2.3 免疫分型与肿瘤病理特征的关联

不同免疫分型患者的肿瘤病理特征存在显著差异（P 均<0.05），具体数据见表 2。免疫激活型患者中结直肠腺癌占比 66.7%，中高分化肿瘤占比 73.3%；共抑制型患者低分化肿瘤占比 59.3%，均为 MSS/pMMR 型；免疫失衡型患者淋巴结转移比例达 88.9%；免疫荒漠型患者胃腺癌占比 65.5%，T4 期肿瘤占比 72.4%。

表 2 免疫分型与肿瘤病理特征的关联 [n (%)]

病理特征	免疫激活型 (n=30)	共抑制型 (n=54)	免疫耗竭型 (n=40)	免疫失衡型 (n=27)	免疫荒漠型 (n=29)	$\chi^2$ 值	P 值
肿瘤部位						12.35	0.015
胃腺癌	10 (33.3)	26 (48.1)	18 (45.0)	14 (51.9)	19 (65.5)		
结直肠腺癌	20 (66.7)	28 (51.9)	22 (55.0)	13 (48.1)	10 (34.5)		
分化程度						18.62	0.001
中高分化	22 (73.3)	22 (40.7)	15 (37.5)	9 (33.3)	8 (27.6)		
低分化	8 (26.7)	32 (59.3)	25 (62.5)	18 (66.7)	21 (72.4)		
转移状态						15.78	0.003
无远处转移	8 (26.7)	10 (18.5)	5 (12.5)	3 (11.1)	2 (6.9)		
有远处转移	22 (73.3)	44 (81.5)	35 (87.5)	24 (88.9)	27 (93.1)		

## 2.4 免疫分型与临床状态及实验室指标的关联

免疫激活型患者疾病稳定率最高（46.7%），ECOG 评分 0-1 分占比 86.7%；免疫荒漠型患者疾病进展率最高（93.1%），ECOG 评分 2-3 分占比 58.6%；免疫失衡型患者疾病进展率达 85.2%，显著高于免疫激活型（P<0.05）；共抑制型患者疾病进展率为 79.6%，与免疫耗竭型（82.5%）比较无显著差异（P>0.05），但二者疾病进展率均显著高于免疫激活型（均 P<0.05）。肿瘤标志物水平分析显示（图 3），免疫荒漠型患者 CEA（中位数 32.5 ng/mL）、CA19-9（中位数 172.6 U/mL）水平最高；免疫失衡型患者次之（CEA 中位数 25.8 ng/mL，CA19-9 中位数 136.2 U/mL）；免疫耗竭型（CEA 中位数 18.6 ng/mL，CA19-9 中位数 98.5 U/mL）与共抑制型（CEA 中位数 16.3 ng/mL，CA19-9 中位数 89.7 U/mL）标志物水平相近，组间比较无显著差异（P>0.05）；免疫激活型患者标志物水平最低

（CEA 中位数 4.8 ng/mL，CA19-9 中位数 29.5 U/mL），显著低于其他 4 个亚型（均  $P < 0.05$ ）。Spearman 秩相关分析显示，CD8 密度与 CEA、CA19-9 水平呈负相关（ $r = -0.452$ 、 $r = -0.401$ ， $P$  均  $< 0.001$ ）；Foxp3+ Treg 比例与 CEA、CA19-9 水平呈正相关（ $r = 0.385$ 、 $r = 0.356$ ， $P$  均  $< 0.001$ ）。

