

放疗抗肿瘤免疫调节作用

李 丽, 张大昕

(哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:放疗是一种免疫调节工具,具有免疫刺激作用,越来越多的证据表明放疗通过诱导特异性 T 细胞的启动、激活免疫系统、改善肿瘤微环境、增加淋巴细胞介导的细胞毒性的敏感性,增加抗肿瘤免疫反应,回顾了近年来将放疗与免疫治疗特别是免疫检查点阻滞剂相结合具有协同作用的临床前试验和临床试验,以供临床参考。

关键词:放射疗法;免疫调节;T 细胞;干扰素;肿瘤微环境;免疫检查点;免疫治疗

中图分类号:R730.55 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2020)05-0381-05

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2020.05.B003

Immunomodulatory Effect of Cancer Radiotherapy

LI Li, ZHANG Da-xin

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: Radiotherapy is widely used for cancer treatment and it also has immunomodulatory effects. Increasing evidence has revealed that radiotherapy induces the activation of specific T cells, activates the immune system, improves the tumor microenvironment, increases the sensitivity of lymphocyte-mediated cytotoxicity and regulates the expression of the immune checkpoint to exert an anti-tumor immune response. This article summarizes how radiotherapy regulates the immune function of the body and increases the anti-tumor immune response, and also reviews recent preclinical and clinical studies on the combination of radiotherapy with immunotherapy, especially immunotherapy with immunotherapy, especially immunotherapy with immunotherapy.

Subject words: radiotherapy; immune regulation; T cells; interferon; tumor microenvironment; immune checkpoints; immunotherapy

放射治疗是指用放射线治疗恶性肿瘤或治疗良性病变的临床策略,给予肿瘤精确剂量照射的同时尽可能地保护周围正常组织为目的。约 50%~70% 肿瘤患者在病程中需要放疗。因此,对于晚期或复发性癌症患者,放疗是一种双赢的治疗方法^[1]。过去,放疗被认为主要是免疫抑制剂,然而,多种肿瘤类型的远隔效应的发现已经改变了人们对放疗在免疫系统中的作用的理解,放疗通过一系列错综复杂的机制影响机体的免疫作用。在免疫治疗的年代,免疫疗法已经改善了许多血液疾病和实体恶性肿瘤的患者的预后^[2]。一系列临床试验正在探索放射免疫疗法组合的有益效果,对放疗的免疫刺激作用研究越来越多,关于放射免疫相结合的全身抗肿瘤作用引起越

来越多的关注。

1 辐射通过树突状细胞诱导肿瘤抗原特异性 T 细胞的启动

越来越多的证据表明,辐射通过促进树突状细胞介导肿瘤抗原特异性 T 细胞启动。辐射促进癌细胞死亡,导致 DNA 释放,其释放损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs),引发免疫原性细胞死亡(ICD),这些 DAMPs 包括^[3]:(1)钙网蛋白(CRT):易位至质膜外层,促进树突状细胞(dendritic cell, DC)的吞噬作用;(2)ATP 释放:DC P2X7 嘌呤能受体的激活剂,其触发 DC 炎性体激活,IL-1 β 分泌,以及随后引发产生干扰素 γ (IFN- γ)的 CD8+T 细胞^[4];(3)高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)的释放:已被证明作为 Toll 样受体 4 (TLR-4) 激动

通信作者:张大昕,肿瘤科主任,主任医师,博士;哈尔滨医科大学附属第一医院肿瘤科,黑龙江省哈尔滨市南岗区邮政街(150001);E-mail:daxinmay@126.com

收稿日期:2019-09-11;修回日期:2019-10-12

剂,其促进抗原呈递^[5]。这些发现证实了辐射可以将肿瘤转化为原位疫苗,共同促进 DC 成熟和活化,将 DC 转化为专职抗原呈递细胞(APC),肿瘤相关抗原的呈递增加,导致肿瘤特异性 T 细胞的启动增加。

