

低分子量肝素钠佐剂对甲型肝炎病毒疫苗诱导 小鼠体液免疫应答的影响

王 玮¹, 余柄廷², 李建芳¹, 李彦涵¹, 刘丽君³, 胡凝珠¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学微生物学研究所, 昆明 650118;

2. 河北大学生命学院, 河北 保定 071000; 3. 昆明医科大学, 昆明 650500)

【摘要】 目的 探讨低分子量肝素钠(low molecular weight heparin sodium, LMWH-Na)佐剂对甲型肝炎病毒(Hepatitis A virus, HAV)疫苗诱导小鼠体液免疫应答的影响。**方法** 将 ICR 小鼠随机分成 8 组, 6 只/组, 分别为甲型肝炎减毒活疫苗 HepA-l (18 EU) 与 5 种不同剂量(100 μ L, 20 μ L, 10 μ L, 1 μ L, 0.1 μ L)的低分子量肝素钠混合免疫小鼠作为实验组, 并取生理盐水作为阴性对照组(Blank)、HepA-l (18 EU) 作为阳性对照组、HepA-l 混合 $\text{Al}(\text{OH})_3$ (300 μ g) 作为铝佐剂对照组, 共免疫一次, 于免疫后第 4、8、12、16 周进行尾静脉采血, 采用 ELISA 法检测小鼠血清中抗 HAV 抗原特异性 IgG 抗体水平。在试验期间, 对小鼠的健康状况进行观察, 并于免疫 16 周后, 取低分子量肝素钠最大剂量组 100 μ L 组及生理盐水组小鼠肾脏、脾脏、肝脏、肺脏、心脏各主要器官制作病理切片进行对比观察。**结果** 除阴性对照组外, 各组小鼠免疫后第 4 周后均产生抗-HAV IgG, 并随时间的延长抗体水平逐渐升高, 于第 8 周达到最高值, 此后逐渐下降。同一时间不同组的抗体水平不同。其中, 第 4 周, 第 8 周, 铝佐剂对照组, 低分子量肝素钠 100 μ L 组, 低分子量肝素钠 20 μ L 组, 低分子量肝素钠 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组且差异具有统计学意义($P < 0.05$), 第 12 周, 铝佐剂对照组, 低分子量肝素钠 20 μ L 组和低分子量肝素钠 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组($P < 0.05$), 第 16 周, 铝佐剂对照组和低分子量肝素钠 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组($P < 0.05$), 但在整个实验期间, 低分子量肝素钠各组的抗体水平都低于铝佐剂对照组的抗体水平。表明低分子量肝素钠可增强 HAV 抗原特异性体液免疫应答, 具有佐剂效应, 最佳剂量为 10 μ L/组, 但其佐剂效应低于铝佐剂效应。试验期间, 各组小鼠均未出现异常。低分子量肝素钠 100 μ L 组小鼠肾、脾、肝、肺、心组织均未观察到病变。**结论** 低分子量肝素钠可明显增强 HAV 抗原诱导小鼠的体液免疫应答, 具有成为新型疫苗佐剂的研发价值。

【关键词】 低分子量肝素钠; 佐剂; 甲型肝炎减毒活疫苗(HepA-l); 体液免疫

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 01-0019-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2016. 001. 004

Effects of low molecular weight heparin sodium adjuvant on humoral immune response induced by Hepatitis A virus vaccine in mice

WANG Wei¹, YU Bing-ting², LI Jian-fang¹, LI Yan-han¹, LIU Li-jun³, HU Ning-zhu¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China;

2. Hebei University, Hebei Baoding 071000, China; 3. Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Low molecular weight heparin sodium (LMWH-Na) adjuvant on

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01); 云南省社会发展新药专项(2013BC011)。

