

CpG-ODN 对重离子辐射所致脾脏损伤的救治作用

张超¹ 傅华¹ 易永华¹ 蔡建明² 高福²

¹(中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院 放疗科 兰州 730050)

²(中国人民解放军海军军医大学 放射医学教研室 上海 200433)

摘要 本次研究主要探讨 CpG-ODN 对重离子辐射所致脾脏损伤的救治作用。实验中 C57BL/6L 小鼠受到 5 Gy ¹²C⁶⁺ 离子全身照射,在照射后急性期计算小鼠脾脏指数,苏木精-伊红(Hematoxylin-Eosin staining, HE)染色观察脾脏组织结构变化。另外,免疫组化法检测 γ -H₂A_X 蛋白含量以判断脾脏细胞 DNA 发生双链断裂((Double-strand break, DSB)情况,末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标(Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling, TUNEL)法检测脾脏细胞凋亡水平,荧光标记法检测外周血 CD19⁺B 细胞数量。结果显示,经 ¹²C⁶⁺ 离子照射后 CpG-ODN 处理,小鼠脾脏指数提高,脾脏红髓萎缩程度减轻,白髓面积增大,其内淋巴 B 细胞排列密度提高,发生 DSB 和凋亡的细胞数量减少,外周血 CD19⁺ B 细胞数量增加。这些表明 CpG-ODN 能减轻 ¹²C⁶⁺ 离子照射后脾脏损伤,其原因可能与 CpG-ODN 抑制细胞发生 DSB 和凋亡有关。

关键词 碳离子辐射, CpG-ODN, 脾脏, 凋亡, 双链断裂

中图分类号 R3

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0116

引用该文:

张超, 傅华, 易永华, 等. CpG-ODN 对重离子辐射所致脾脏损伤的救治作用[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2023, 41(4): 040301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0116.

ZHANG Chao, FU Hua, YI Yonghua, *et al.* Effect of CpG-ODN on spleen damage after carbon ion radiation[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2023, 41(4): 040301. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2022-0116.



Effect of CpG-ODN on spleen damage after carbon ion radiation

ZHANG Chao¹ FU Hua¹ YI Yonghua¹ CAI Jianming² GAO Fu²

¹(Department of Radiotherapy, The 940 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA., Lanzhou 730050, China)

²(Faculty of Naval Medicine, Naval Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The purpose of this study was to explore the ameliorative effect of CpG-ODN on spleen damage after carbon ion radiation (CIR). In the experiment, C57BL/6L mice were irradiated with 5 Gy of CIR and the index of spleen was calculated. Changes in spleen tissue structure were observed by histological examination (HE).

基金资助: 甘肃省自然科学基金(22JR5RA003)和国家自然科学基金项目(81501623)资助

第一作者: 张超,男,1984年出生,2014年获得海军军医大学医学博士学位,副主任医师,主要从事肿瘤放射治疗工作

通信作者: 傅华, 硕士, 副主任医师, E-mail: 47723515@qq.com

收稿日期: 初稿 2022-11-10; 修回 2023-02-12

Supported by Natural Science Foundation of Gansu province (22JR5RA003) and National Natural Science Foundation of China (81501623)

First author: ZHANG Chao (male) was born in 1984, and obtained his doctoral degree from Naval Military Medical University in 2014, associate chief physician, engaged in tumor radiotherapy

Corresponding author: FU Hua, master degree, associate chief physician, E-mail: 47723515@qq.com

Received 10 November 2022; accepted 12 February 2023

Double-strand break (DSB) of DNA and apoptosis were detected by γ -H₂AX immunohistochemistry and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick and labeling (TUNEL) assay, respectively. The number of B cells in the peripheral blood was examined using CD19 antibody labeling. These results showed that CpG-ODN improved the index of spleen, relieved red pulp atrophy, and increased the area of white pulp, in which the number of γ -H₂AX foci and TUNEL-positive cells were decreased after CIR. In addition, CpG-OND increased the number of CD19⁺ B cells in peripheral blood after CIR. These results indicated that CpG-ODN ameliorates spleen damage induced by CIR, possibly by inhibiting the rate of DSB and apoptosis.