2 辐射通过 cGAS-STING 诱导干扰素激活先天性和适应性免疫系统

辐射损伤将核 DNA 释放到胞质溶胶中,通过触发 cGAS-STING 途径来激活抗肿瘤免疫应答^[6]。干扰素(IFN)在辐射增强抗肿瘤反应中起着重要作用, I 型干扰素(IFN- α 和 IFN- β),以抗病毒反应和连接先天免疫和适应性免疫的关键介质而闻名。干扰素基因刺激因子 STING 是先天免疫反应的一部分, cGAS 是细胞溶质 DNA 的传感器,在这个过程中, cGAS 被辐射引起的 DNA 损伤激活, cGAS 产生第二信使 cGAMP 激活 STING,通过 STING-NF κ B 信号通路上调 I 型干扰素(IFN- I)基因的转录^[7]。STING 激动剂的可能增强放疗诱导的全身免疫反应,Chon 等^[8]证实了结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中独特的 STING 表达,并证明其在生存结局中的独立预后价值,在 CRC 中,STING 可能成为增强肿瘤免疫应答的潜在治疗靶点。然而,STING 在癌症免疫治疗中的作用仍然存在争议,有必要进行其他研究以评估 STING 通路在实体瘤内的免疫调节作用。此外, I 型干扰素还可在 DC 的适应性免疫反应中发挥交叉启动作用, I 型 IFN 促进 DC 交叉启动和产生细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)^[9],发现此类分子事件对于诱导抗肿瘤细胞毒性 T 细胞至关重要。值得注意的是,细胞溶质 DNA 积累与 DNA 核酸外切酶(TREX1)表达有关,而 TREX1 表达与辐射剂量有关,单次高剂量时, TREX1 上调,溶质 DNA 减少,导致 I 型 IFN 分泌减少^[10]。因此,辐射方案的不同可能影响 I 型 IFN 分泌,从而影响机体的全身抗肿瘤免疫反应,在临床中制定放疗计划时应予以充分考虑。

3 辐射调节肿瘤免疫微环境

肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM): 在肿瘤基质内, TAM 表型具有可塑性, M1 TAM 被认为具有促炎症并且抗肿瘤反应, 而 M2

TAM 促进血管生成,促进肿瘤生长^[11]。多项研究已经证明在单次高剂量和大分割放疗治疗后向 M2 极化,从而促进肿瘤生长^[12]。低剂量辐射促进 M2 TAM 向 iNOS+ M1 TAM 的极化,导致 T 细胞募集以及最终肿瘤排斥,在低剂量辐射后的胰腺癌小鼠模型中,证实了 iNOS+ M1 巨噬细胞通过 CTL 细胞募集介导肿瘤杀伤^[13]。辐射对巨噬细胞极化的影响可能与放疗剂量和分割方式有关,在临床放疗过程中除了考虑肿瘤的治疗外,也应充分关注机体免疫反应,以达到最佳的肿瘤控制。

调节性 T 细胞(Treg): 已知 Tregs 与各种癌症亚型的不良预后相关。有研究表明, Treg 细胞比其他淋巴细胞更能抵抗辐射, 局部或全身辐射后导致 Treg 细胞优先增加^[14]。而另一项研究中,在表达抗原 OVA 的 B16 鼠黑色素瘤的鼠模型中,与单剂量相比,中等剂量分割放疗后观察到 Treg 种群在该剂量分割方案中最低,并且肿瘤控制最佳^[15]。通过消除 Treg 细胞显示 Treg 细胞群体对辐射反应的重要性,其大大增强了辐射诱导的肿瘤消退。Schoenhals 等^[16]发现 Treg 在肿瘤部位表达高水平糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子相关蛋白(GITR),抗 GITR 治疗优先在肿瘤部位消耗 Tregs,并且将该疗法与放疗和抗 PD-1 疗法相结合产生了全身抗肿瘤反应。由此可见, Treg 变化可能取决于辐射剂量和分割方式,虽然 Treg 细胞具有一定的耐辐射性,但是合适的中剂量分割方案可能导致其水平的降低,更有利于机体免疫的激活,有利于临床预后,未来需要更大规模研究探索辐射对免疫抑制群体的负向调节作用。