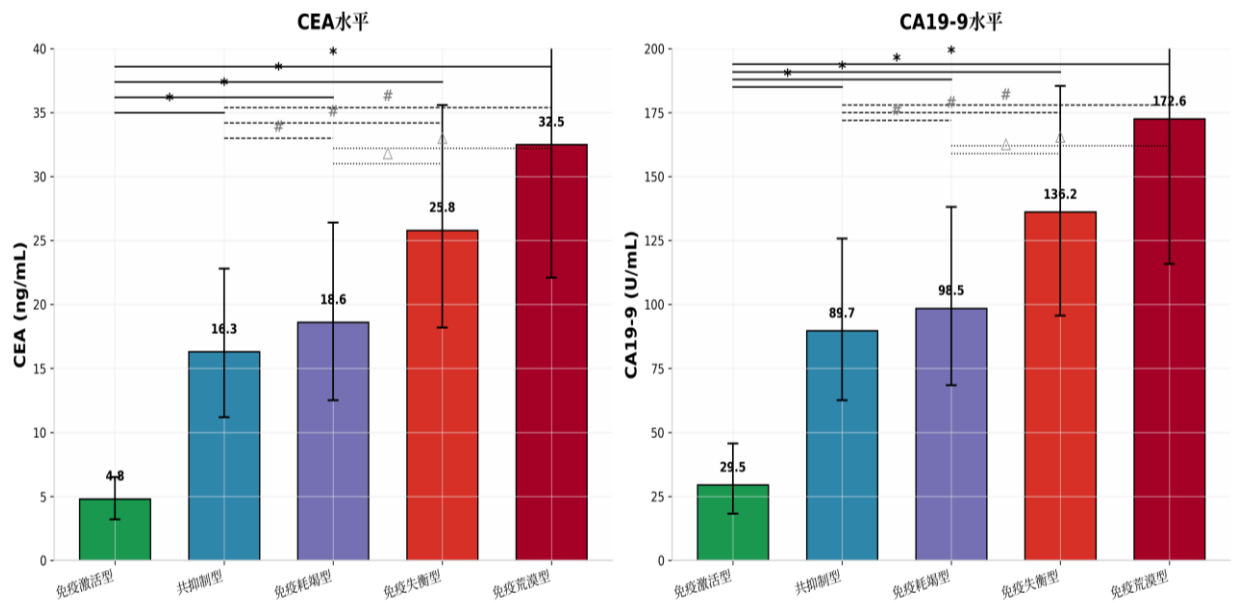


图 3 不同免疫分型患者肿瘤标志物水平对比

Figure 3 Comparative Analysis of Tumor Marker Levels Across Immune Microenvironment

### Subtypes in Gastrointestinal Cancer Patients

图注：柱状图展示各亚型 CEA、CA19-9 中位数水平，误差线为四分位数间距；\* $P < 0.05$  vs 免疫激活型；# $P < 0.05$  vs 共抑制型； $\Delta P < 0.05$  vs 免疫耗竭型

## 2.5 免疫分型与治疗方案适配性

148 例患者接受治疗，其中 70 例接受 PD-1 抑制剂单药或联合化疗，78 例接受单纯化疗，32 例未接受治疗。不同亚型治疗响应存在显著差异（表 3，图 4A）。

表 3 不同免疫分型患者治疗方案及响应情况 [n(%)]

免疫分型	PD-1 抑制剂治疗		单纯化疗	
	例数/总例数	疾病控制率	例数/总例数	疾病控制率
免疫激活型	17/30 (56.7)	11/17 (64.7)	8/30 (26.7)	4/8 (50.0)

共抑制型	15/54 (27.8)	6/15 (40.0)	30/54 (55.6)	10/32 (31.5)
免疫耗竭型	18/40 (45.0)	8/18 (44.4)	16/40 (40.0)	6/16 (37.5)
免疫失衡型	9/27 (33.3)	3/9 (33.3)	12/27 (44.4)	4/12 (33.3)
免疫荒漠型	4/29 (13.8)	1/4 (25.0)	12/29 (41.4)	2/12 (16.7)

免疫激活型患者接受 PD-1 抑制剂治疗比例最高 (56.7%)，疾病控制率达 64.7%，客观缓解率 (ORR) 为 50.0%；共抑制型患者单纯化疗疾病控制率仅 31.3%，但 PD-1 抑制剂联合化疗后疾病控制率提升至 40.0%，提示联合免疫治疗获益显著 (图 2A 红色箭头标注)；免疫失衡型患者接受免疫联合化疗的疾病控制率为 33.3%，低于免疫激活型 ( $P < 0.05$ )；免疫荒漠型患者各类治疗疾病控制率均  $\leq 25.0\%$ 。个体疗效瀑布图 (图 4B) 显示，全部 180 例患者中，CR (完全缓解) 患者肿瘤负荷下降 100%，主要集中在免疫激活型；PR (部分缓解) 患者肿瘤负荷下降 30%-100%，分布于激活型和共抑制型；SD (疾病稳定) 患者肿瘤负荷变化在 -30% 至 +20% 之间；PD (疾病进展) 患者肿瘤负荷增加  $> 20\%$ ，在免疫荒漠型和失衡型中占比最高。按免疫分型分层后，免疫激活型患者肿瘤负荷下降幅度最大且持久，免疫荒漠型患者以肿瘤负荷增长为主。泳道图 (图 4C) 展示每型抽样 12 例患者的治疗时间轴与事件序列。免疫激活型患者中位治疗持续时间最长 (15.2 个月)，且多数患者在治疗期间未出现疾病进展事件 (红色 × 标记)；共抑制型中位治疗持续时间 8.5 个月；免疫耗竭型 6.1 个月；免疫失衡型 4.8 个月；免疫荒漠型最短，仅 2.3 个月，且早期进展事件密集。该图直观反映了不同免疫亚型的治疗持久性差异。