KEYWORDS Carbon ion radiation (CIR), CpG-ODN, Spleen, Apoptosis, Double-strand break (DSB)

CLC R3

重离子是指在元素周期表氦核以后(原子序数大于2)带有正电荷的原子核。当前包括我国在内的多个国家已将重离子应用于放射治疗恶性肿瘤中,并取得良好效果^[1]。然而,重离子所致副反应也日益受到关注。以临床放射治疗中最常使用的¹²C⁶⁺离子为例,首先,因受限于肿瘤体积较大,治疗过程中会采用展宽 Bragg 峰(Spread-out bragg peak, SOBP)和叠加 LET 坪区的方法以降低峰坪比,从而提高肿瘤照射体积,但这种方法会使肿瘤周围更多正常组织细胞受到照射损伤;其次,¹²C⁶⁺离子相对生物学效应(Relative biological effectiveness, RBE)是传统光子辐射生物学效应的2.5~4.5倍,能引起DNA发生双链断裂(Double strand break, DSB),诱导细胞凋亡。因此,重离子对细胞具有比光子更强的辐射损伤作用^[2-3]。

脾脏是辐射敏感器官,也是体内重要的免疫器官之一。当脾脏受到辐射损伤后,其内大量以B细胞为主的淋巴免疫细胞数量减少,抗体形成功能抑制,细胞因子网络调节能力失常。临床资料显示,肿瘤患者接受重离子放射治疗后会出现不同程度的免疫器官损伤,导致免疫功能低下,影响自身抗感染和抗肿瘤能力^[4-6]。因此,减轻重离子辐射所致脾脏损伤具有重要意义。

CpG-ODN (Oligodeoxynucleotide)是模拟细菌DNA中非甲基化胞嘧啶(C)和鸟嘧啶(G)核心序列而人工合成的一种寡聚核苷酸,可以特异性激活免疫细胞内 Toll 样受体9(Toll like receptor 9, TLR9)。当TLR9被激活后,其通过MyD88(髓样分化因子, Myeloid differentiation factor 88)依赖性通路介导活化细胞内NF- κ B(核因子激活B细胞的 κ -轻链, Nuclear factor kappa B)促进细胞存活^[7]。前期细胞试验显示, CpG-ODN不仅能减少光子辐射导致DNA断裂而形成的微核,还能减轻¹²C⁶⁺离子辐射导致RAW264.7免疫细胞的损伤^[8-9],近期动物试验发现, CpG-ODN能减轻¹²C⁶⁺离子辐射所致免疫器官胸

腺损伤^[10],本次将以前期试验内容为基础,探讨CpG-ODN对¹²C⁶⁺离子辐射所致免疫器官脾脏损伤的救治作用,为重离子辐射救治研究提供方向,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

CpG-ODN由上海生物工程技术有限公司合成,具体序列为:5'-TCG TCG TTT TCG GCG CGC CG-3'(注:下划线标注的碱基是硫代修饰,其他碱基是磷酸化修饰)。根据要求进行去内毒素处理,PBS(磷酸缓冲盐溶液, Phosphate buffer saline)稀释到浓度为250 μ g/mL以备用。

1.2 动物

试验选用C57BL/6L雌性小鼠,体重16~18 g,年龄6~7周。小鼠饲养在中国科学院兰州近代物理研究所动物房内。动物房保持长期通风和自然采光,室内温度控制在23 $^{\circ}$ C左右。小鼠饲料购自兰州大学实验动物中心,饮用水使用商品化纯净水。

1.3 ¹²C⁶⁺离子照射(Carbon ion radiation, CIR)

¹²C⁶⁺离子照射由中国科学院兰州重离子加速器研究装置的深层肿瘤治疗终端提供。照射时小鼠被固定在一个长、宽、高分别为8.0 cm、3.5 cm、3.5 cm的特制透明塑料盒内。由于受到射野能量分区范围限制和为了更好地模拟临床放射治疗条件,小鼠置于¹²C⁶⁺离子射线坪区内照射。具体照射参数如下:辐射能量270 MeV;传能密度(Linear energy transfer, LET)值31.3 keV/ μ m;剂量率0.8 Gy/min;吸收剂量5 Gy^[11]。

1.4 分组处理

试验小鼠随机分成正常组(Normal)、单纯给药

组(CpG-ODN)、照射对照组(CIR control)和照射给药组(CIR+CpG-ODN)。正常组小鼠不进行任何处理;单纯给药组小鼠在指定时间点给予CpG-ODN,但不进行照射;照射对照组小鼠在照射后指定时间点给予等量PBS;照射给药组小鼠在照射后30 min、24 h和48 h连续3次给予50 μg CpG-ODN。整个试验过程获得联勤保障部队第九四〇医院实验动物伦理委员会认可(审批号:2022KYLL207)。

1.5 脾脏指数

试验小鼠在照射后指定时间点称量体重,然后脱颈法处死,取出完整脾脏进行称重。

脾脏指数=脾脏质量(mg)/体重(g)。

1.6 HE染色、TUNEL染色和 $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ 免疫组化染色

试验小鼠在照射后指定时间点处死,取出的脾脏放置在4%多聚甲醛溶液中室温固定,然后脱水、包埋、切片。使用苏木精-伊红(HE)染色部分石蜡切片,其他石蜡切片邮寄到武汉塞维尔生物有限公司分别进行抗 $\gamma\text{-H}_2\text{AX}$ 免疫组化染色和TUNEL凋亡染色。染色切片在显微镜下观察和拍照。