[作者简介] 王玮(1988-), 女, 硕士生, 专业: 生物化学与分子生物学。

[通讯作者] 胡凝珠(1961-), 女, 主任技师。E-mail: huningz@126.com。

humoral immune response induced by hepatitis A virus (HAV) vaccine in mice. **Methods** ICR mice were randomly divided into 8 groups, six for each, and the mouse of each group are injected respectively with live attenuated hepatitis A vaccine HepA-1 (18 EU) + different doses (100 μ L, 20 μ L, 10 μ L, 1 μ L, 0.1 μ L) of LMWH-Na, while those injected with physiological saline as a negative control group (Blank), those injected with HepA-1 (18 EU) as positive control group, those injected with $Al(OH)_3$ (300 μ g) + HepA-1 (18 EU) as the aluminium adjuvant control group, 200 μ L for each. The specific IgG level against HAV in sera of mice at weeks 4, 8, 12 and 16 after immunization were determined by indirect ELISA. During the experiment, the health status of the mice were observed, the kidney, spleen, liver, lung and heart of mice immunized with LMWH-Na 100 μ L at the maximum dosage and those in negative control group were taken out at week 16 after immunization, and prepared into sections for pathological observation. **Results** In addition to the negative control group, mice in various group produced anti-HAV IgG at 4 weeks after the immunization, of which the levels increased as time went on, and reached peak values at week 8 then decreased gradually. At 4 week and 8 week, the anti-HAV IgG levels of aluminum adjuvant control group, LMWH-Na 100 μ L group, LMWH-Na 20 μ L group, LMWH-Na 10 μ L group were higher than the positive control group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). At 12 week, the anti-HAV IgG levels of aluminum adjuvant control group, LMWH-Na 20 μ L group and LMWH-Na 10 μ L group were higher than the positive control group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 16 week, the anti-HAV IgG levels of aluminum adjuvant control group and LMWH-Na 10 μ L group were higher than positive control group and the difference was statistically significant ($P < 0.05$), but the anti-HAV IgG levels of various LMWH-Na groups were lower than the aluminum adjuvant control group. **Conclusions** LMWH-Na can obviously enhance the HAV antigen induced humoral immune response in mice, and have a value of becoming a new type of vaccine adjuvant.

【Key words】 Low molecular weight heparin sodium (LMWH-Na); Adjuvant; Hepatitis A virus vaccine; Humoral immunity

肝素 (heparin) 是一种由动物结缔组织中的肥大细胞合成的黏多糖物质, 是一种天然抗凝血物质。低分子量肝素 (low molecular weight heparin, LMWH) 是一类平均分子量为 5×10^3 的肝素, 临床应用的低分子量肝素钠是利用化学或酶解方法由普通肝素制备的钠盐^[1]。LMWH 以及它的钠盐 LMWH-Na 在临床上的作用主要是抗凝血, 近年来, 研究发现, LMWH 以及它的钠盐 LMWH-Na 除了具有抗凝血作用外, 还具有抗病毒、抗炎和抗癌的作用^[1]。

LMWH 和 LMWH-Na 的抗病毒作用

近年来研究发现 LMWH 以及其钠盐 LMWH-Na 对不同的病毒有抑制作用。顾小海等^[2]发现, LMWH 可以通过感染阻断途径和直接杀灭法抑制人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV), 与更昔洛韦的抑制病毒增殖机制相互补, 从而达到一个更好的治疗效果。郭研楠等^[3]发现 LMWH 可以竞争结合呼吸道合胞病毒 (respiratory syncytial virus, RSV), 阻断其与肾脏靶细胞结合, 有效的抑制 RSV 对大鼠肾细胞的感染, Frizelle 等^[4]发现 LMWH 可降低柯萨奇病毒 (Coxsackievirus B3, CVB3) 感染小鼠后的病死率。另外, LMWH 对自然界多种病毒如单纯疱疹病毒, 人类免疫缺陷病毒及腺相关病毒等都有抑制作用。关于 LMWH 抗病毒的机制, 很多学者也进行了相关报道, 主要的一种机制是硫酸乙酰肝素 (Heparan sulfate, HS) 是很多病毒的共同受体, 其特有的结构决定了对病毒的特

