DOI:10.16016/j.2097-0927.202402064

锰佐剂通过重塑免疫微环境促进放疗的抗肿瘤作用

成佳楠[1,2],郭金铭[2,3],贾馨竹[1,2],朱 波[1,2,3] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院:肿瘤科[1],肿瘤免疫治疗重庆市重点实验室[2];400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院[3]

[摘要] **目的** 探索锰佐剂在放疗抗肿瘤作用中的增敏效应及其可能机制。**方法** 选取6~8周龄的雄性C57BL/6小鼠(体质量为20~23 g)300只,通过皮下接种肿瘤细胞构建动物模型,按随机数字表法分为4组:对照组、放疗组、锰佐剂治疗组、放疗与锰佐剂联合治疗组;荷瘤第9天起每隔1 d通过滴鼻给予锰佐剂(10 μg/只)治疗,共4次;第10天给予肿瘤局部单次20 Gy放疗,定期监测小鼠的肿瘤生长及生存状况。通过构建单侧皮下荷瘤模型明确锰佐剂对放疗抗肿瘤作用的增敏效应;构建双侧皮下荷瘤模型观察锰佐剂对放疗诱导的远端效应;采用流式细胞术检测单侧皮下荷瘤模型(MC38-OVA)肿瘤浸润免疫细胞的改变,采用免疫组化染色检测单侧皮下荷瘤模型小鼠的脾脏功能。**结果** 基于多瘤种单侧皮下荷瘤模型重复验证,显示锰佐剂联合放疗可显著抑制肿瘤生长,延长小鼠生存期($P<0.05$);双侧皮下荷瘤模型结果显示,锰佐剂可增强放疗引起的远端效应,无论是否进行放疗,两侧肿瘤均出现明显缩退($P<0.05$);流式细胞术检测发现,锰佐剂可进一步增加放疗诱导的$CD8^+$T细胞浸润($P<0.05$),且可降低放疗引起的Treg细胞和MDSC细胞浸润($P<0.05$);小鼠脾脏的病理观测结果显示锰佐剂可增加脾脏的淋巴细胞储备,改善脾脏功能。**结论** 锰佐剂可作为放疗的增敏剂,通过改善脾脏功能重塑肿瘤微环境协同抗肿瘤。

[关键词] 放射治疗;锰佐剂;远端效应;增敏剂
[中图法分类号] Q581; R392.11; R730.55 [文献标志码] A

Manganese promotes anti-tumor effect of radiotherapy through reshaping the immune microenvironment

CHENG Jianan[1,2], GUO Jinming[2,3], JIA Qingzhu[1,2], ZHU Bo[1,2,3] [1]Department of Oncology, Institute of Cancer, [2]Chongqing Key Laboratory of Tumor Immunotherapy, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [3]Institute of Life Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the sensitizing effect of manganese for radiotherapy against tumors and its possible mechanisms. **Methods** A total of 300 male C57BL/6 mice (6~8 weeks old, weighing 20~23 g) with subcutaneous tumor were randomly divided into 4 groups: control group, radiotherapy group, manganese treatment group, and combined radiotherapy and manganese treatment group. Nasal drip with 10 μg manganese adjuvant was applied to the mice from the latter 2 groups on day 9 of tumor bearing, then single dose of 20 Gy radiation was locally administered on day 10. Tumor growth and mouse survival were monitored regularly. The sensitizing effect of manganese on radiotherapy was determined by monitoring and comparing the tumor growth among different unilateral mouse models. Bilateral tumor-bearing model was used to examine the effect of manganese on abscopal effects induced by radiotherapy. Flow cytometry was used to illustrate the changes in tumor-infiltrating immune cells in unilateral tumor bearing model. Immunohistochemical staining was employed to evaluate the spleen function in unilateral tumor bearing mice. **Results** Based on repeated validation of 3 different unilateral tumor-bearing models, radiotherapy combined

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(82102878);中国博士后科学基金面上资助项目(2023M734252);重庆市博士后研究项目特别资助(2022CQBSHTB2013)

[通信作者] 朱 波,E-mail:bo.zhu@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

with manganese therapy significantly inhibited tumor growth and prolonged survival of mice ($P<0.05$). The results of bilateral tumor-bearing model showed that manganese therapy enhanced abscopal effects of radiotherapy, and significant regression was observed in both side of tumor under radiotherapy or not ($P<0.05$). Flow cytometry revealed that manganese further increased radiation-induced $CD8^+$T infiltration ($P<0.05$) and decreased radiation-induced infiltration of Treg cells and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) ($P<0.05$). Furthermore, manganese increased lymphocyte reserve pool of the spleen and improved its function. **Conclusion** Manganese adjuvant could act as a sensitizing agent for radiotherapy, by improving the function of spleen and reprogramming the tumor microenvironment synergistically.