1.7 外周血B细胞检测

试验小鼠在照射后指定时间点采用摘眼球法收集100 μL 外周血,然后加入65 mL 10%甲醛溶液固定,加入1 mL Triton X-100室温孵育30 min,离心后弃上清液,再加入1 mL 50%冰甲醛4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min。荧光染料DAPI(4',6'-diamidino-2-phenylindole)蓝染所有细胞,CD19单克隆荧光抗体红染淋巴B细胞,取混合均匀的样本滴加在玻片上,在荧光显微镜特定激发光谱下分别计数“蓝染”和“红染”细胞数量并拍照。

1.8 统计分析

试验数据以“平均数 \pm 标准差”表示,使用SPSS 13.0统计软件分析数据,独立样本 t 检验,当 $*p<0.05$ 时表示有显著统计学差异。

2 结果

2.1 CpG-ODN对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏指数的影响

前期试验结果显示,CpG-ODN能提高 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后C57BL/6L小鼠存活率^[10]。本次试验中

C57BL/6L小鼠同样受到5 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子全身照射。在急性期(第1天和第3天)计算小鼠脾脏指数变化以直接反映脾脏萎缩程度和间接反映脾脏免疫功能状态。图1显示小鼠脾脏指数在 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后第1天和第3天分别是正常组的61.9%和46.3%。照射后CpG-ODN处理,脾脏指数在第1天和第3天分别为正常组的83.6%和59.5%。这表明在小鼠受到 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏出现萎缩并持续性加重,而CpG-ODN能抑制脾脏萎缩,间接说明其具有减轻免疫功能损伤的作用。

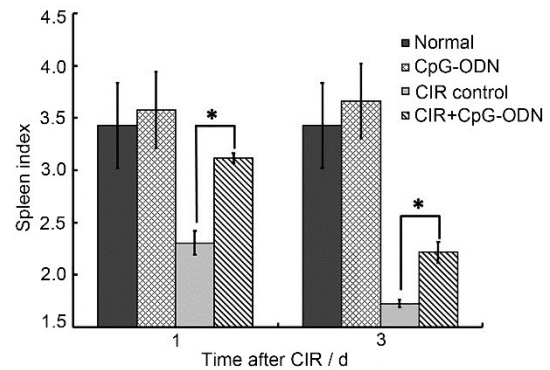


图1 CpG-ODN对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏指数的影响
小鼠脾脏指数在 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后第1天和第3天的变化情况
 $*p<0.05$,与照射对照组比较

Fig.1 Effects of CpG-ODN on spleen index after CIR. the change of spleen index after CIR at the 1st and 3rd day; $*p<0.05$, compared with CIR control group

2.2 CpG-ODN对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏组织结构的影响

C57BL/6L小鼠受到5 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子全身照射后,镜下观察HE染色后脾脏组织结构变化以评估损伤程度。图2(a)结果显示,正常脾脏组织内红髓(Red pulp, R.P.)和白髓(White pulp, W.P.)分界清楚,白髓内含丰富淋巴细胞,排列致密。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏组织出现红髓萎缩,结构破坏,血管窦扩张充血,颜色变浅,白髓面积缩小,其内细胞排列稀疏。照射后CpG-ODN处理,红髓萎缩程度减轻,白髓面积相对增大,细胞数量有所提高,排列较密集。图2(b)定量结果显示,正常脾脏中白髓占比为48.3%, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后第1天和第3天白髓占比缩小到19.7%和11.8%。照射后CpG-ODN处理,脾脏白髓占比在第1天和第3天分别为29.4%和20.1%。这表明小鼠受到 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射后脾脏组织萎缩,结构破坏,而CpG-ODN能减轻照射后白髓萎缩程度,缓解脾脏损伤。