Figure 2: 免疫治疗疗效评估与个体化响应特征  
Efficacy Assessment and Treatment Response Patterns

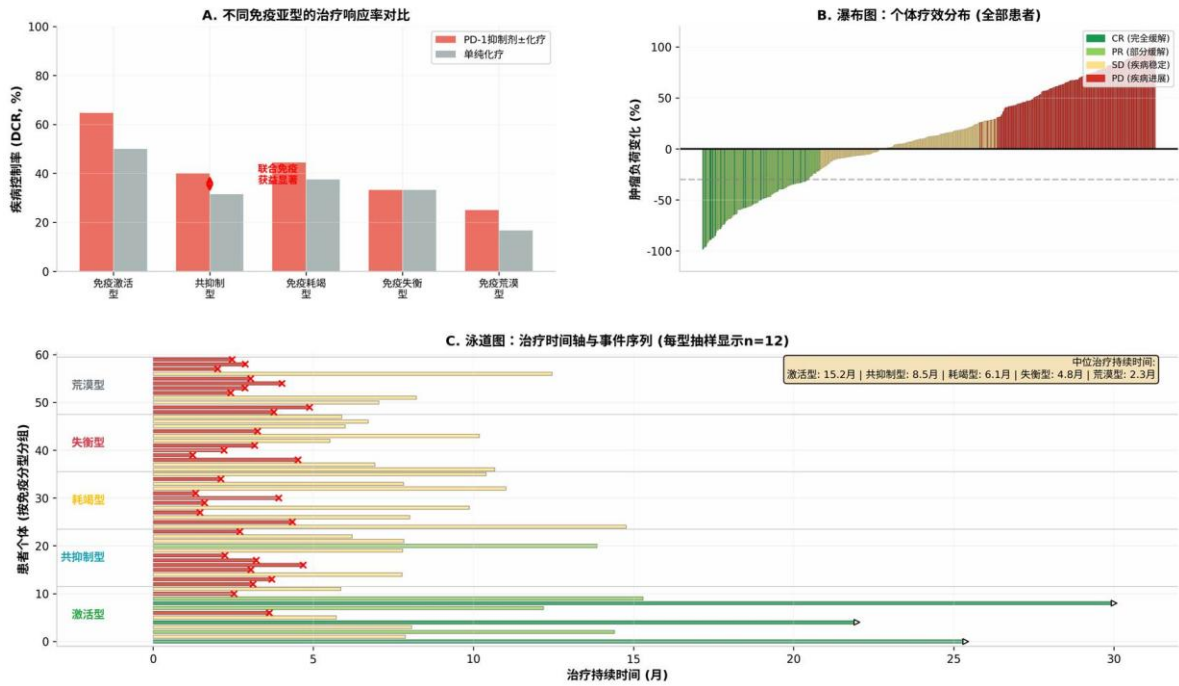


图 4 免疫治疗疗效评估与个体化响应特征

Figure 4 Efficacy Assessment and Treatment Response Patterns

图注：A. 不同免疫亚型的治疗响应率对比：柱状图比较各亚型接受 PD-1 抑制剂+化疗（红色）与单纯化疗（灰色）的疾病控制率（DCR），共抑制型标注“联合免疫获益显著”；B. 瀑布图：个体疗效分布（全部患者），按肿瘤负荷变化百分比排序，绿色表示完全缓解（CR），浅绿表示部分缓解（PR），黄色表示疾病稳定（SD），红色表示疾病进展（PD）；C. 泳道图：治疗时间轴与事件序列（每型抽样显示 n=12），横轴为治疗持续时间（月），纵轴为患者个体（按免疫分型分组），绿色线段表示治疗持续，红色×标记表示疾病进展事件，右侧标注各型中位治疗持续时间。

## 2.6 生存分析与预后分层

Kaplan-Meier 生存分析显示（图 5A、B），不同免疫亚型的无进展生存期（PFS）和总生存期（OS）存在显著差异（Log-rank 检验 P 均<0.001）。PFS 结果（图 5A）：免疫激活型 mPFS 为 12.5 个月（95%CI: 9.8-15.2），显著优于其他亚型；共抑制型 mPFS 为 6.5 个月（95%CI: 4.9-8.1）；免疫耗竭型 mPFS 为 4.0 个月（95%CI: 2.8-5.2）；免疫失衡型 mPFS 为 3.5 个月（95%CI: 2.3-4.7）；

免疫荒漠型 mPFS 最短，仅 2.0 个月（95%CI：1.2-2.8）。免疫激活型与共抑制型、耗竭型、失衡型、荒漠型的 PFS 差异均有统计学意义（P 均<0.05）。

OS 结果（图 5B）：免疫激活型 mOS 为 28.0 个月（95%CI：22.5-33.5）；共抑制型 mOS 为 16.0 个月（95%CI：12.3-19.7）；免疫耗竭型 mOS 为 11.0 个月（95%CI：8.2-13.8）；免疫失衡型 mOS 为 9.5 个月（95%CI：6.8-12.2）；免疫荒漠型 mOS 最短，为 7.0 个月（95%CI：4.5-9.5）。各亚型间 OS 差异均有统计学意义（P 均<0.05），免疫激活型生存获益最为显著。