[**Key words**] radiotherapy; manganese adjuvant; abscopal effect; radiation sensitizer

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (82102878), the General Program of Postdoctoral Science Foundation of China (2023M734252), and the Special Funding for Postdoctoral Research Projects of Chongqing (2022CQBSHTB2013). Corresponding author: ZHU Bo, E-mail: bo.zhu@tmmu.edu.cn

放射治疗是一种有效的抗肿瘤手段,在临床上应用广泛。根据美国肿瘤放疗协会(American Society for Radiation Oncology,ASTRO)联合欧洲放疗和肿瘤学协会(European Society for Radiotherapy and Oncology,ESTRO)研究发现,约2/3的肿瘤患者从放疗中获益,而我国50%~60%的肿瘤患者采用单独放疗、联合手术或单独化疗来治疗原发性或转移性肿瘤[1-2]。放疗主要通过释放高能射线产生电离辐射,破坏DNA结构杀死肿瘤细胞。近来研究发现,放疗还可通过激活免疫系统发挥抗肿瘤作用,例如通过Ⅰ型干扰素(interferon,IFN)依赖的途径激活固有免疫并最终加强适应性免疫[3-5]、增加肿瘤新抗原、上调主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex Ⅱ,MHC Ⅱ)表达、增加肿瘤细胞表面死亡受体FAS/CD95和DR5表达[6]、诱导嗜酸性粒细胞浸润促进细胞毒性T淋巴细胞的功能[7]等。进一步研究发现,放疗激活抗肿瘤免疫主要通过激活环磷酰鸟苷-腺苷酸合成酶(cyclic GMP-AMP synthase,cGAS)-干扰素刺激基因(stimulator of interferon genes,STING)信号通路来实现[8]。然而,放疗仍然存在原发性或继发性抵抗的瓶颈问题,因此,通过发展联合治疗新策略,进一步增强放疗抗肿瘤免疫作用,以解决放疗抵抗的实际问题,具有重要临床意义。

锰(Mn)是人体必需的营养微量元素,涉及机体发育、抗氧化防御、生殖和神经元功能等一系列生理过程。Mn一般情况下以二价阳离子形式结合,从而调控多种金属酶的活性发挥作用,包括Mn超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase,GS)、丙酮酸羧化酶和精氨酸酶等[9]。LV等[10]在国际上首次发现并报道了Mn离子可通过增强抗肿瘤免疫抑制肿瘤生长,锰缺乏的小鼠肿瘤生长速度快且转移倾向高,肿瘤内浸润的$CD8^+$T细胞数量和功能显著低于正常小鼠。进一步研究发现,锰离子可直接激活cGAS的酶活性,以非经典方式催化合成第二信使2′3′-cGAMP,高效促进树突状细胞和巨噬细胞成熟并提呈抗原,促进$CD8^+$T细胞和自然杀伤细胞(natural killer,NK)细胞活化,诱导记忆性$CD8^+$T细胞分化,从而激活适应性免疫并产生免疫记忆[11]。因此,推测锰可能通过增强免疫功能从而促进放疗抗肿瘤作用。

本研究利用皮下移植瘤模型,观察锰佐剂对放疗抗肿瘤的增敏作用,并探讨锰佐剂联合放疗对肿瘤免疫微环境的影响,以发展放疗联合治疗新策略,为临床抗肿瘤治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选取6~8周龄雄性C57BL/6小鼠300只,体质量20~23 g,购自陆军军医大学第二附属医院实验动物中心,饲养环境为SPF级,室温维持在24~26 ℃,确保饮食与水源充足。实验方案已通过陆军军医大学实验动物福利与伦理委员会批准(AMUWEC20210386)。

1.2 细胞及培养

小鼠黑色素瘤细胞系(B16-F10)、小鼠结肠癌细胞系(CT26、MC38、MC38-OVA)均购自国家生物医学实验细胞资源库(中国医学科学院基础医学研究所)。B16-F10细胞使用高糖DMEM培养基(美国Thermo Fisher科技公司)+10%胎牛血清(美国Thermo Fisher科技公司)进行培养。CT26、MC38、MC38-OVA细胞使用RPMI 1640培养基(美国Thermo Fisher科技公司)+10%胎牛血清(美国Thermo Fisher科技公司)进行培养。培养环境为恒温培养箱(37 ℃,饱和湿度,5%CO_2),待细胞融合度达到70%~80%时使用胰酶消化,按照1∶3进行传代。待细胞状态良好处于对数生长期时,进行细胞接种实验。

1.3 主要试剂及设备

锰佐剂购自中国启锰生物科技有限公司,10~25 ℃室温避光保存,储存浓度为5 mg/mL,使用前充分混匀再经无菌生理盐水稀释至1 mg/mL,充分重悬后用移

液头滴鼻,每次 10 μL。放疗设备为 RS2000 系列 X 射线生物辐照仪,购自美国 Rad Souce 科技有限公司。流式细胞术使用抗体包含:CD16/32(美国 BD Bioscience 公司,clone 2.4G2)、CD45(美国 BioLegend 公司,clone 30-F11)、CD3(美国 BioLegend 公司,clone 17A2)、CD8(美国 BioLegend 公司,clone 53-6.7)、CD4(美国 BioLegend 公司,clone GK1.5)、CD25(美国 BioLegend 公司,clone PC61)、Foxp3(美国 BioLegend 公司,clone FJK-16S)、CD11b(美国 BioLegend 公司,clone M1/70)、F4/80(美国 BioLegend 公司,clone BM8)、Gr-1(美国 BioLegend 公司,clone R86-8C5)、Fixable Viability Dye eFluor 780(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。流式细胞术使用试剂包含:Ⅳ型胶原酶(美国 Sigma-Aldrich 公司,Cat# 9001-12-1)、DNase Ⅰ(美国 Sigma-Aldrich 公司,Cat# 10104159001)、Fix/Perm solution(美国 BD Bioscience 公司,Cat# 554722)、Count Bright Plus Absolute Beads(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,Cat# C36995)。流式细胞分析仪购自美国贝克曼公司。4%多聚甲醛购自中国碧云天科技有限公司。