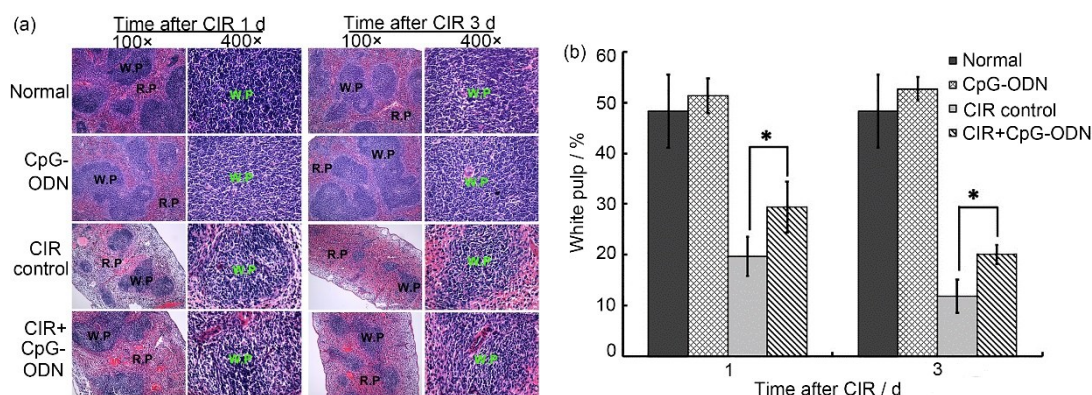


图2 CpG-ODN对¹²C⁶⁺离子照射后脾脏组织结构的影响:(a)HE染色观察小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后脾脏第1天和第3天结构变化;(b)定量分析脾脏白髓占比;**p*<0.05,与照射对照组比较

Fig.2 Effects of CpG-ODN on spleen damage after CIR: (a) representative of histological specimens of spleen after CIR at 1st and 3rd day; (b) proportion of white pulp in spleen was quantified; **p*<0.05, compared with CIR control group

2.3 CpG-ODN对¹²C⁶⁺离子照射后脾脏细胞DNA断裂和凋亡的影响

C57BL/6L小鼠受到5 Gy ¹²C⁶⁺离子全身照射后,免疫组化法检测 γ -H₂AX蛋白表达水平,以判断脾脏细胞DNA发生DSB的情况,同时TUNEL法检

测脾脏细胞发生凋亡的数量。图3(a)中免疫组化结果显示,小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后脾脏白髓内 γ -H₂AX阳性细胞数量增加。照射后CpG-ODN处理组,其内 γ -H₂AX阳性细胞数量减少,平均数量从162个降低到53个。图3(b)中TUNEL法检测结果与 γ -H₂AX免疫组化法检测结果基本一致。

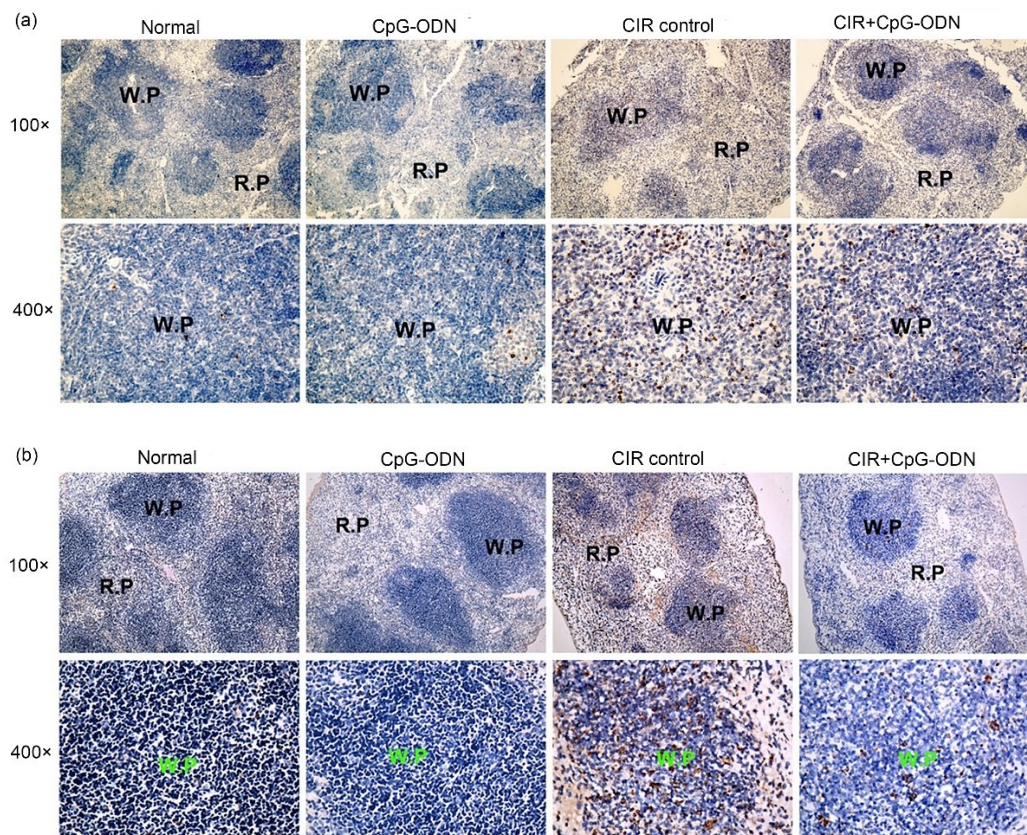


图3 CpG-ODN对¹²C⁶⁺离子照射后脾脏细胞DNA发生DSB和凋亡的影响:(a)免疫组化法检测小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后脾脏白髓内细胞 γ -H₂AX蛋白的表达;(b)TUNEL法检测小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后脾脏白髓内凋亡细胞的数量