此外,辐射可以诱导 TGF- β 活化增加, TGF- β 通过削弱树突细胞的抗原呈递功能和 T 细胞的交叉启动而发挥免疫抑制功能^[17]。在临床前模型中,阻断 TGF- β 可以增强辐射抗肿瘤反应,在 4T1 和 TSA 乳腺癌的两个小鼠肿瘤模型中,局部放疗与 TGF- β 中和组合诱导的 DC 活化和肿瘤特异性 T 细胞启动增加^[18]。因此,结合放疗和 TGF- β 阻断可能是合理的抗肿瘤策略。

4 辐射增加淋巴细胞介导的细胞毒性的敏感性

癌症可以下调 MHC-1 表达,导致效应 T 细胞识

别减少,从而逃避免疫检测。体外研究表明,通过辐射后肽库增加和随后的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的激活,导致抗原呈递和细胞毒性T细胞识别,辐射以剂量依赖性方式上调MHC-I表达^[19]。最近,Zeng等^[20]通过非小细胞肺癌细胞免疫组化,进一步证实放疗上调MHC-I分子表达,MHC-I分子的表达与浸润CD8+T细胞呈正相关。因此,辐射可提高肿瘤的MHC-I水平,增加免疫介导的攻击。

此外,辐射通过增强NK受体NKG2D和NKP30的肿瘤配体表达,增加了其对NK细胞介导的细胞毒性^[21-22]。另有研究证实高剂量、大分割放疗通过肿瘤细胞上调Fas表达,导致通过Fas/FasL依赖性机制增加CD8+T细胞裂解作用^[23]。

5 辐射调节免疫检查点的表达

辐射可调节肿瘤微环境中癌细胞和免疫细胞表面免疫检查点分子的表达水平。一方面,辐射激活T细胞表面CTLA-4和PD-1蛋白的表达,抗原呈递细胞T细胞上CTLA-4与其受体B-7的结合下调T细胞活化和增殖,导致免疫抑制^[24]。PD-1信号通路也抑制T细胞增殖和功能。另一方面,辐射后PD-L1表达上调,已经证实,分割放疗后PD-L1增加是由CD8+T细胞发出的IFN- γ 介导的^[25]。Derer等^[26]研究了放疗、化疗和化放疗对多种小鼠肿瘤细胞系中PD-L1表达的影响,发现标准分割和大分割放疗导致黑色素瘤和胶质母细胞瘤细胞系中PD-L1表达显著性增加。最近,临床前研究表明,辐射可通过4种途径诱导PD-L1上调:(1)IFN- γ 信号;(2)EGFR通路;(3)DNA损伤信号通路;(4)cGAS-STING通路^[27]。然而,辐射和PDL1诱导之间的确切关系还没有完全阐明。

6 结合免疫治疗优化放疗

在过去几年中,阻断控制T细胞活化的关键检查点的几种抗体已被FDA和EMA批准用于多种肿瘤。放疗与免疫治疗协同作用,通过不同的机制促进有效的抗肿瘤免疫反应,并且在辐射场之外发挥作用(即所谓的远隔效应)。越来越多的接受放射治疗和免疫治疗的黑色素瘤、NSCLC、乳腺癌患者中发现

了远隔效应^[28-30]。

免疫治疗药物可大致分为两大类,第一类通过共抑制检查点靶向肿瘤的免疫耐受:抗-CTLA-4,抗-PD-1/PD-L1抗体;第二类直接刺激免疫原性途径:细胞因子、CAR T细胞。