1.4 动物模型建立

动物模型建立方法参照文献[7,12],具体如下:在小鼠后肢皮下接种 100 μL 肿瘤细胞(细胞接种量:B16-F10 为 1×10^6 个细胞,CT26、MC38、MC38-OVA 均为 5×10^5 个细胞),荷瘤后第 9 天起每隔 1 d 通过滴鼻给予锰佐剂(10 μg/只,1 mg/mL)处理,共 4 次治疗。荷瘤第 10 天给予肿瘤局部单次 20 Gy 放疗,剂量率为 330 cGy/min,非肿瘤部位由铅板遮挡。双侧荷瘤模型为小鼠双侧后肢分别接种肿瘤细胞,只有右侧肿瘤接受放射治疗,左侧采用铅板遮挡,不接受放射治疗。每 2 天测量 1 次肿瘤大小并绘制生长曲线,同时监测小鼠生存情况。30 只 C57BL/6 小鼠根据不同实验目的按随机数字表法分组为:对照组(Control)、放疗组(RT)、锰佐剂治疗组(Mn)、放疗与锰佐剂联合治疗组(RT+Mn),每组 4~9 只。4 只未荷瘤小鼠(tumor-free)为正常未接种肿瘤细胞的 C57BL/6 小鼠,以该小鼠脾脏的质量作为对照,分析荷瘤小鼠脾脏质量改变情况。肿瘤体积计算公式:肿瘤体积(mm^3)= 长×宽×宽/2。联合治疗结束后即荷瘤后第 16 天,分别取小鼠肿瘤及脾脏,称量后的样本用于流式细胞术或免疫组化检测。

1.5 流式细胞术检测

建立 MC38-OVA 小鼠荷瘤模型,荷瘤第 16 天取肿瘤组织,在含 2% FBS 的预冷 PBS 中充分剪碎,经含有 1 mg/mL 的Ⅳ型胶原酶和 10 μg/mL DNase Ⅰ的 RPMI 1640 培养液于 37 ℃消化 45 min。通过 70 目筛网过滤成单细胞悬液。经 2 200 r/min 离心 2 min,收集细胞悬液加入抗体冰上染色 30 min。经 PBS 重悬离心后制备上样管,使用流式细胞分析仪进行检测。收集 10^6 个肿瘤细胞,去除死细胞、碎片及粘连细胞后进一步圈门,分析以下细胞在肿瘤组织中的浸润情况:$CD8^+$T 细胞($CD45^+CD3^+CD8^+$)、$CD4^+$T 细胞($CD45^+CD3^+CD4^+$)、Treg 细胞($CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$)、肿瘤相关巨噬细胞($CD45^+CD11b^+F4/80^+$)、骨髓来源抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells,MDSC,$CD45^+CD11b^+Gr\text{-}1^+$)。

1.6 免疫组化染色

小鼠肿瘤组织或脾脏取出后,使用预冷的 PBS 溶液冲洗干净,再经 4%多聚甲醛固定 12 h,取直径为 1 cm 以内的肿瘤组织放入包埋盒中进行脱水,依次进入 75%乙醇 1.5 h、95%乙醇 1.5 h、95%乙醇 1 h、无水乙醇 1.5 h、二甲苯一号 0.5 h、二甲苯二号 0.5 h。冷却后,切 5 μm 薄片至载玻片,经 65 ℃恒温箱烤片 1~2 h 后用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining,HE)染色:切片在梯度浓度二甲苯中脱蜡,经高浓度到低浓度乙醇水化后流水冲洗 5 min,苏木精染色 10 min,流水冲洗 10 min,1%盐酸乙醇分化 2 s,流水冲 1 min,伊红染色 30 s。脱水透明封片,用 MoticDSM 软件进行全景扫描。

1.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.0.3 软件进行分析,实验至少重复 3 次。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采取双因素方差分析,两组间比较采用非配对 t 检验,生存分析采用 Log-rank 检验,采用线性回归分析肿瘤质量与脾脏质量的关系。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mn 治疗可增强放疗的抗肿瘤效应

单侧皮下荷瘤动物模型建立见图 1A。与对照组比较,RT 组和 Mn 组可明显抑制黑色素瘤生长($P<0.05$);与 RT 组及 Mn 组比较,RT+Mn 组肿瘤生长最缓慢,受到明显抑制($P<0.05$,图 1B)。同样,RT 组或 Mn 组肿瘤质量明显低于对照组($P<0.05$),RT+Mn 组肿瘤质量则明显低于 RT 组或 Mn 治疗组($P<0.05$,图 1C)。通过比较小鼠生存期发现,RT+Mn 组小鼠生存时间较其他治疗组明显延长($P<0.05$,图 1D)。为了进一步证实上述现象,分别建立了两种不同的结肠癌移植瘤模型(CT26 和 MC38),同样发现 RT+Mn 组肿瘤生长较其他治疗组缓慢,明显受到抑制($P<0.05$,图 1E、F)。以上结果说明,Mn 可增强放疗的抗肿瘤效应。