异性。HS 是一种高度硫酸化的多糖, 参与体内很多生理过程, 是糖胺聚糖参与病毒感染的最重要的结构。另外, 在生理条件下, HS 带有很多负电荷, 可以与正电荷的病毒通过静电作用结合识别, 从而完成病毒与靶细胞的结合, 导致病毒感染, 而 LMWH 有着类似 HS 的结构, 并带有大量的负电荷, 可与 HS 竞争结合病毒, 阻断病毒的感染^[2-3]。

LMWH 和 LMWH-Na 抗炎作用

关于 LMWH 和其钠盐 LMWH-Na 的抗炎作用, 目前有两种不同的理论, 一种是 LMWH 以及 LMWH-Na 的抗炎作用与其抗凝血作用相关^[5]。相关研究表明, LMWH 以及它的钠盐 LMWH-Na 的抗炎作用主要是通过与其特异性作用的凝血因子 FXa^[6]。FXa 是一类能促进炎症反应的酶, 其特异性受体是一类 G 蛋白偶联受体-效应器蛋白酶受体 1 (effector protease receptor-1, ERP1), ERP1 存在于多数白细胞中, 此类白细胞与 FXa 结合后, 会促进自身分泌 IL8, IL6, TNF α , 从而激起机体的炎症反应, 而 LMWH 可通过作用于 FXa 阻断其与 ERP1 的结合, 从而发挥抗炎作用。可能通过抗凝血机制达到抗炎结果的有下述两个实验, 一是韩红等发现 LMWH 可以通过抑制细胞因子 IL8 和 TNF α 的表达从而抑制三硝基苯磺酸 (2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid sol, TNBS) 诱发大鼠结肠炎的炎症现象, 减轻肠粘膜的损伤^[7], 二是 celasco 等^[8]发现 LMWH 通过抑制 IFN γ 的表达水平来抑制由二硝基苯 (dinitrobenzene, DNB) 诱发的大鼠结肠炎

的炎症反应。凝血反应除 FXa 途径引发炎症外,凝血后体内形成的血栓以及参与凝血过程的其他物质也会引发炎症,因此,LMWH 以及 LMWH-Na 通过抗凝血作用来消除血栓也可起到抗炎作用^[5]。另外,LMWH 也可通过非抗凝血机制抗炎,例如,LMWH 可以通过抑制非抗原诱导的肥大细胞脱颗粒起到抗炎的作用^[9]。其机制可能为 LMWH 和 LMWH-Na 中的肝素结构作为三磷酸肌醇(inositol triphosphate, IP3)受体特异性拮抗剂,可阻断 IP3 介导的肥大细胞(mast cell, MC)脱颗粒而引起的超敏反应^[10],从而防止多形核白细胞和淋巴细胞移出血管至炎症处,从而抑制迟发型过敏反应。

LMWH 和 LMWH-Na 的抗癌作用

在抗癌作用方面,LMWH 的作用也引起了很多学者的关注,Pross 等^[11]经研究发现,LMWH 能显著的抑制腹腔内肿瘤的生长和转移。陈公英等^[12]发现 LMWH 对肝癌有一定的治疗作用,其机制是 LMWH 可以抑制新生血管增生,抑制肝素酶活性以及促进细胞凋亡。

基于以上的这些有关 LMWH 以及 LMWH-Na 具有的抗病毒,抗炎以及抗癌等生理作用,我们认为 LMWH 和它的钠盐 LMWH-Na 有成为佐剂的潜力。

本实验旨在探讨 LMWH-Na 佐剂对甲型肝炎病毒疫苗诱导小鼠体液免疫应答的影响,以评价其佐剂效果。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 ICR 小鼠共 48 只,雌性,体重 20 ~ 25 g, 6 ~ 8 周龄,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部提供【SCXK(滇)K2014 - 0002】。所有的操作均按照医学生物研究所动物实验伦理委员会要求进行,实验在医学生物学研究所小动物实验

部动物实验设施内进行【SYXK(滇)K2014 - 0007】。

1.2 主要试剂

甲型肝炎减毒活疫苗 HepA-1(抗原滴度为 256 EU/mL)与 HAV 抗原由中国医学科学院医学生物学研究所提供;低分子量肝素钠购自昆明积大制药有限公司;铝佐剂为 Al(OH)₃胶体(12.5 mg/mL),由中国医学科学院医学生物学研究所提供;小鼠血清 IgG ELISA 试剂盒,购自美国 KPL 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物免疫