Fig.3 Effects of CpG-ODN on DNA DSB and apoptosis of spleen cell after CIR: (a) expression of γ -H₂AX protein in spleen was detected by immunohistochemistry after CIR; (b) the number of apoptotic cells in spleen was detected by TUNEL assay after CIR

小鼠受¹²C⁶⁺离子照射后脾脏骨髓内出现大量 TUNEL 阳性细胞,而照射后 CpG-ODN 处理组,其内阳性细胞数量减少,平均数量从 62 个降低到 28 个。这表明小鼠¹²C⁶⁺离子照射后脾脏骨髓内细胞发生 DSB 和凋亡数量增多,而 CpG-ODN 能够抑制照射所致 DSB 和凋亡发生。

2.4 CpG-ODN 对¹²C⁶⁺离子照射后外周血淋巴 B 细胞的影响

外周血中 B 细胞主要来源于脾脏,在体液免疫中发挥重要作用,其数量可直接反映脾脏功能状态。C57BL/6L 小鼠受到 5 Gy ¹²C⁶⁺离子全身照射后,CD19

荧光抗体标记外周血中 B 细胞。图 4(a)结果显示,小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后第 1 天外周血中 CD19⁺B 细胞数量开始减少,第 3 天降低更加明显。照射后 CpG-ODN 处理,CD19⁺B 细胞数量相对增多。图 4(b)定量结果显示,¹²C⁶⁺离子照射后第 1 天和第 3 天外周血 B 细胞数量分别为正常组的 43.0% 和 4.3%,而照射后 CpG-ODN 处理,外周血 B 细胞分别为正常组的 73.9% 和 41.4%。这表明小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后外周血 B 细胞数量快速下降,而 CpG-ODN 能减缓照射后外周血 B 细胞数量的下降速度,从另一个方面反映 CpG-ODN 可减轻¹²C⁶⁺离子照射所致脾脏损伤,维持体液免疫功能。