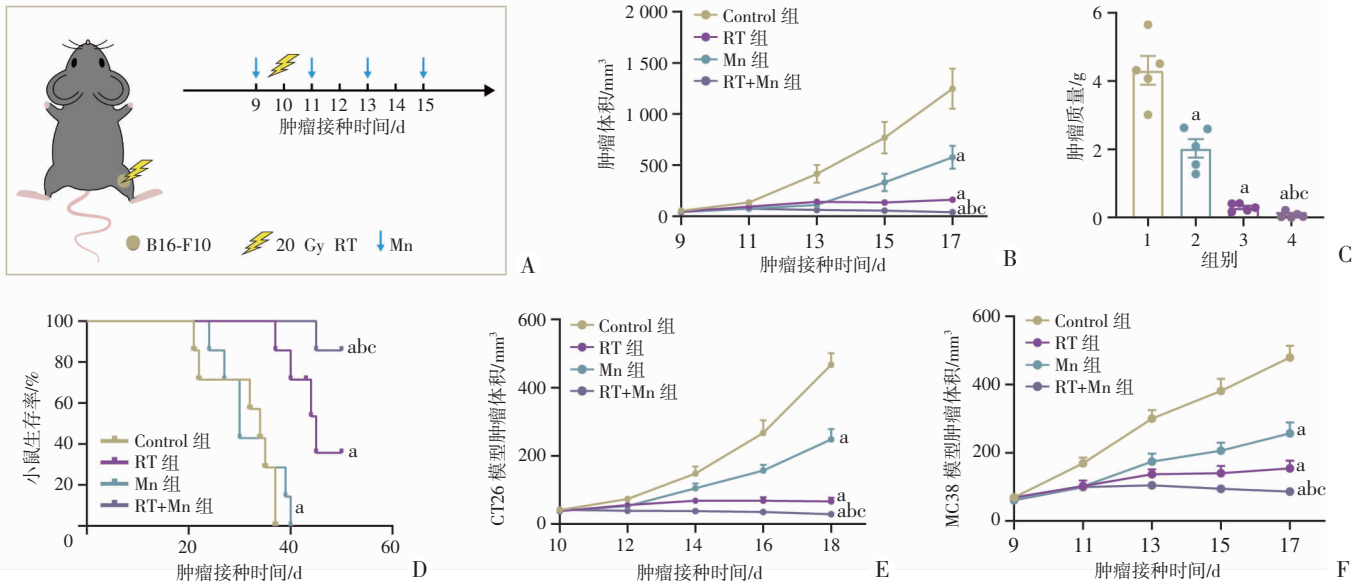
2.2 Mn 治疗可促进放疗诱导的远端效应

基于 Mn 治疗可促进放疗的抗肿瘤效应,进一步检测 Mn 治疗是否可促进放疗诱导的远端效应。首先

建立双侧皮下荷瘤模型(图 2A),观察 Mn 治疗对双侧肿瘤生长的影响。结果发现,RT+Mn 组小鼠的右侧(接受放射治疗)肿瘤生长较 RT 组或 Mn 组明显受到抑制($P<0.05$,图 2B);同时,RT+Mn 组小鼠的左侧(未接受放射治疗)肿瘤较对应 RT 组或 Mn 组也出现明显缩退($P<0.05$,图 2C)。该结果提示 Mn 治疗可促进放疗诱导的远端效应。

2.3　Mn 治疗联合放疗可重塑肿瘤微环境

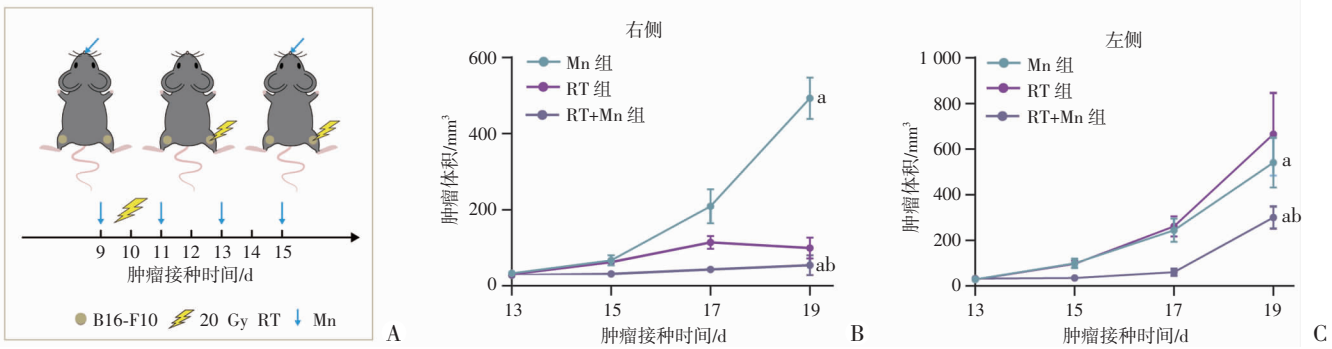
动物模型建立见图 3A。通过流式细胞术检测 Mn 联合放疗后肿瘤浸润免疫细胞亚群的改变,结果发现,放疗后肿瘤内 $CD45^+$ 免疫细胞、$CD8^+$T 细胞及调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)浸润明显增多($P<0.05$,图 3B~D),RT+Mn 组的 $CD45^+$ 免疫细胞及 $CD8^+$T 细胞浸润进一步增多,而 Treg 细胞浸润则明显减少($P<0.05$,图 3B~D),提示 Mn 治疗可增强放疗的抗肿瘤免疫效应。尽管锰佐剂治疗可增加肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAM)的浸润,但 RT+Mn 组肿瘤浸润 TAM 明显降低($P<0.05$,图 3E)。同时,放疗可增加 MDSC 的浸润,而 RT+Mn 组的 MDSC 浸润则明显降低($P<0.05$,图 3F)。上述结果提示,Mn 治疗可进一步改善放疗诱导的免疫调节作用,从而进一步发挥抗肿瘤作用。