GM-CSF是一种细胞因子,有证据表明在放疗治疗与皮下GM-CSF相结合的试验中,各种实体瘤患者的照射区域外转移缩小,26%患者出现了远隔效应^[31]。最近,一项回顾性研究粒细胞集落刺激因子联合高剂量阿糖胞苷、环磷酰胺和全身照射在骨髓恶性肿瘤异基因造血细胞移植中的意义,被证实是一种有前途的调节方案,但是样本量有限,需要更大规模的前瞻性研究来验证这些结果^[32]。同样,在转移性乳腺癌模型中证实了局部放射与全身性TGF- β 阻断相结合引起外周血单核细胞和中枢记忆CD8+T细胞计数增加以及产生远隔效应^[33]。放疗和细胞因子联合治疗已在临床中得到很好的应用,并且取得了瞩目的成绩,然而,使用细胞因子在患者中诱导了严重的毒性反应,这极大地限制了这些佐剂在临床试验中的应用。

在PD1/PD-L1当前时代,越来越多的研究表明放疗与免疫检查点抑制剂(ICB)的协同作用。大多数研究是用单次消融剂量或大分割方案进行的。Dewan等^[34]在小鼠乳腺癌和结肠癌模型中观察到分割放疗联合抗CTLA-4治疗不仅延缓了原发肿瘤的生长,而且增强了远隔效应。在临床前研究中,将抗PD-1和放疗分别单独或联合应用于胶质母细胞瘤小鼠模型,结果证实联合治疗的中位生存期比单独治疗更好^[35]。Twyman-Saint等^[36]探索了双重抗CTLA-4和抗PD-1/PD-L1阻断联合放疗的免疫学机制,发现抗CTLA-4阻断主要抑制Treg细胞,放疗则增强了肿瘤相关淋巴细胞T细胞的多样性,而抗PD-L1阻断逆转了T细胞衰竭,促进了CD8/Treg比值的升高^[36]。与单纯使用任何一种药物相比,放疗与抗CTLA4和抗PD-1/PD-L1阻断剂的组合产生了更好的疗效,但是,由于多种原因,包括物种之间固有的免疫学差异以及小鼠和人类之间肿瘤大小的广泛差异,如果无临床验证,无法将鼠模型的发现外推至人类癌症。因此,需要进一步研究和临床试验来评估这些策略的结果。

目前正在进行大量临床试验以评估检查点抑制

和放疗的组合。KEYNOTE-001 试验对晚期 NSCLC 患者的回顾性分析显示,接受过放疗和免疫治疗的患者有更长的 PFS 和更长的 OS^[37]。最近在 2018 ASCO 上发表的 PEMBRO-RT 试验的初步数据显示,与单用 Pembrolizumab 治疗相比,联合 SABR 治疗的 ORR 更高,而且联合治疗耐受性良好^[38]。作为放疗对 ICB 增强作用的进一步证据,放射免疫联合治疗的前瞻性试验报告了多种癌症类型的安全性和有效性方面的令人鼓舞的数据^[39]。此外,放疗、抗 CTLA-4 和抗 PD-L1 的三种组合正在进行试验,可能对抗肿瘤免疫反应具有互补作用。尽管在临床试验中取得了令人鼓舞的结果,但大多数患者对放疗免疫联合治疗无反应,与免疫相结合,需充分考虑放疗剂量、分割方式、免疫药物的选择及联合治疗的毒性反应,以增强其局部和全身的抗肿瘤效果。Protopapa M 等^[40]评估剂量、分割以及顺序等不同治疗参数对于放疗治疗效果及提高治疗率的影响。但目前有关这种效应的高层次证据是有限的,在未来的临床试验中必须考虑放射治疗计划的各方面,正在进行的工作似乎有希望确定放疗和 ICB 联合最佳受益患者。此外,免疫放射疗法的毒性特征似乎可以接受并且可以控制,但是,建议密切监视安全性。