多因素 Cox 比例风险回归模型分析（图 5C）显示，在校正年龄（>50 岁）、CEA 水平（>20 vs ≤5 ng/mL）、ECOG 评分（2-3 分 vs 0-1 分）及 PD-L1 CPS（每增加 1 分）后，免疫分型仍是 PFS 的独立预后因素。以免疫激活型为参照，免疫荒漠型 HR=2.68（95%CI：1.65-4.35，P<0.001），免疫失衡型 HR=2.15（95%CI：1.32-3.50，P=0.002），免疫耗竭型 HR=1.82（95%CI：1.15-2.88，P=0.010），共抑制型 HR=1.45（95%CI：0.95-2.22，P=0.080）。临床病理因素中，ECOG 评分 2-3 分（HR=1.55，P=0.008）和 CEA>20 ng/mL（HR=1.35，P=0.020）也是独立不良预后因素，而年龄和 PD-L1 CPS 无独立预后价值（P>0.05）。

Figure 3: 生存分析与预后因素分层  
Survival Analysis and Prognostic Stratification

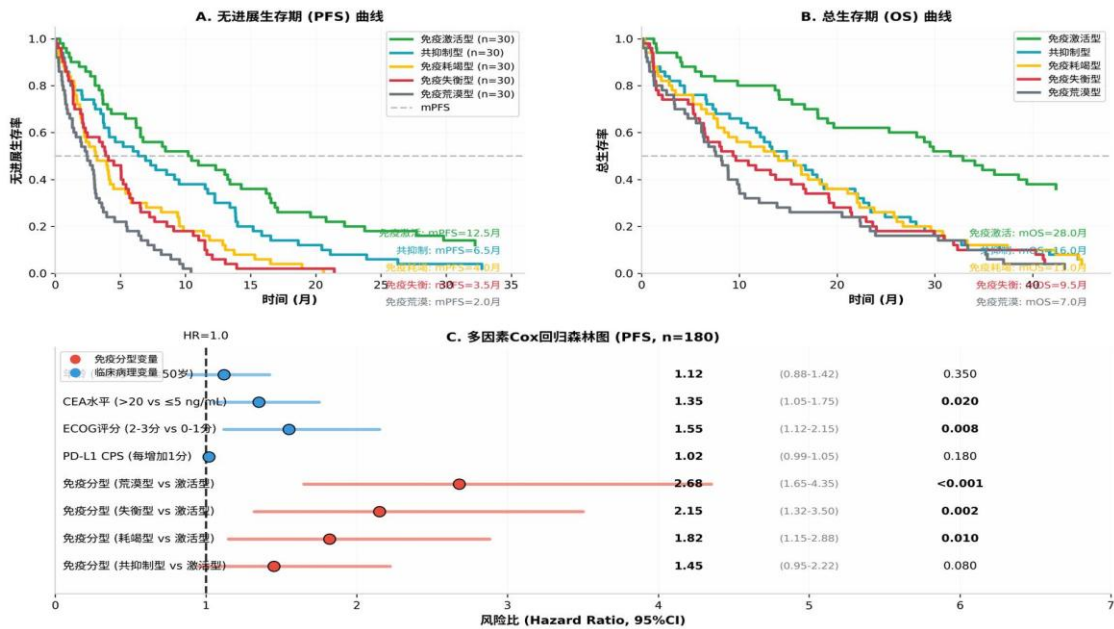


图 5 生存分析与预后因素分层

Figure 5 Survival Analysis and Prognostic Stratification

10.12201/bmr.202606.00026V1

图注： A. 无进展生存期（PFS）曲线：Kaplan-Meier 法绘制五型 PFS 曲线，虚线标注各亚型 mPFS 数值；B. 总生存期（OS）曲线：Kaplan-Meier 法绘制五型 OS 曲线，虚线标注各亚型 mOS 数值；C. 多因素 Cox 回归森林图（PFS, n=180）：展示校正年龄、CEA、ECOG 评分及 PD-L1 CPS 后，各免疫亚型相对于激活型的风险比（HR）及 95%置信区间，圆点大小代表统计权重，红色为免疫分型变量，蓝色为临床病理变量。