a: $P<0.05$, 与 Control 组比较;b: $P<0.05$, 与 RT 组比较;c: $P<0.05$, 与 Mn 组比较

A:联合治疗模型建立示意图;B:黑色素瘤模型各组肿瘤体积(RT 组:$n=9$,其余 3 组:$n=7$);C:黑色素瘤模型各组肿瘤质量($n=5$)　1:Control 组;2:Mn 组;3:RT 组;4:RT+Mn 组;D:黑色素瘤模型各组小鼠生存时间($n=7$);E、F:结肠癌模型各组肿瘤体积(CT26 模型:$n=6$;MC38 模型:$n=7$)

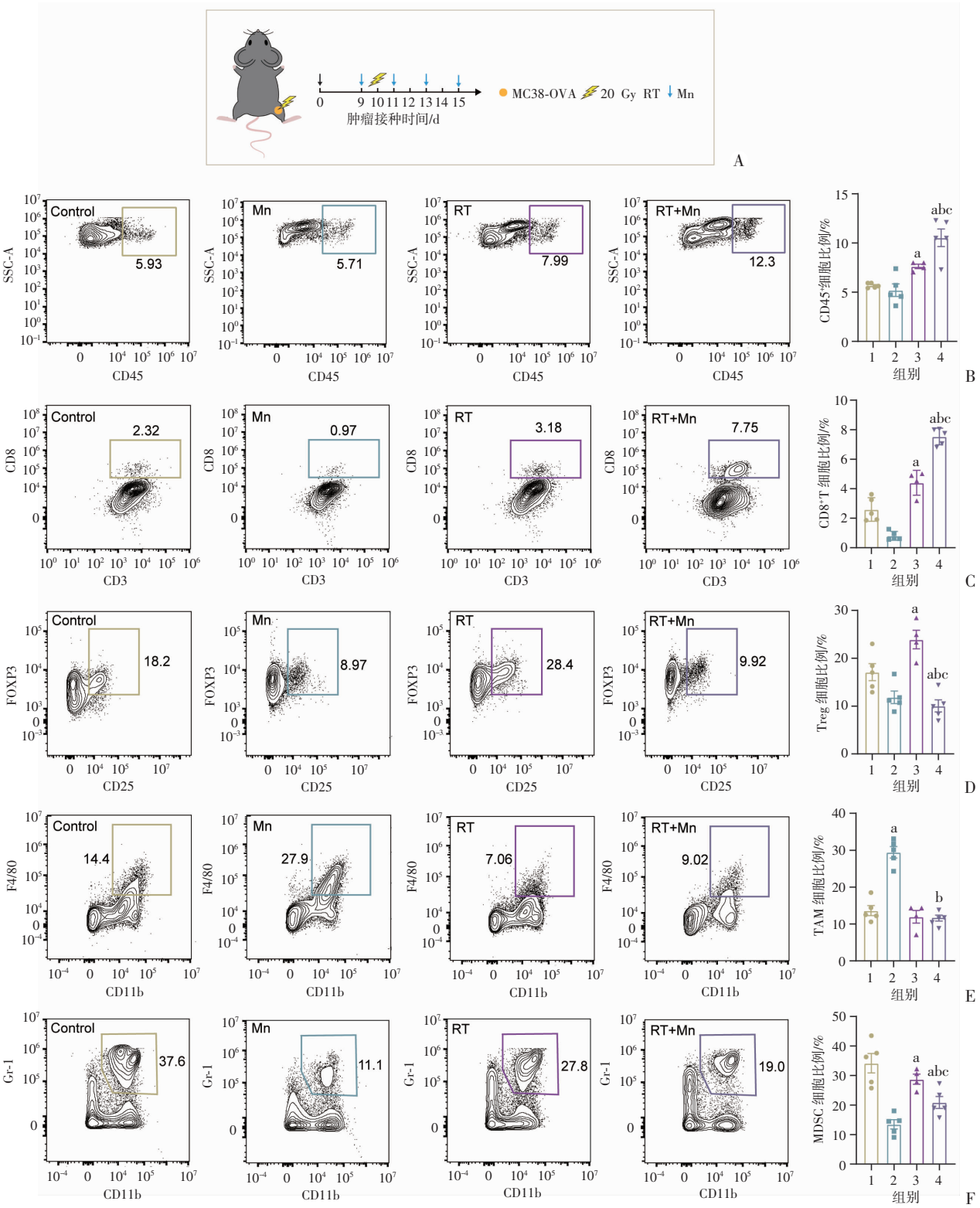
图 1　利用小鼠皮下荷瘤模型监测锰佐剂联合放疗后肿瘤生长及小鼠生存情况



a: $P<0.05$, 与 RT 组比较;b: $P<0.05$, 与 Mn 组比较

A:远端效应模型建立示意图;B、C:B16-F10 荷瘤小鼠双侧各组肿瘤体积变化($n=6$)