放疗复杂的免疫调节机制可能从局部治疗转变为癌症的全身治疗,从而增强机体全身抗肿瘤作用。大分割放射治疗如 SBRT 似乎更能诱导机体免疫反应。大量研究表明放射疗法和免疫疗法联合应用于恶性肿瘤的治疗是肿瘤学的一个重大突破,可以改善预后不良。然而,更好的药物放疗组合、最佳时间、最优序列、辐射剂量和分割方式及放射治疗目标体积尚未确定,仍需要进行更大规模的临床试验。

参考文献:

- [1] Sharma Ricky A, Plummer Ruth, Stock Julie K, et al. Clinical development of new drug-radiotherapy combinations[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2016, 13(10):627-642.
- [2] Kruger Stephan, Ilmer Matthias, Kobold Sebastian, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 – latest trends [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):268.
- [3] Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, et al. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(12):860-875.
- [4] Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, et al. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways[J]. *Frontiers in Oncology*, 2012, 2:88.
- [5] Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy [J]. *Nature Medicine*, 2007, 13(9):1050-1059.
- [6] Deng Liufu, Liang Hua, Xu Meng et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing promotes radiation-induced type I interferon-dependent antitumor immunity in immunogenic tumors.[J]. *Immunity*, 2014, 41(5):843-852.
- [7] Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS – STING pathway of cytosolic DNA sensing [J]. *Nature Immunology*, 2016, 17(10):1142-1149.
- [8] Chon Hong Jae, Kim Hyojoong, Noh Jung Hyun, et al. STING signaling is a potential immunotherapeutic target in colorectal cancer[J]. *J Cancer*, 2019, 10(20):4932-4938.
- [9] Burnette Byron C, Liang Hua, Lee Youjin, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(7):2488-2496.
- [10] Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity[J]. *Nature Communications*, 2017, 8:15618.
- [11] Lamagna Chrystelle, Aurrand-Lions Michel, Imhof Beat A. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(4):705-713.
- [12] Tsai CS, Chen FH, Wang CC, et al. Macrophages from irradiated tumors express higher levels of iNOS, arginase-I and COX-2, and promote tumor growth[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007, 68(2):499-507.
- [13] Klug F, Prakash H, Huber PE, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an INOS (+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(5):589-602.
- [14] Kachiw Evelyn L, Iwamoto Keisuke S, Liao Yu-Pei, et al. Radiation enhances regulatory T cell representation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2011, 81(4):1128-1135.
- [15] Schae D, Ratikan JA, Iwamoto KS, et al. Maximizing tumor immunity with fractionated radiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2012, 83(4):1306-1310.
- [16] Schoenhals Jonathan E, Cushman Taylor R, Barsoumian Hampartsoum B, et al. Anti-glucocorticoid-induced tumor necrosis factor-related protein (GITR) therapy overcomes radiation-induced treg immunosuppression and drives abscopal effects[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:2170.
- [17] Rodriguez-Ruiz María E, Rodriguez I, Leaman Olwen, et al. Immune mechanisms mediating abscopal effects in radioimmunotherapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 196:195-203.
- [18] Vanpouille-Box Claire, Diamond Julie M, Pilonis Karsten