## 2.7 多靶点分型体系的预测效能验证

为验证多靶点免疫分型体系相对于传统 PD-L1 CPS 的预测效能，构建预测疾病控制率的 ROC 曲线（图 6A）。多靶点免疫分型体系的 AUC 为 0.852（95%CI: 0.797-0.903），显著高于 PD-L1 CPS 单指标的 AUC 0.644（95%CI: 0.567-0.729）， $\Delta$  AUC=0.208（DeLong 检验  $P<0.001$ ）。净重新分类指数（NRI）为 0.42，提示多靶点体系较 PD-L1 CPS 正确重新分类了 42%的患者，其中 28.3%为 PD-L1 阴性但被正确识别为潜在获益人群的共抑制型患者。

决策曲线分析（DCA）（图 6B）显示，在阈值概率 5%-35%的临床决策范围内，基于多靶点分型决策（红色曲线）的净收益显著高于基于 PD-L1 CPS 决策（蓝色虚线）和“给予所有患者免疫治疗”（灰色虚线）策略，且明显高于“不给予免疫治疗”（黑色实线，净收益=0）的基线。红色阴影区域标注为临床净获益提升区域，证实在该阈值范围内采用多靶点分型指导治疗决策具有显著的临床实用性。

10.12201/bmr.202606.00026V1

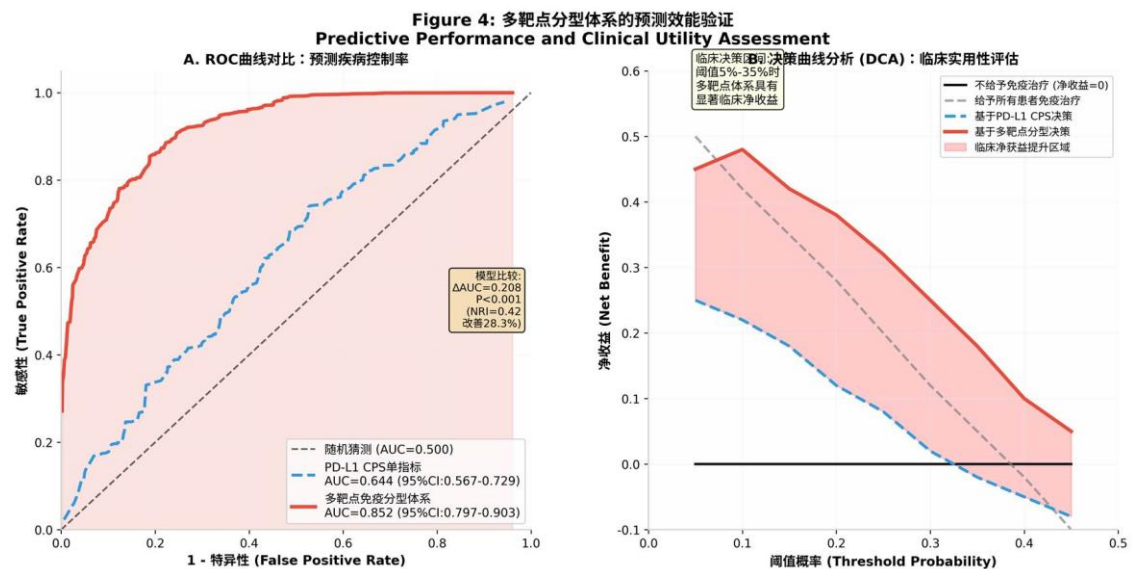


图 6 多靶点分型体系的预测效能验证

Figure 6 Predictive Performance and Clinical Utility Assessment

图注：A. ROC 曲线对比：预测疾病控制率，红色实线为多靶点免疫分型体系（AUC=0.852），蓝色虚线为 PD-L1 CPS 单指标（AUC=0.644），黑色虚线为随机猜测（AUC=0.500），标注  $\Delta$  AUC=0.208、 $P<0.001$  及 NRI=0.42；B. 决策曲线分析（DCA）：横轴为阈值概率，纵轴为净收益，黑色实线为不给予免疫治疗（净收益=0），灰色虚线为给予所有患者免疫治疗，蓝色虚线为基于 PD-L1 CPS 决策，红色实线为基于多靶点分型决策，红色阴影区域为临床净获益提升区域（阈值 5%-35%）。