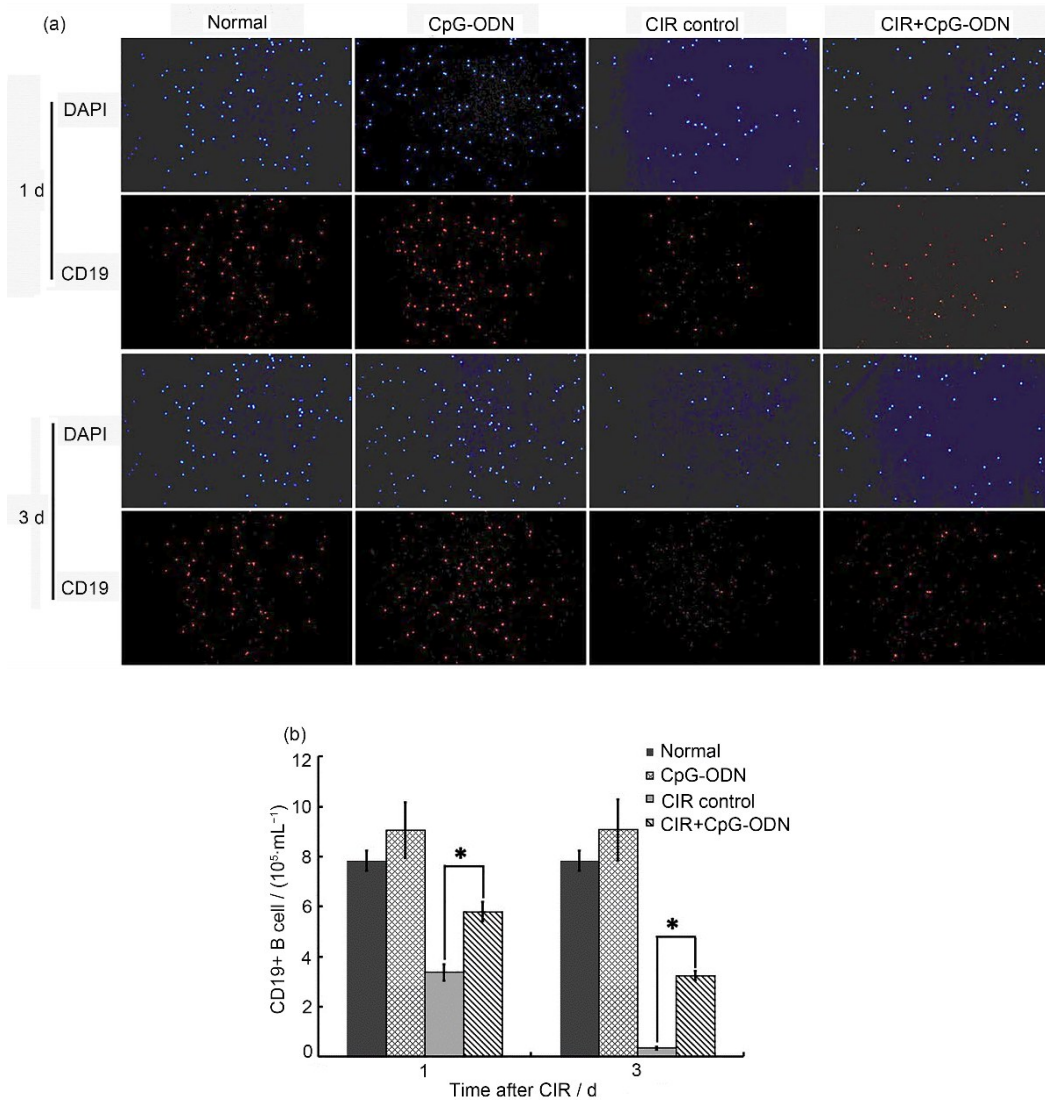


图 4 CpG-ODN 对¹²C⁶⁺离子照射后的外周血 CD19⁺B 细胞数量的影响: (a) 免疫荧光法检测小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后第 1 天和第 3 天外周血 CD19⁺B 细胞的数量; (b) 定量分析外周血中 CD19⁺B 细胞的数量; **p*<0.05, 与照射对照组比较

Fig.4 Effects of CpG-ODN on CD19⁺B cells in peripheral blood: (a) the number of CD19⁺B cells in peripheral blood after CIR at 1st and 3rd day detected by CD19⁺ labeling; (b) the number of CD19⁺ cell quantified; **p*<0.05, compared with CIR control group

3 讨论

随着重离子放射治疗技术在临床上的广泛应用,其所致辐射损伤也日益受到关注。重离子与传统光子比较,具有不同物理学和生物学特点,其中包括高RBE、高LET、氧增强比小、损伤无细胞周期依赖性和关键损伤靶点为DNA分子。因此,不能把重离子辐射损伤效应等同于光子损伤效应,更不能简单认为对光子辐射损伤具有救治功能的药物同样对重离子辐射损伤有效。光子辐射损伤救治基础是清除氧自由基,而重离子辐射损伤救治核心是减少DNA断裂及促进修复^[3,12]。

CpG-ODN (Oligodeoxynucleotide)是模拟细菌DNA中非甲基化胞嘧啶(C)和鸟嘌呤(G)核心序列而人工合成的一种寡聚核苷酸。CpG-ODN与TLR9特异性结合后会立即介导募集MyD88依赖性通路而活化细胞内NF- κ B。当NF- κ B活化后:(1)调节下游ATM(毛细血管扩张性共济失调症状突变蛋白,Ataxia telangiectasia mutans)和BRCA2基因(Breast cancer susceptibility protein,乳腺癌易感基因2)直接参与DNA损伤修复;(2)调节下游Gadd45(生长抑制DNA损伤蛋白45, growth arrest DNA damage-inducible protein 45)等分子,间接参与DNA损伤修复,维持基因稳定性;(3)作用于G₁/S检测点和激酶CDK(细胞周期依赖激酶, Cyclin-dependent kinases)/CK1(蛋白激酶1, Casein kinase)系统,调节细胞周期进程,促进细胞增殖;(4)通过转录调节方式促进多种细胞生长因子、细胞黏附因子和抗氧化保护因子合成及释放,这些细胞因子在减轻DNA损伤、提高修复能力和维持细胞存活增殖等方面发挥重要作用^[7,13-15]。前期细胞试验已证实CpG-ODN能够激活NF- κ B,在减少电离辐射导致DNA断裂而形成微核和减轻¹²C⁶⁺离子导致的RAW264.7免疫细胞损伤等方面发挥作用^[8-9,16]。近期动物试验发现,CpG-ODN能减轻¹²C⁶⁺离子照射所致免疫器官胸腺损伤^[10]。作为体内另一个重要免疫器官——脾脏,其骨髓内含有密集淋巴B细胞,是发生特异性免疫的主要场所,能直接影响体液免疫功能。本次研究主要探讨CpG-ODN对¹²C⁶⁺离子辐射所致脾脏损伤的救治作用。