将 48 只雌性 ICR 小鼠随机分成 8 组,6 只/组。将不同剂量(100 μL, 20 μL, 10 μL, 1 μL, 0.1 μL)的 LMWH-Na 与 HepA-1(18 EU)混合,设置为 LMWH-Na 不同剂量组,并设阴性对照组 Blank 组、阳性对照组、铝佐剂对照组,均经皮下注射 ICR 小鼠,200 μL/只。于免疫后的第 4、8、12 和 16 周,在小鼠尾静脉部位采血,分离血清,以备检测。见(表 1)。

1.3.2 小鼠血清中抗-HAV IgG 抗体水平的检测

本实验采用间接 ELISA 法。取 HepA-1 抗原加入到 96 孔板中,100 μL/孔,并于湿盒中 4℃ 包被过夜;用 BSA 于 37℃ 封闭 1 h,200 μL/孔;拍净板子后,加入 倍比稀释的小鼠血清(起始稀释倍数为 1:20),100 μL/孔并于 37℃ 封闭 1 h;洗板 4 次后拍净板子,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG(1:400 稀释),100 μL/孔,于 37℃ 封闭 1 h;洗板 4 次,并拍净板子后加入 TMB 显色液,100 μL/孔,显色 10 min;加入 2 mol/L H₂SO₄,100 μL/孔,终止显色反应,于酶标仪 405 nm 和 605 nm 波长处,检测各孔 A 值,以阳性反应的最大稀释度作为样品的抗体效价,根据 ELISA 结果计算各组的平均滴度,并以 Log10 表示。