## 2.8 临床转化工具：决策路径与个体化预测

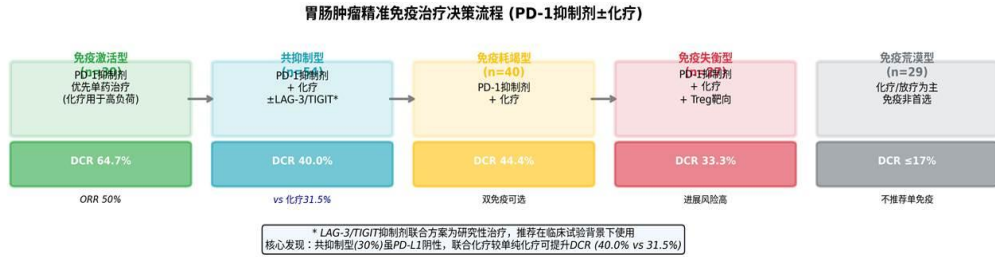
基于上述结果，构建基于免疫分型的精准治疗决策路径（图 7A）。免疫激活型（ $n=30$ ）推荐 PD-1 抑制剂优先单药治疗（化疗用于高负荷），DCR 64.7%，ORR 50%；共抑制型（ $n=54$ ）推荐 PD-1 抑制剂+化疗±LAG-3/TIGIT 抑制剂，DCR 40.0%（vs 化疗 31.3%）；免疫耗竭型（ $n=40$ ）推荐 PD-1 抑制剂+化疗，双免疫可选；免疫失衡型（ $n=27$ ）推荐 PD-1 抑制剂+化疗+Treg 靶向治疗，DCR 33.3%，进展风险高；免疫荒漠型（ $n=29$ ）推荐化疗/放疗为主，免疫非首选，DCR $\leq$ 17.2%，不推荐单免疫治疗。核心发现：共抑制型虽占 30.0%且多为 PD-L1 阴性，但联合化疗较单纯化疗可提升 DCR（40.0% vs 31.3%）。

列线图（Nomogram）个体化风险评分工具（图 7B）整合免疫分型评分（0-100 分）、ECOG 评分（0-2 分）和 CEA 水平（0-5-10-20-50 ng/mL）三个变量，通过计算总评分可个体化预测 6 个月 PFS 率。该模型使临床医师能够根据患者具体特征进行可视化风险评估。

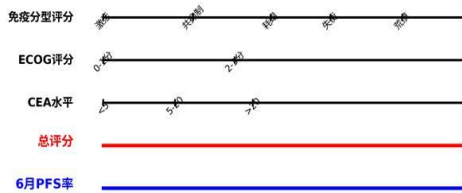
患者重新分类分析（图 7C）显示，在 72 例 PD-L1 阳性患者中，分型体系进一步细分为激活型 25 例、共抑制型 18 例、荒漠型 23 例等；在 108 例 PD-L1 阴性患者中，识别出共抑制型 36 例等。关键发现：28.3%（31/108）的 PD-L1 阴性患者经分型识别为共抑制型，此类患者可从联合免疫治疗中获益，突破了传统 PD-L1 筛选的局限性。

Figure 5: 临床转化工具：决策路径与个体化预测  
Clinical Decision-Making Tools and Risk Stratification

A. 基于免疫分型的精准治疗决策路径



B. 列线图：个体化风险评分工具



C. 患者重新分类：从PD-L1到五型分型

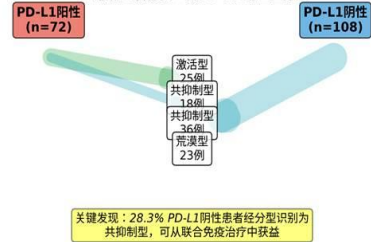


图 7 临床转化工具：决策路径与个体化预测

Figure 7 Clinical Decision-Making Tools and Risk Stratification

图注： A. 基于免疫分型的精准治疗决策路径：五型分别标注推荐治疗方案、DCR 及 ORR，共抑制型标注核心发现（联合免疫较单纯化疗提升 DCR）； B. 列线图：个体化风险评分工具，整合免疫分型评分、ECOG 评分和 CEA 水平三个变量，通过绘制垂直线计算总评分，对应 6 个月 PFS 率预测值； C. 患者重新分类：从 PD-L1 到五型分型，桑基图展示 PD-L1 阳性 (n=72) 和阴性 (n=108) 患者经多靶点分型后的重新分布，黄色框标注关键发现 (28.3% PD-L1 阴性患者识别为共抑制型，可从联合免疫治疗中获益)。

### 3、讨论

本研究通过新增 Treg 标志物 Foxp3，构建了更全面的胃癌肿瘤免疫微环境分型体系，将患者分为 5 个亚型，进一步细化了免疫微环境的功能状态。相较于传统仅关注免疫检查点分子的分型方法，本体系纳入免疫细胞亚群比例指标，更深刻地反映了肿瘤与免疫系统的相互作用。共抑制型患者占比 30.0%，均为 MSS/pMMR 型，单纯化疗疗效差，但具备中高 T 细胞浸润特征，理论上适合 PD-1 抑制剂联合 LAG-3/TIGIT 抑制剂治疗，这为传统治疗无效的患者提供了新方向。新增的免疫失衡型以 Foxp3 高表达为特征，此类患者 Treg 大量浸润，效应 T 细胞功能被抑制，疾病进展风险高，提示需采用靶向 Treg 的联合治疗策略，如免疫检查点抑制剂联合 Treg 耗竭药物<sup>[9-12]</sup>。