图 2　利用双侧皮下荷瘤模型监测锰佐剂对放疗诱导远端效应的影响



1:Control 组;2:Mn 组;3:RT 组;4:RT+Mn 组;a: $P<0.05$, 与 Control 组比较;b: $P<0.05$, 与 RT 组比较;c: $P<0.05$, 与 Mn 组比较

A:联合治疗模型建立示意图;B:各组肿瘤中 $CD45^+$ 免疫细胞浸润情况(RT 组:$n=4$;其余 3 组:$n=5$);C:各组肿瘤中 $CD8^+$ T 细胞浸润情况;D:各组肿瘤中 Treg 细胞浸润情况;E:各组肿瘤中 TAM 细胞浸润情况;F:各组肿瘤中 MDSC 细胞浸润情况

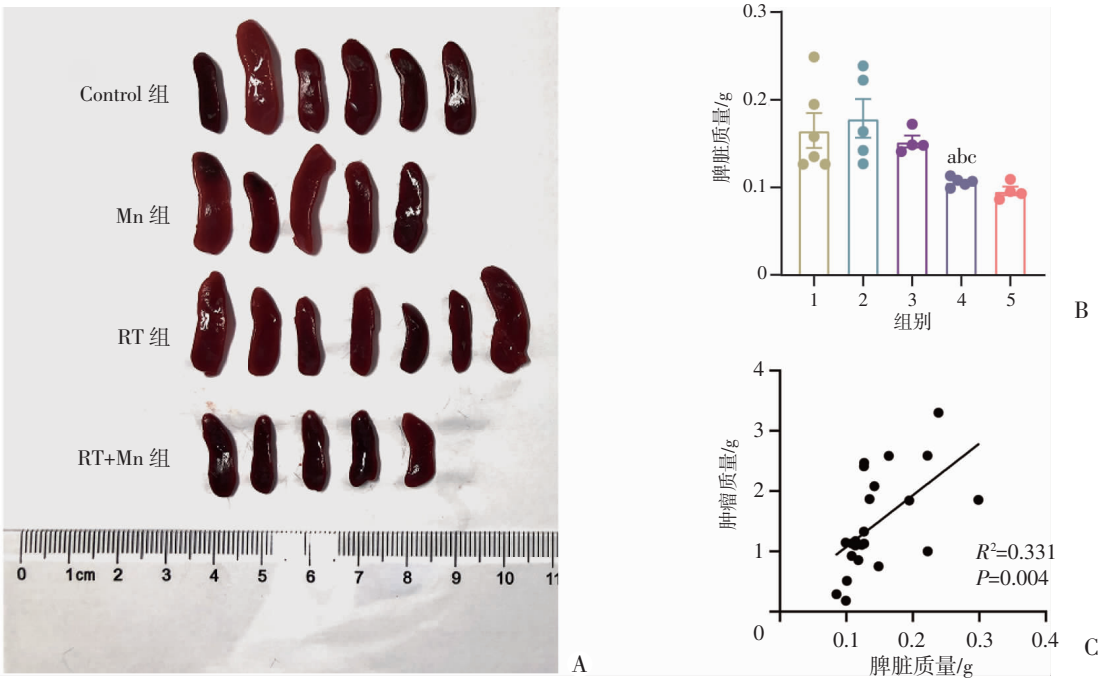
图 3 流式细胞术检测锰佐剂联合放疗治疗后肿瘤浸润免疫细胞的改变

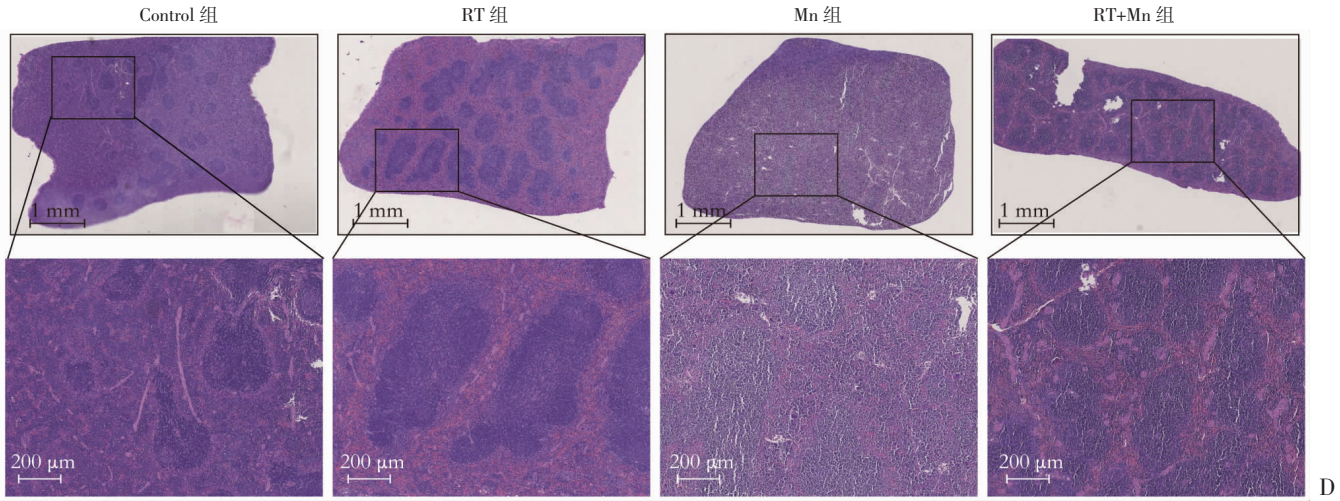
2.4　Mn 联合放疗可激活脾脏功能

结果显示,荷瘤小鼠脾脏较未荷瘤小鼠明显增大,RT 组或 Mn 组脾脏大小较对照组无明显差异,而 RT+Mn 组小鼠脾脏明显缩小,与正常未荷瘤小鼠脾脏大小无差异(图 4A、B)。同时,发现肿瘤质量与脾脏质量正相关($R^2=0.331$,$P=0.004$,图 4C)。进一步对小鼠脾脏进行 HE 染色,发现 RT+Mn 组的脾脏白髓数量和密度显著增多,提示淋巴细胞的储备增多(图 4D)。以上现象提示,Mn 联合放疗可激活脾脏功能,从而增强抗肿瘤免疫作用。

3　讨论

近年来,放射治疗已进入个性化医疗时代,除了物理方面放疗计划中射束方向和剂量分布的优化改善外,对放疗诱导的免疫反应的理解也逐步加深。根据患者的个体特征、病程情况以及基因组信息,制定个性





a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 RT 组比较;c:$P<0.05$,与 Mn 组比较;d:$P<0.05$,与肿瘤组织比较

A:各组小鼠脾脏大小;B:各组小鼠脾脏质量　1:Control 组($n=6$);2:Mn 组($n=5$);3:RT 组($n=4$);4:RT+Mn 组($n=5$);5:未荷瘤组($n=4$);C:肿瘤质量与脾脏质量相关性分析;D:HE 染色观察各组小鼠脾脏结构变化

图 4　锰佐剂联合放疗治疗后荷瘤小鼠脾脏质量及病理改变

