



李兰,杜露平,李明举,陈瑾,张元鹏,侯立婷,秦竹,郑其升. 囊素肽接枝透明质酸聚合物的制备及其免疫增强活性研究[J]. 中国农业大学学报, 2025,30(01): 172-178.

LI Lan, DU Luping, LI Mingju, CHEN Jin, ZHANG Yuanpeng, HOU Liting, QIN Zhu, ZHENG Qisheng. Synthesis of bursin and hyaluronic acid graft copolymer and its immune-enhancing activity[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025,30(01):172-178.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.01.15

囊素肽接枝透明质酸聚合物的制备及其免疫增强活性研究

李 兰¹ 杜露平¹ 李明举⁴ 陈 瑾¹ 张元鹏¹ 侯立婷¹ 秦 竹^{1*} 郑其升^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院 动物免疫工程研究所,南京 210014;

2. 江苏省食品质量安全重点实验室国家重点实验室培育基地,南京 210014;

3. 兽用生物制品(泰州)国泰技术创新中心,江苏 泰州 225300;

4. 烟台市动物疾病预防控制中心,山东 烟台 264033)

摘 要 为使囊素肽(Bursin,BS)更好地发挥免疫增强作用,本研究采用EDC/NHS反应,使透明质酸(Hyaluronic acid,HA)的羧基与囊素肽的氨基发生酰胺化反应,合成囊素肽接枝透明质酸聚合物(BS@HA),进一步通过傅里叶变换红外光谱鉴定聚合物的结构,通过紫外分光光度计进行定量分析,然后以卵清蛋白OVA为模式抗原,BS@HA作为免疫增强剂添加至铝胶做成疫苗,免疫小鼠,利用ELISA和流式细胞仪评价BS@HA的免疫增强作用。结果表明:1)当透明质酸、EDC、NHS和囊素肽的反应摩尔比为1:4:6:0.4,加入EDC后的反应时间为2~4 h,加入NHS后的反应时间为16 h时,合成聚合物的产率可以达到95%,透明质酸的傅里叶红外光谱特征峰从1 605 cm⁻¹红移到1 632 cm⁻¹,囊素肽成功接枝透明质酸。2)当透明质酸羧基取代率为35%左右时,囊素肽接枝透明质酸聚合物可以诱导小鼠产生更高水平的OVA特异性抗体。3)囊素肽接枝透明质酸聚合物能够诱导小鼠产生更高水平的滤泡辅助性T细胞(TFH)和生发中心B细胞(GC B细胞)。综上,囊素肽接枝透明质酸聚合物可以使囊素肽更高效地进入引流淋巴结,诱导活化更高水平的TFH和GC B细胞,促进特异性Ig G抗体的产生。本研究将丰富透明质酸在动物疫苗领域的理论研究,拓展透明质酸在动物疫苗领域的实际应用,同时为新型免疫增强剂的研制奠定基础。

关键词 透明质酸;囊素肽;免疫增强;酰胺反应

中图分类号 S852.4

文章编号 1007-4333(2025)01-0172-07

文献标志码 A

Synthesis of bursin and hyaluronic acid graft copolymer and its immune-enhancing activity

LI Lan¹, DU Luping¹, LI Mingju⁴, CHEN Jin¹, ZHANG Yuanpeng¹, HOU Liting¹, QIN Zhu^{1*},
ZHENG Qisheng^{1,2,3}

(1. Institute of Veterinary Immunology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Cultivation Base of State Key Laboratory for Food Quality and Safety of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China;

3. GuoTai (Taizhou) Center of Technology Innovation for Veterinary Biologicals, Taizhou 225300, China;

4. Yantai Center for Animal Disease Control and Prevention, Yantai 264033, China)

Abstract To enhance the immune effect of Bursin (BS), we attempted to graft BS to Hyaluronic acid. The

收稿日期: 2024-03-18

基金项目: “十四五”重点研发专项(2022YFD1800800)

第一作者: 李兰(ORCID:0009-0007-5588-2951),助理研究员,主要从事兽用免疫增强剂研究,E-mail:lanli99@foxmail.com

通讯作者: 秦竹(ORCID:0009-0008-3696-2865),副研究员,主要从事兽用疫苗研究,E-mail:qinz@jaas.ac.cn

amino groups of BS was utilized for direct coupling with the carboxylic groups on hyaluronic acid to obtain BS@HA by EDC and NHS. The structure of the polymer was identified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), quantitative analysis was performed using UV measurement. Then the mice were immunized with the vaccine formulated with simulated antigen OVA, BS@HA and aluminum hydroxide adjuvant and detected the immune enhancing effect by ELISA and flow cytometry. The results showed that : 1) The yield of the synthesized polymer could reach 95% when the molar ratio of hyaluronic acid, EDC, NHS, and BS was 1:4:6:0.4, the reaction time was 2-4 hours and 16 hours after adding EDC and NHS respectively. The FTIR characteristic peaks of HA shifting from $1\ 605\text{ cm}^{-1}$ to $1\ 632\text{ cm}^{-1}$ showed BS@HA was successfully prepared. 2) BS@HA can induce higher expression of OVA-specific antibodies when the degrees of substitution (DS) was about 35%. 3) BS@HA also can induce higher percentages of Follicular helper T cells and germinal center B cells. Therefore, it is spected BS@HA could enhance targeted delivery of immunogens to draining lymph nodes, induce more TFH and GC B cells and evoke high antigen-specific IgG titers. This study will enrich the theoretical research of hyaluronic acid in the field of animal vaccines, expand its practical application in the animal vaccines and lay the foundation for the development of novel immune enhancers.