本研究通过构建包含 CD8、PD-L1、LAG-3、TIGIT 及 Foxp3 的多靶点检测体系，创新性地将效应 T 细胞浸润水平、经典免疫检查点通路、新型共抑制分子表达及免疫调节细胞亚群占比纳入同一分析维度，实现了胃肠肿瘤免疫微环境的精细化分型。相较于传统单一标志物检测或仅关注免疫检查点分子的分型策略，本研究的核心突破在于从“单一通路评估”升级为“免疫微环境全景刻画”，为解析胃肠肿瘤免疫逃逸机制、优化精准治疗方案提供了全新的技术路径与理论依据。从技术创新性层面分析，本研究突破了传统检测技术的局限性。既往基于 PD-L1 CPS 或 MSI 状态的筛选体系，仅能反映免疫微环境的局部特征，无法解释 MSS/pMMR 型胃肠肿瘤中存在的免疫治疗响应异质性。本研究通过整合效应 T 细胞功能、免疫检查点分子表达谱及 Treg 介导的免疫抑制作用三大核心要素，构建了多维度评估模型。该模型不仅实现了对“热肿瘤”“冷肿瘤”的经典分类，更细分出共抑制型与免疫失衡型等具有明确治疗指导价值的亚型。尤为关键的是，新增的 Foxp3 指标并非简单补充，而是通过计算 CD8/Foxp3 比值，量化了效应 T 细胞与调节性 T 细胞的功能平衡状态，为判断免疫微环境的“可逆性”提供了关键依据。这一设计弥补了传统分型仅关注细胞浸润数量、忽视功能状态的缺陷，使分型结果更贴近临床治疗需求。

从临床意义层面探讨，本研究的分型体系为解决 MSS/pMMR 型胃肠肿瘤免疫治疗困境提供了重要突破口。临床数据显示，超过 90% 的胃肠肿瘤患者为 MSS/pMMR 型，此类患者对 PD-1/PD-L1 单药治疗的响应率不足 15%，传统化疗疗效也十分有限<sup>[13,14]</sup>。本研究明确了共抑制型亚型占比高达 30.0%，该亚型患者具备中-高 T 细胞浸润特征，但因 LAG-3/TIGIT 通路主导免疫抑制，导致单纯化疗疾病控制率仅为 31.5%。这一发现揭示了部分 MSS/pMMR 型患者化疗耐药的免疫机制，同时为其制定 PD-1 抑制剂联合 LAG-3/TIGIT 抑制剂的双免疫治疗策略提供了直接依据。此外，本研究首次定义的免疫失衡型亚型，以 Foxp3 高表达、CD8/Foxp3 比值  $< 2$  为核心特征，此类患者疾病进展风险显著升高，且对现有免疫治疗方案响应不佳。这提示靶向 Treg 的治疗手段，如 Treg 耗竭药物、CTLA-4 抑制剂等，可能成为该亚型患者的潜在治疗方向，为拓展胃肠肿瘤免疫治疗的适用人群提供了新思路。

从分型体系的临床价值角度分析，本研究证实多靶点分型与患者临床特征的关联性显著优于传统 PD-L1 CPS ( $r=0.523$  vs  $0.205$ )。在 PD-L1 阴性患者中，该分型体系成功识别出 28.3% 的共抑制型潜在获益人群，这部分患者在传统筛选体系中会被直接排除在免疫治疗之外，而本研究为其提供了接受联合免疫治疗的理论依据。同时，在 PD-L1 阳性患者中，免疫激活型亚型的治疗响应率显著高于其他亚型，提示该分型体系可进一步优化 PD-L1 阳性人群的治疗方案选择，避免不必要的联合治疗，降低患者的治疗成本与不良反应风险。这种“分层筛选、精准施策”的模式，真正实现了从“广谱治疗”向“个体化治疗”的转变。

从转化应用前景层面来看，本研究采用的检测技术基于常规免疫组化平台，具有操作简便、成本可控、结果可重复性高的优势，相较于荧光 ROSE、多色免疫荧光等技术更易在基层医疗机构推广。这意味着该分型体系具备大规模临床应用的可行性，能够切实解决临床实践中精准筛选免疫治疗获益人群的痛点问题。此外，本研究通过分析各亚型的核心特征，为不同亚型患者设计了针对性的治疗策略：免疫激活型推荐 PD-1 抑制剂单药治疗；共抑制型推荐 PD-1 抑制剂联合 LAG-3/TIGIT 抑制剂<sup>[15-17]</sup>；免疫耗竭型推荐双免疫联合化疗；免疫失衡型建议探索靶向 Treg 的联合治疗；免疫荒漠型则需通过放疗、靶向、尤其是补充免疫效应细胞治疗等手段重塑免疫微环境<sup>[18,19]</sup>。这种“分型-治疗”的对应模式，为开展前瞻性临床试验提供了明确的研究方向。