为了使干预性研究顺利进行,本试验参考Suman等^[11]报道的数据资料和临床放射治疗实际情况建立动物模型。将C57BL/6小鼠置于¹²C⁶⁺离子照

射坪区内,给予吸收剂量为5 Gy(C57BL/6小鼠¹²C⁶⁺离子照射的LD_{50/30}值为7.34 Gy)以确保小鼠受到照射后既能出现严重辐射损伤,又不会快速大量死亡。试验结果显示,¹²C⁶⁺离子照射后急性期小鼠脾脏萎缩,组织结构破坏,骨髓面积缩小,其内淋巴B细胞排列稀疏并紊乱。照射后CpG-ODN处理,小鼠脾脏萎缩减轻,组织结构破坏缓解,骨髓面积增大,B细胞排列较为紧密。这些提示CpG-ODN能减轻¹²C⁶⁺离子照射所致脾脏损伤,抑制脾脏免疫功能降低。与光子比较,由于重离子的高RBE和高LET特性,其能直接造成DNA大比例DSB,摧毁自体修复系统,最终在细胞经历多次尝试性修复失败后发生凋亡。因此,DSB是重离子引起细胞损伤并凋亡的主要原因。 γ -H₂AX蛋白与细胞DNA出现DSB直接相关^[17]。小鼠受到¹²C⁶⁺离子照射后脾脏骨髓内 γ -H₂AX染色和TUNEL染色的阳性细胞数量同步增加,而照射后CpG-ODN处理,这些阳性细胞数量明显减少,这提示CpG-ODN抑制¹²C⁶⁺离子照射后脾脏细胞发生DSB和凋亡。另外,脾脏是外周血淋巴B细胞主要来源地,外周血B细胞数量可反映脾脏参与体液免疫的状态,结果显示CpG-ODN能抑制¹²C⁶⁺离子照射后外周血CD19⁺B细胞数量的减少,从侧面说明CpG-ODN可减轻¹²C⁶⁺离子照射所致脾脏损伤,提高体液免疫功能。

4 结论

脾脏是体内重要的外周免疫器官之一,减轻重离子照射所致脾脏损伤具有重要意义。本研究探讨CpG-ODN是否对¹²C⁶⁺离子照射所致脾脏损伤具有救治作用。将试验小鼠置于¹²C⁶⁺离子束坪区范围内,给予5 Gy¹²C⁶⁺离子全身照射。结果显示:¹²C⁶⁺离子照射后CpG-ODN处理,小鼠脾脏萎缩程度减轻,组织结构破坏缓解,骨髓面积增大,其内 γ -H₂AX和TUNEL阳性细胞数量减少,外周血CD19⁺B细胞数量提高。这些表明CpG-ODN对重离子照射所致脾脏损伤具有救治作用,其原因可能与抑制细胞发生DSB和凋亡有关。

作者贡献声明 张超负责执行试验内容和论文书写;傅华负责数据整理及统计分析;易永华负责文献查找、论文修改和校对;高福和蔡建明负责试验系统设计和规划研究方向。所有作者均已阅读并认可该论文最终版的所有内容。