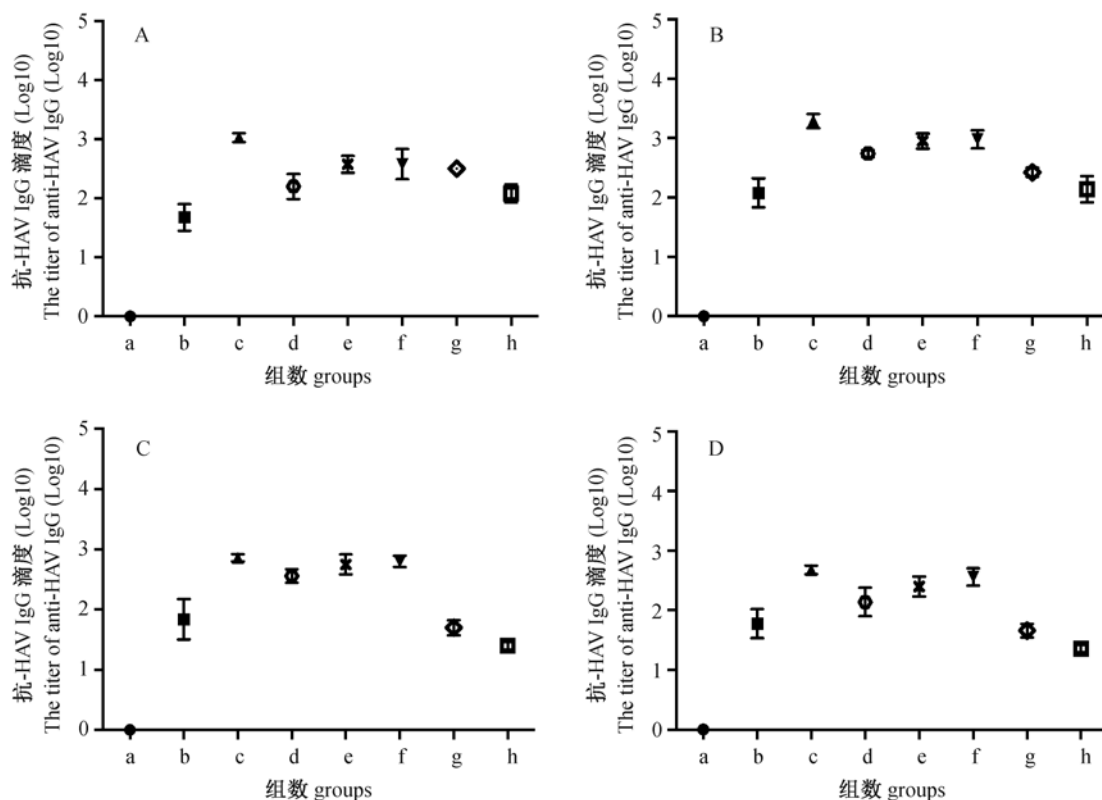
1.4 统计学分析

应用 Graphpad prism 5 软件进行统计学分析,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 动物分组

Tab.1 Groups

组别 group	成分以及含量 Composition and content
空白组 Blank group	生理盐水 200 μL Normal saline 200 μL
阳性对照组 Positive control group	甲肝疫苗 18EU HepA-1 18EU
铝佐剂对照组 Al(OH) ₃ 300 μg group	甲肝疫苗 18EU + 氢氧化铝 300 μg HepA-1 18EU + AL(OH) ₃ 300 μg
低分子量肝素钠 100 μL 组 LMWH-Na 100 μL group	甲肝疫苗 18EU + 低分子量肝素钠 100 μL HepA-1 18EU + LMWH-Na 100 μL
低分子量肝素钠 20 μL 组 LMWH-Na 20 μL group	甲肝疫苗 18EU + 低分子量肝素钠 20 μL HepA-1 18EU + LMWH-Na 20 μL
低分子量肝素钠 10 μL 组 LMWH-Na 10 μL group	甲肝疫苗 18EU + 低分子量肝素钠 10 μL HepA-1 18EU + LMWH-Na 10 μL
低分子量肝素钠 1 μL 组 LMWH-Na 1 μL group	甲肝疫苗 18EU + 低分子量肝素钠 1 μL HepA-1 18EU + LMWH-Na 1 μL
低分子量肝素钠 0.1 μL 组 LMWH-Na 0.1 μL group	甲肝疫苗 18EU + 低分子量肝素钠 0.1 μL HepA-1 18EU + LMWH -Na 0.1 μL



注:A-第4周;B-第8周;C-第12周;D-第16周。a-空白组;b-阳性对照组;c-铝佐剂对照组;d-低分子量肝素钠 100 μ L 组;e-低分子量肝素钠 20 μ L 组;f-低分子量肝素钠 10 μ L 组;g-低分子量肝素钠 1 μ L 组;h-低分子量肝素钠 0.1 μ L 组。

图 1 不同时间各组小鼠血清抗-HAV IgG 水平

Note: A-The 4 week; B-The 8 week; C-The 12 week; D-The 16 week. a-Blank group; b-Positive ncontrol group; c-Aluminium adjuvant control group; d-LMWH-Na 100 μ L group; e- LMWH-Na 20 μ L group; f- LMWH-Na 10 μ L group; g-LMWH-Na 1 μ L group; h- LMWH-Na 0.1 μ L group.

Fig. 1 Anti-HAV IgG titers in sera of mice in different groups at 4, 8, 12 and 16 weeks