化的放疗方案,可以帮助医生更精准地确定放疗的剂量、照射方式和周期,提高治疗的精准度和安全性。同时,诱导最佳的抗肿瘤免疫反应也是增加放疗效果及克服放疗抵抗的关键。cGAS-STING 通路的激活对于放疗激发的适应性免疫反应必不可少,由第二信使 2′3′-cGAMP 活化的 STING 加强了放疗诱导的抗肿瘤效应[8]。提示 STING 缺陷小鼠无法刺激肿瘤浸润性树突状细胞激活 $CD8^+$ T 细胞[13]。同时,STING 激动剂可增强自然杀伤细胞介导的 $CD8^+$T 细胞激活。因此,STING 激动剂受到了广泛的关注[14-15]。锰对 cGAS-STING 信号通路的激活具有调控作用,增加该通路对双链 DNA 的敏感性、在抗病毒感染及抗肿瘤方面发挥重要作用[16-17]。本研究发现,放疗协同锰佐剂可增强抗肿瘤作用,甚至发生远端效应。

放疗引起的远端效应,是指在一个部位进行放射治疗可能导致远处未照射部位的转移性肿瘤消退的现象,远端效应与系统性免疫机制相关。然而这种现象在临床实践中罕见,归因于治疗时已建立的免疫耐受机制可能会阻碍远端反应发展。放疗联合抗 CD47 抗体诱发巨噬细胞介导的远端效应[18]。

$CD8^+$T 细胞的数量和功能直接决定了抗肿瘤免疫反应的强弱。本研究发现,放疗联合锰佐剂促进肿瘤浸润的 $CD8^+$T 细胞,而抑制 T 细胞功能的免疫抑制细胞,如 Tregs、MDSC、巨噬细胞等均显著下降,肿瘤微环境呈现“热”肿瘤状态。另外,本研究发现,锰佐剂处理后,巨噬细胞较对照组有所升高,锰佐剂可能活化巨噬细胞促进Ⅰ型 IFN 产生进而促进 DC 细胞成熟,增强肿瘤抗原递呈功能,与已有报道一致[10]。但增多的巨噬细胞在抗肿瘤过程中发挥的作用及功能有待进一步明确。

脾脏作为机体最大的免疫器官,是细胞免疫和体液免疫的发生中心,发挥免疫监视、调控、过滤等作用。主要细胞组成包括 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞、DC 细胞和巨噬细胞等。本研究发现,放疗联合锰佐剂处理后的小鼠脾脏恢复到未荷瘤小鼠状态,表现为脾脏的肿瘤减轻,脾脏的结构发生改变。与荷瘤小鼠比较,联合治疗的小鼠脾脏结构规则完整,脾脏内白髓数量和单位面积密度显著增多,白髓内动脉周围淋巴鞘和生发中心分布均匀,红髓内脾索和脾窦密集,意味着淋巴细胞储备增多,细胞免疫和体液免疫增强,解释了联合治疗协同抗肿瘤的机制。