参考文献

- 1 王姗,李萍,张芮,等.重离子治疗肿瘤的临床研究进展[J].国际肿瘤学杂志,2020,47(12):741-745. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20200117-00112.
WANG Shan, LI Ping, ZHANG Rui, *et al.* Progresses in clinical research of heavy ion therapy for cancer[J]. Journal of International Oncology, 2020, 47(12): 741-745. DOI: 10.3760/cma.j.cn371439-20200117-00112.
- 2 杨红杰,肖平,罗乐宣,等.重离子治疗恶性肿瘤的生物学基础[J].罕少疾病杂志,2015,22(1):59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2015.01.24.
YANG Hongjie, XIAO Ping, LUO Lexuan, *et al.* The biological basis of heavy ion for the therapy of malignant tumor[J]. Journal of Rare and Uncommon Diseases, 2015, 22(1): 59-62. DOI: 10.3969/j.issn.1009-3257.2015.01.24.
- 3 Suetens A, Konings K, Moreels M, *et al.* Higher initial DNA damage and persistent cell cycle arrest after carbon ion irradiation compared to X-irradiation in prostate and colon cancer cells[J]. Frontiers in Oncology, 2016, 6: 87. DOI: 10.3389/fonc.2016.00087.
- 4 查晓丹,李小满,蒲韵竹,等.重离子辐射对免疫系统影响的研究进展[J].国际药学研究杂志,2015,42(2):152-155. DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2015.02.005.
ZHA Xiaodan, LI Xiaoman, PU Yunzhu, *et al.* Effects of heavy ion radiation on immune system: research advances [J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2015, 42(2): 152-155. DOI: 10.13220/j.cnki.jipr.2015.02.005.
- 5 崔玉芳,杨红,高亚兵,等.小鼠脾淋巴细胞辐射死亡与凋亡之间的关系[J].辐射研究与辐射工艺学报,1999,17(2):101-106. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.1999.02.008.
CUI Yufang, YANG Hong, GAO Yabing, *et al.* Role of apoptosis in radiation-induced mouse spleen damage and repair and its mechanism[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 1999, 17(2): 101-106. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.1999.02.008.
- 6 赵卫平,张红,王燕玲,等.低剂量 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照对小鼠胸腺、脾脏细胞周期及DNA损伤的影响[J].辐射研究与辐射工艺学报,2008,26(6):343-347. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2008.06.005.
ZHAO Weiping, ZHANG Hong, WANG Yanling, *et al.* Effect of low dose $^{12}\text{C}^{6+}$ irradiation on cell cycle and DNA damage in mouse thymus and spleen cells[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2008, 26(6): 343-347. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3436.2008.06.005.
- 7 Lenert P, Stunz L, Yi A K, *et al.* CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF- κ B activation[J]. Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2001, 11(4): 247-256. DOI: 10.1089/108729001317022241.
- 8 王吉超,张超,蔡建明.CpG-ODN对辐射所致人小肠隐窝上皮细胞微核形成的影响[J].辐射研究与辐射工艺学报,2011,29(3):159-162.
WANG Jichao, ZHANG Chao, CAI Jianming. Effect of CpG-ODN combined with radiation on micronuclei cell of the human intestinal crypt epithelial cell[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2011, 29(3): 159-162.
- 9 Zhang C, Zheng M, Zhu X H, *et al.* Protective effect of CpG-oligodeoxynucleotides against low- and high-LET irradiation[J]. Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology, 2014, 34(5): 1663-1674. DOI: 10.1159/000366368.
- 10 张超,傅华,蔡建明,等.CpG-ODN对 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子照射所致胸腺损伤的防治作用[J].辐射研究与辐射工艺学报,2021,39(1):010302. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021.rrj.39.010302.
ZHANG Chao, FU Hua, CAI Jianming, *et al.* Effect of CpG-ODN on thymus damage radiated by carbon ions[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2021, 39(1): 010302. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2021.rrj.39.010302.
- 11 Suman S, Datta K, Trani D, *et al.* Relative biological effectiveness of ^{12}C and ^{28}Si radiation in C57BL/6J mice [J]. Radiation and Environmental Biophysics, 2012, 51(3): 303-309. DOI: 10.1007/s00411-012-0418-9.
- 12 张睿凤,张忠新,党旭红,等.重离子生物效应的研究进展[J].国际放射医学核医学杂志,2016,40(4):306-311. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.04.014.
ZHANG Ruifeng, ZHANG Zhongxin, DANG Xuhong, *et al.* Progress on biological effectiveness of heavy ions[J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear Medicine, 2016, 40(4): 306-311. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4114.2016.04.014.
- 13 Benezra M, Chevallier N, Morrison D J, *et al.* BRCA1 augments transcription by the NF-kappa B transcription factor by binding to the Rel domain of the p65/RelA

- subunit[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, **278**(29): 26333-26341. DOI: 10.1074/jbc.M303076200.
- 14 Guglielmi C, Cerri I, Evangelista M, *et al.* Identification of two novel BRCA1-partner genes in the DNA double-strand break repair pathway[J]. Breast Cancer Research and Treatment, 2013, **141**(3): 515-522. DOI: 10.1007/s10549-013-2705-9.
- 15 Sommariva M, De Cecco L, Tagliabue E, *et al.* Modulation of DNA repair genes induced by TLR9 agonists: a strategy to eliminate altered cells? [J]. Oncoimmunology, 2012, **1**(2): 258-259. DOI: 10.4161/onci.1.2.18343.
- 16 Zhang C, Ni J, Gao F, *et al.* The mechanism for the ameliorative effect of CpG-oligodeoxynucleotides on bone marrow hemopoiesis radiation injury[J]. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2011, **109**(1): 11-16. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2011.00695.x.
- 17 Hada M, Georgakilas A G. Formation of clustered DNA damage after high-LET irradiation: a review[J]. Journal of Radiation Research, 2008, **49**(3): 203-210. DOI: 10.1269/jrr.07123.