2 结果

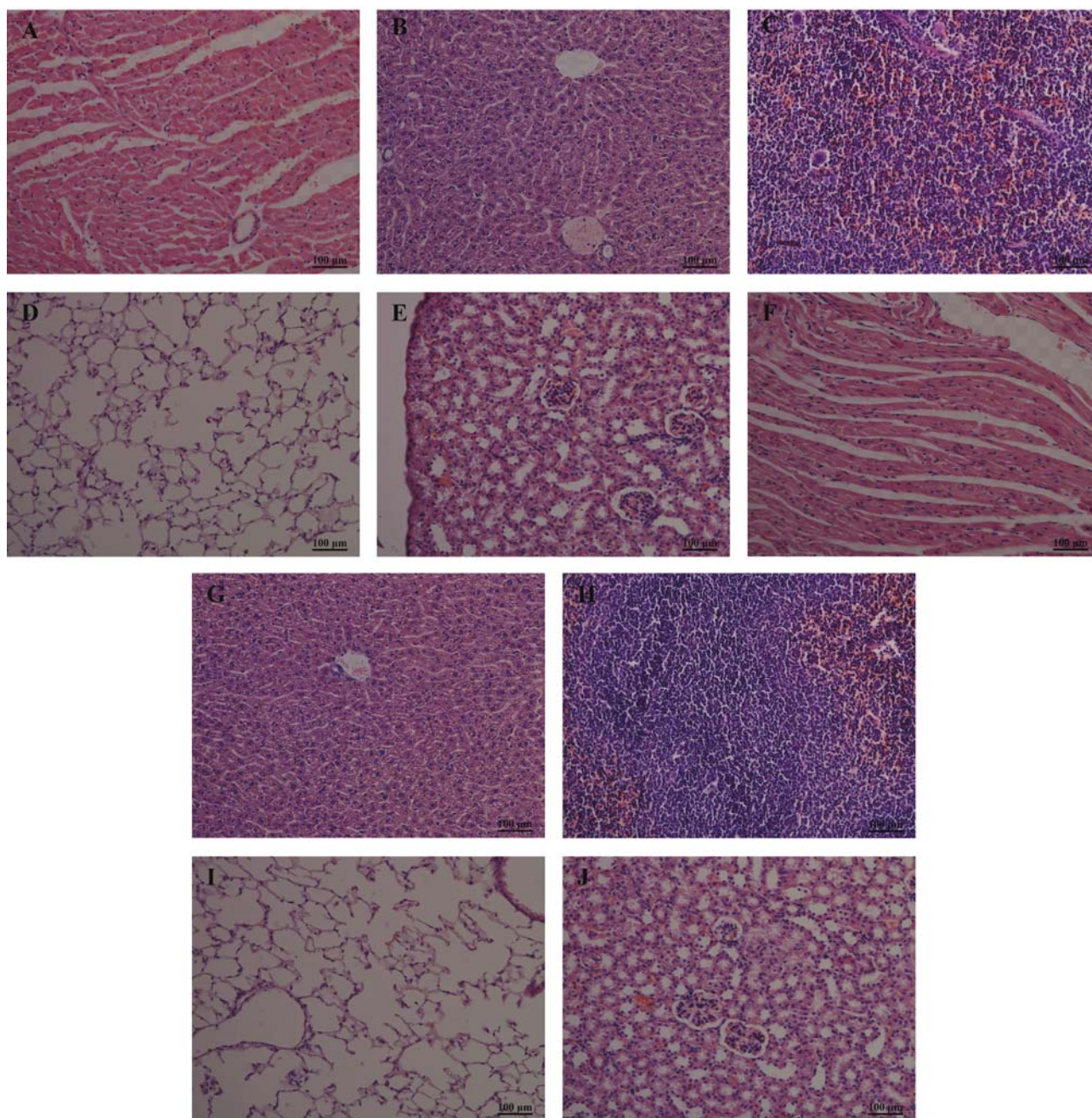
2.1 各组小鼠血清中抗-HAV IgG 抗体水平

除阴性对照组外,各组小鼠免疫后第 4、8、12、16 周,均产生抗-HAV IgG,并随着时间的延长抗体水平逐渐升高,于第 8 周达到最高值,此后逐渐下降。其中,第 4 周,第 8 周,铝佐剂对照组,LMWH-Na 100 μ L 组,LMWH-Na 20 μ L 组,LMWH-Na 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),LMWH-Na 1 μ L 组和 LMWH-Na 0.1 μ L 组的抗体水平也高于抗原对照组,但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$)。第 12 周,铝佐剂对照组,LMWH-Na 20 μ L 组和 LMWH-Na 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组 ($P < 0.05$),虽然,LMWH-Na 100 μ L 组高于阳性对照组,但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$),而 LMWH-Na 1 μ L 组和 LMWH-Na 0.1 μ L 组的抗体水平低于阳性对照组。第 16 周,铝佐