本研究仍存在一定的局限性。首先，作为回顾性研究，无法明确免疫分型与治疗疗效之间的因果关系，需进一步开展前瞻性临床试验验证各亚型治疗策略的有效性。其次，研究未纳入患者的长期生存数据，无法分析免疫分型与预后的关联性。最后，本研究未探讨免疫微环境分型的动态变化规律，而肿瘤免疫微环境在治疗过程中可能发生重塑，动态监测分型变化对指导治疗方案调整具有重要意义。

综上所述，本研究构建的多靶点免疫微环境分型体系，在技术层面实现了从“单一指标”到“全景评估”的跨越，在临床层面为解决 MSS/pMMR 型胃肠肿瘤免疫治疗困境提供了新策略，在转化层面具备广泛推广应用的潜力。该研究

不仅为胃肠肿瘤精准免疫治疗提供了重要的参考依据，也为其他实体瘤的免疫微环境研究提供了可借鉴的范式。

#### 4、结论

包含 Treg 标志物的多靶点免疫微环境分型体系可更精准地反映胃肠肿瘤的免疫状态，与患者临床特征及治疗适配性密切相关。该体系能有效区分不同预后人群，识别潜在免疫治疗获益患者，为胃肠肿瘤精准免疫治疗提供了重要的技术工具和理论依据。

#### 参考文献

- [1] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med*. 2015 Jun 25;372(26):2509-20.
- [2] Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science*. 2017 Jul 28;357(6349):409-413.
- [3] Mandal R, Samstein RM, Lee KW, et al. Genetic diversity of tumors with mismatch repair deficiency influences anti-PD-1 immunotherapy response. *Science*. 2019 May 3;364(6439):485-491.
- [4] Sandip Pravin Patel, Razelle Kurzrock. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015,14(4):847-56.
- [5] Tay C, Tanaka A, Sakaguchi S. Tumor-infiltrating regulatory T cells as targets of cancer immunotherapy. *Cancer Cell*. 2023 Mar 13;41(3):450-465.
- [6] Kang JH, Zappasodi R. Modulating Treg stability to improve cancer immunotherapy. *Trends Cancer*. 2023,9(11):911-927.
- [7] Tanaka A, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Res*. 2017 Jan;27(1):109-118.
- [8] Wang J, Gong R, Zhao C, et al. Human FOXP3 and tumour microenvironment. *Immunology*. 2023,168(2):248-255.
- [9] Munn DH, Sharma MD, Johnson TS. Treg Destabilization and Reprogramming: Implications for Cancer Immunotherapy. *Cancer Res*. 2018,78(18):5191-5199.
- [10] Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*. 2019,110(7):2080-2089.

- [11] Yu H, Yang R, Li M, et al. The role of Treg cells in colorectal cancer and the immunotherapy targeting Treg cells. *Front Immunol.* 2025,16:1574327.
- [12] Shan F, Somasundaram A, Bruno TC, et al. Therapeutic targeting of regulatory T cells in cancer. *Trends Cancer,* 2022,8(11):944-961.
- [13] Yang W, Zheng H, Lv W, et al. Current status and prospect of immunotherapy for colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis.* 2023,38(1):266.
- [14] Ooki A, Osumi H, Yoshino K, et al. Potent therapeutic strategy in gastric cancer with microsatellite instability-high and/or deficient mismatch repair. *Gastric Cancer.* 2024,27(5):907-931.
- [15] Cai L, Li Y, Tan J, et al. Targeting LAG-3, TIM-3, and TIGIT for cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol.* 2023,16(1):101.
- [16] Joller N, Anderson AC, Kuchroo VK. LAG-3, TIM-3, and TIGIT: Distinct functions in immune regulation. *Immunity.* 2024,57(2):206-222.
- [17] Zuo S, Wei M, Xu T, et al. An engineered oncolytic vaccinia virus encoding a single-chain variable fragment against TIGIT induces effective antitumor immunity and synergizes with PD-1 or LAG-3 blockade. *J Immunother Cancer,* 2021 ,9 (12):e002843.
- [18] Lin GT, Yan C, Li LJ, et al. Combining Apatinib and Oxaliplatin Remodels the Immunosuppressive Tumor Microenvironment and Sensitizes Desert-Type Gastric Cancer to Immunotherapy. *Cancer Res.* 2025,85(11):2117-2133.
- [19] Li M, Lu L, Bao Q, et al. Radiotherapy-derived engineered stem cell exosomes improve anti-glioma immunotherapy by promoting the formation of tertiary lymphoid structure and improve the release of type I interferon. *J Nanobiotechnology.* 2025,23 (1):239.