综上所述,本研究发现锰佐剂联合放疗具有协同抗肿瘤效应,其机制可能与重塑免疫微环境及脾脏功能改善相关。但本研究仍存在一些局限性,包括未深入检测脾脏及外周血淋巴细胞亚群等。因此,在后续实验中将重点关注联合治疗对脾脏及外周血淋巴细胞亚群的影响,并深入探讨其相关分子机制,从而为放疗联合治疗及临床抗肿瘤策略提供新的理论基础。

致谢 本研究所用锰相关试剂及方法得到北京大学蒋争凡团队及启锰生物的大力支持,在此表示由衷感谢

参考文献:

[1] IYENGAR P, ALL S, BERRY M F, *et al*. Treatment of oligometastatic non-small cell lung cancer: an ASTRO/ESTRO clinical practice guideline[J]. Pract Radiat Oncol, 2023, 13(5): 393-412. DOI: 10.1016/j.prro.2023.04.004.

[2] YU C, PENG R Y. Biological effects and mechanisms of shortwave radiation: a review[J]. Mil Med Res, 2017, 4: 24. DOI: 10.1186/s40779-017-0133-6.

[3] JIN W J, ZANGL L M, HYUN M, *et al*. ATM inhibition augments type I interferon response and antitumor T-cell immunity when combined with radiation therapy in murine tumor models[J]. J Immunother Cancer, 2023, 11(9): e007474. DOI: 10.1136/jitc-2023-007474.

[4] HERRERA F G, RONET C, DE OLZA M O, *et al*. Low-dose radiotherapy reverses tumor immune desertification and resistance to immunotherapy[J]. Cancer Discov, 2022, 12(1): 108-133. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-0003.

[5] BURNETTE B C, LIANG H, LEE Y J, *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. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2820.

[6] LHUILLIER C, RUDQVIST N P, YAMAZAKI T, *et al*. Radiotherapy-exposed $CD8^+$ and $CD4^+$ neoantigens enhance tumor control[J]. J Clin Invest, 2021, 131(5): e138740. DOI: 10.1172/JCI138740.

[7] CHENG J N, LUO W, SUN C D, *et al*. Radiation-induced eosinophils improve cytotoxic T lymphocyte recruitment and response to immunotherapy[J]. Sci Adv, 2021, 7(5): eabc7609. DOI: 10.1126/sciadv.abc7609.

[8] DENG L F, LIANG H, XU M, *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. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.019.

[9] WALDRON K J, RUTHERFORD J C, FORD D, *et al*.

Metalloproteins and metal sensing[J]. Nature, 2009, 460(7257): 823-830. DOI: 10.1038/nature08300.

[10] LV M Z, CHEN M X, ZHANG R, *et al*. Manganese is critical for antitumor immune responses *via* cGAS-STING and improves the efficacy of clinical immunotherapy[J]. Cell Res, 2020, 30(11): 966-979. DOI: 10.1038/s41422-020-00395-4.

[11] ZHAO Z, MA Z X, WANG B, *et al*. Mn^{2+} directly activates cGAS and structural analysis suggests Mn^{2+} induces a noncanonical catalytic synthesis of 2′3′-cGAMP[J]. Cell Rep, 2020, 32(7): 108053. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108053.

[12] TAKEMURA N, KURASHIMA Y, MORI Y, *et al*. Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis[J]. Sci Transl Med, 2018, 10(429): eaan0333. DOI: 10.1126/scitranslmed.aan0333.

[13] XU J Y, XIONG Y Y, TANG R J, *et al*. Interleukin-5-induced eosinophil population improves cardiac function after myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2022, 118(9): 2165-2178. DOI: 10.1093/cvr/cvab237.

[14] ZHANG Y, YANG Q F, ZENG X Y, *et al*. MET amplification attenuates lung tumor response to immunotherapy by inhibiting STING[J]. Cancer Discov, 2021, 11(11): 2726-2737. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-20-1500.

[15] NICOLAI C J, WOLF N, CHANG I C, *et al*. NK cells mediate clearance of $CD8^+$ T cell-resistant tumors in response to STING agonists[J]. Sci Immunol, 2020, 5(45): eaaz2738. DOI: 10.1126/sciimmunol.aaz2738.

[16] HENDY D A, PENA E S, ONTIVEROS-PADILLA L, *et al*. Immunogenicity of an adjuvanted broadly active influenza vaccine in immunocompromised and diverse populations[J]. Bioeng Transl Med, 2024, 9(2): e10634. DOI: 10.1002/btm2.10634.

[17] ZHANG K L, HUANG Q Y, LI X M, *et al*. The cGAS-STING pathway in viral infections: a promising link between inflammation, oxidative stress and autophagy[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1352479. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1352479.

[18] NISHIGA Y, DRAINAS A P, BARON M, *et al*. Radiotherapy in combination with CD47 blockade elicits a macrophage-mediated abscopal effect[J]. Nat Cancer, 2022, 3(11): 1351-1366. DOI: 10.1038/s43018-022-00456-0.

(**收稿**:2024-02-22;**修回**:2024-04-18)

(编辑 汪勤俭)