剂对照组和 LMWH-Na 10 μ L 组的抗体水平高于阳性对照组 ($P < 0.05$),LMWH-Na 100 μ L 组,LMWH-Na 20 μ L 组虽然高于阳性对照组但差异不具有统计学意义 ($P > 0.05$),LMWH 1 μ L 组和 LMWH-Na 0.1 μ L 组的抗体水平低于阳性对照组。但在整个实验期间,LMWH-Na 各组的抗体水平都低于铝佐剂对照组的抗体水平。表明 LMWH-Na 可增强 HAV 抗原特异性体液免疫应答,具有佐剂效应,最佳剂量为 10 μ L/组。见图 1。

2.2 佐剂病理学分析

实验期间,低分子量肝素钠各组及对照组各小鼠情况良好,未出现体重降低,休克,精神不振,掉毛,死亡等现象;观察病理切片发现低分子量肝素钠最大剂量组 100 μ L 组和生理盐水对照组小鼠的肾脏、脾脏、肝脏、肺脏、心脏组织均无异常表现,见图 2。说明低分子量肝素钠具有良好的安全性。



注: A-阴性对照组心脏; B-阴性对照组肝脏; C-阴性对照组脾脏; D-阴性对照组肺; E-阴性对照组肾; F-LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)心脏;
G- LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)肝脏; H- LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)脾脏; I-LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)肺;
J- LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)肾。

图 2 阴性对照组和 LMWH-Na 最大剂量组(100 μ L)组小鼠各脏器组织的病理学观察(HE 染色, $\times 20$)

Note: A- the heart of negative control; B-the liver of negative control; C-the spleen of negative control; D-the lung of negative control;

E-the kidney of negative control; F-the heart of LMWH-Na Maximum dose group; G-the liver of LMWH-Na Maximum dose group;

H-the spleen of LMWH-Na Maximum dose group; I-the lung of LMWH-Na Maximum dose group; J-the kidney of LMWH-Na Maximum dose group.

Fig. 2 Pathological changes in various organs of mice in negative control and LMWH 100 μ L group(HE staining, $\times 20$)

3 讨论

佐剂是一类可以增强疫苗诱导的免疫反应的物质,寻找一种有效的新型疫苗除安全性高外,还

应该既能增强疫苗诱导的体液免疫,也能增强疫苗诱导的细胞免疫,并且价格合理。随着生物技术的发展,现如今新型的疫苗佐剂层出不穷,但目前被认证使用的寥寥无几,铝佐剂和流感疫苗佐剂

MF59 是两种被批准应用于人类疫苗的佐剂, 尽管如此, 两种佐剂仍然有着局限性, 作为最广泛使用的佐剂种类, 铝佐剂在安全性上还是存在着瑕疵, 例如在注射部位上易诱发局部的炎症反应, 形成结节等, 更为严重的铝佐剂有让人体发生神经退行性病变的可能^[13], 在效用, 铝佐剂对小分子量抗原免疫应答的增强效果不够理想^[14], 除此之外, 铝佐剂和 MF59 虽然可以有效的增强机体的体液免疫反应, 但其在增强机体的细胞免疫方面效果仍然不明显, 因而其作为疫苗佐剂的效用有一定的缺陷, 为了弥补现有佐剂的这种缺陷, 研究人员做了很多的努力, 包括根据 toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR) 信号途径的关键点作为靶点寻找有效的佐剂并发现了各种 TLR 激动剂^[15], 利用危险模式理论去寻找内源危险信号因子作为佐剂例如硫酸乙酰肝素^[13], 还应用复合佐剂去激发体内的体液免疫和细胞免疫, 但效果依然不佳, 依然不能有效的诱导机体的细胞免疫, 因此, 寻找一种新型的既能增强体液免疫又能增强细胞免疫的新型疫苗佐剂是目前研发疫苗佐剂的任务。