- A, et al. TGF β is a master regulator of radiation therapy-induced antitumor immunity[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(11): 2232–2242.
- [19] Reits EA, Hodge JW, Herberts CA, et al. Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy [J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, 203 (5): 1259–1271.
- [20] Zeng Hai, Zhang Weijia, Gong Yan, et al. Radiotherapy activates autophagy to increase CD8⁺ T cell infiltration by modulating major histocompatibility complex class-I expression in non-small cell lung cancer[J]. *J Int Med Res*, 2019, 47 (8): 3818–3830.
- [21] Kim Joo-Young, Son Young-Ok, Park Soon-Won, et al. Increase of NKG2D ligands and sensitivity to NK cell-mediated cytotoxicity of tumor cells by heat shock and ionizing radiation[J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(5): 474–484.
- [22] Matta Jessica, Baratin Myriam, Chiche Laurent, et al. Induction of B7–H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions [J]. *Blood*, 2013, 122(3): 394–404.
- [23] Arnold Kimberly M, Flynn Nicole J, Raben Adam, et al. The impact of radiation on the tumor microenvironment: effect of dose and fractionation schedules [J]. *Cancer Growth Metastasis*, 2018, 11: 1179064418761639.
- [24] Camacho, Luis H. CTLA-4 blockade with ipilimumab: biology, safety, efficacy, and future considerations[J]. *Cancer Medicine*, 2015, 4(5): 661–672.
- [25] Dovedi Simon J, Adlard Amy L, Lipowska-Bhalla Grazyna, et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(19): 5458–5468.
- [26] Derer Anja, Spiljar Martina, Bäumler Monika, et al. Chemoradiation increases PD-L1 expression in certain melanoma and glioblastoma cells[J]. *Front Immunol*, 2016, 7: 610.
- [27] Sato Hiro, Okonogi Noriyuki, Yoshimoto Yuya, et al. Radiotherapy and PD-L1 Expression[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2019, 46(5): 845–849.
- [28] Koller KM, Mackley HB, Liu J, et al. Improved survival and complete response rates in patients with advanced melanoma treated with concurrent ipilimumab and radiotherapy versus ipilimumab alone[J]. *Cancer Biology & Therapy*, 2017, 18(1): 36–42.
- [29] Wrona A. Role of immunotherapy in stage III non-small cell lung cancer[J]. *Current Opinion in Oncology*, 2019, 31 (1): 18–23.
- [30] Jiang Di Maria, Fyles Anthony, Nguyen Linh T, et al. Phase I study of local radiation and tremelimumab in patients with inoperable locally recurrent or metastatic breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(31): 2947–2958.
- [31] Golden EB, Chhabra A, Chachoua A, et al. Local radiotherapy and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to generate abscopal responses in patients with metastatic solid tumours; a proof-of-principle trial [J]. *The Lancet Oncology*, 2015, 16(7): 795–803.
- [32] Nakamura Y, Tanaka Y, Tanaka M, et al. Significance of granulocyte colony-stimulating factor-combined high-dose cytarabine, cyclophosphamide, and total body irradiation in allogeneic hematopoietic cell transplantation for myeloid malignant neoplasms[J]. *Transplantation Proceedings*, 2019, 51(3): 896–900.
- [33] Formenti Silvia C, Lee Percy, Adams Sylvia, et al. Focal irradiation and systemic TGF β blockade in metastatic breast cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2018, 24(11): 2493–2504.
- [34] Dewan MZ, Galloway AE, Kawashima N, et al. Fractionated but not single-dose radiotherapy induces an immune-mediated abscopal effect when combined with anti-CTLA-4 antibody [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15 (17): 5379–5388.
- [35] Zeng Jing, See Alfred P, Phallen Jillian, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013, 86(2): 343–349.
- [36] Twyman-Saint Victor Christina, Rech Andrew J, Maity Amit, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer[J]. *Nature*, 2015, 520(7547): 373–377.
- [37] Shaverdian Narek, Lisberg Aaron E, Bornazyan Krikor, et al. Previous radiotherapy and the clinical activity and toxicity of pembrolizumab in the treatment of non-small-cell lung cancer; a secondary analysis of the KEYNOTE-001 phase 1 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2017, 18(7): 895–903.
- [38] Theelen W, Peulen H, Lalezari F, et al. Randomized phase II study of pembrolizumab after stereotactic body radiotherapy (SBRT) versus pembrolizumab alone in patients with advanced non-small cell lung cancer; the PEMBRO-RT study[J]. *J Clin Oncol*, 2018, 36: 9023.
- [39] Leeman Jonathan E, Schoenfeld Jonathan D. Radiation therapy and immune modulation [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2019, 33(2): 233–248.
- [40] Protopapa M, Kouloulas V, Kougiumtzopoulou A, et al. Novel treatment planning approaches to enhance the therapeutic ratio; targeting the molecular mechanisms of radiation therapy[J]. *Clin Transl Oncol*, 2019, undefined: undefined.