本实验将不同剂量的 LMWH-Na 与 HAV 疫苗混合免疫小鼠, 以用来研究 LMWH-Na 作为佐剂对诱导小鼠体液免疫的效应, 旨在发现一种新型疫苗佐剂, 结果表明, LMWH-Na 可以有效增强小鼠的体液免疫应答, 且安全性良好, 具有开发为新型疫苗佐剂的潜力, 但其的佐剂效应仍然不如铝佐剂的佐剂效应。另外, 为了找到效果优于铝佐剂的佐剂, 我们实验室还进行了复合佐剂诱导体液免疫的研究, 例如氢氧化锌与低分子量透明质酸复合佐剂对甲肝乙肝联合抗原的体液免疫增强作用明显高于铝佐剂的佐剂效应^[16], 所以我们可以寻找一种可增强细胞免疫的佐剂与另一种可增强体液免疫的佐剂作为复合佐剂, 与铝佐剂的佐剂效应以及安全性进行比较, 来寻找比铝佐剂更易于诱导体液免疫并能诱导细胞免疫的佐剂组合。

参考文献:

- [1] 韦传宝. 低分子量肝素钠的制备与临床应用[J]. 生物学杂志, 2006, 23(6): 35-37.
- [2] 顾小海, 顾绍庆, 陈慧娟, 等. 低分子量肝素体外抗人巨细胞病毒的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2010, 25(10): 760-763.
- [3] 郭妍南, 王峥. 低分子肝素-治疗病毒感染的新希望[J]. 国际病毒学杂志, 2007, 14(1): 31-33.
- [4] Frizelle S, Schw arz J, H uber SA, *et al.* Evaluation of the effects of low-molecular weight heparin on inflammation and collagen deposition in chronic coxsackievirus B3-induced myocarditis in A/J mice[J]. *Am J Pathol*, 1992, 141(1): 203-209.
- [5] 罗俊永, 崔慧斐. 低分子肝素的抗炎作用及机制[J]. 生命的化学, 2008, 28(6): 727-729.
- [6] 李丹丹, 孟建中, 等. 低分子肝素的新作用-抗炎/抗细胞粘附机制的研究进展[J]. 生物医学工程研究, 2008, 27(2): 133-136.
- [7] 韩红, 夏冰, 刘君炎. 低分子量肝素对三硝基苯磺酸诱发大鼠结肠炎肿瘤坏死因子、CD62P 的影响[J]. 中华消化杂志, 2003, 23(7): 418-421.
- [8] Celasco G, Moro L, Bozzella R, *et al.* Efficacy of Intracolonic Administration of Low-Molecular-Weight Heparin CB-01-05, Compared to Other Low-Molecular-Weight Heparins and Unfractionated Heparin, in Experimentally Induced Colitis in Rat[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(12): 3170-3175.
- [9] 王庆利, 尚雪原, 纪建波, 等. 低分子量肝素的抗过敏作用[J]. 中国药理学杂志, 2000, 35(2): 95-98.
- [10] 凌沛学. 生物药物研究进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004, 270-275.
- [11] Pross M, Lippert H, Nestler G, *et al.* Effect of low molecular weight heparin on intra-abdominal metastasis in a laparoscopic experimental study[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2004, 19(1): 143-146.
- [12] 陈公英, 李敏伟, 陈智, 等. 低分子肝素抗肝癌细胞增殖及机制研究[J]. 中国肿瘤杂志, 2006, 15(5): 343-345.
- [13] 兰芸, 王海璇, 乌美妮, 等. 内源性危险信号低分子量硫酸乙酰肝素的免疫佐剂作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2011, 24(1): 5-9.
- [14] Xiong YL, Kuang XW, Chen WG, *et al.* Research advances on immunomodulatory effects and mechanism of Chitoooligosaccharides[J]. *Prog in Mod Biomed*, 2009, 9(9): 1787-1789.
- [15] 周洋, 耿兴超, 汪巨峰, 等. 疫苗佐剂最新研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(1): 34-42.
- [16] 施建东, 胡凝珠, 赵蕊蕊, 等. 氢氧化锌与低分子量透明质酸复合佐剂对甲肝乙肝联合抗原的体液免疫增强作用[J]. 中国生物制品学杂志, 2012, 25(1): 29-31.

[修回日期] 2015-12-25