Keywords hyaluronic acid; bursin; immune-enhancing effect; amidation reaction

囊素肽(Bursin,BS)是于1986年首次从鸡法氏囊提取液分离出来的一种多肽^[1],研究表明囊素肽能够增强禽类及哺乳动物的免疫反应,提高体液免疫和细胞免疫水平^[2-5]。不同结构的囊素肽衍生物具有不同的免疫增强活性^[2],这可能与其进入机体后的稳定性有关。小肽类物质进入机体易被降解,半衰期短,有资料显示天然囊素的半衰期只有20 min^[6];另外囊素肽作为小分子,容易进入血液循环,而不能抵达淋巴结,这极大可能限制了其免疫增强作用的发挥,导致临床使用效果不尽如意。

近几年透明质酸(Hyaluronic acid,HA)作为运输载体越来越受到青睐^[7-9]。HA作为一种由葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-氨基葡萄糖反复交替连接构成的天然多糖^[10],具有无毒性、无免疫原性、可生物降解、生物相容性好等优点,已被广泛应用于食品、化妆品和医药领域。另外HA含有丰富的活性基团,具有较好的可修饰性^[11],有研究将寡肽、TLR7/8激动剂、CpG等小分子枝接到透明质酸上,以提高枝接物的稳定性及靶向递送^[12-14]。

鉴于以上,本研究尝试使用HA对囊素三肽进行化学修饰,采用EDC/NHS催化系统,使HA的羧基与囊素三肽的氨基发生酰胺化反应,制备囊素肽接枝透明质酸聚合物,旨在提高囊素肽在机体的稳定性,并希望通过HA的靶向作用使囊素肽更高效运输至引流淋巴结。研究还进一步评价其对铝胶佐剂的免疫增强作用,为新型免疫增强剂的研制提供理论支持和研究思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

透明质酸钠购于上海源叶生物科技有限公司。囊素肽由上海吉尔生化有限公司合成,HPLC纯度为95%。1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride,EDC·HCl)购于梯希爱化成工业发展有限公司。N-羟基丁二酰亚胺(N-Hydroxysuccinimide, NHS)购于Sigma公司。2-(N-吗啉)乙磺酸(2-(4-morpholinyl) ethanesulfonic acid hydrate, MES)购于北京索莱宝科技有限公司。流式抗体PE标记的 anti-CXCR5、FITC 标记的 anti-Bcl-6、PE 标记的 anti-Vio770/CD4、FITC 标记的 anti-B220、PE 标记的 anti-GL-7、APC 标记的 anti-CD38、FITC 标记的 anti-CD3和PE标记的 anti-CD8a均购于上海优宁维生物科技股份有限公司。氢氧化铝佐剂购于赛默飞世尔科技公司。6周龄清洁级ICR雌性小鼠购自扬州大学。

1.2 囊素肽接枝透明质酸聚合物的制备

1.2.1 BS@HA聚合物的合成

反应物最佳添加比例的优化:称取0.25 g HA溶解于20 mL MES缓冲液,搅拌至完全溶胀溶解,分装于7 mL西林瓶,4 mL/瓶,分别标记R₁、R₂、R₃和R₄,首先取100、150、200和250 μL 0.25 g/mL的EDC溶液加于上述R₁~R₄ HA溶液中,磁力搅拌条件下,室温反应2 h,然后添加

100、150、200和250 μL 0.225 g/mL的NHS溶液,继续反应5 h,用NaOH调节pH至7.0,最后均添加100 μL 溶剂为高浓度PBS的囊素肽溶液(0.44 g/mL),继续反应16 h。样品 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 中HA:EDC:NHS:BS所对应的摩尔比分别为1:2:3:1、1:3:4.5:1、1:4:6:1和1:5:7.5:1。

反应时间的优化:大致试验步骤同上,具体地:按上述方法配制HA溶液,分别标记 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 ,按上述1:4:6:1的摩尔比添加HA、EDC、NHS和BS,加入EDC后反应时间为分别为2、2、4和4 h,加入NHS后反应时间分别为5、16、5和16 h。同时设置不添加EDCHCl和NHS作为对照,标记为C;另外按HA:EDC:NHS:BS=1:4:6:0.4,反应时间分别为2和16 h的条件制备聚合物,标记为RT。

反应结束,将上述 $R_1 \sim R_4$ 、 $T_1 \sim T_4$ 和RT反应液采用截留分子量为8000的透析膜进行透析,浓缩,冷冻干燥后即得BS@HA,然后使用傅里叶变换红外光谱(FTIR)鉴定是否接枝成功。

1.2.2 BS@HA聚合物中囊素肽的定量

BS@HA紫外分光光度检测方法的建立:配制浓度为10 mg/mL的透明质酸钠水溶液和浓度为8.5 mg/mL的囊素肽水溶液,同时配制内含透明质酸钠和囊素肽的混合溶液,其中透明质酸钠和囊素肽的浓度同上,将3种溶液加于紫外检测酶标板,利用紫外分光光度计进行全波段扫描,找到囊素肽有强吸收而透明质酸钠无吸收的波长,确定检测波长。

配制已知浓度为50 mg/mL的囊素肽溶液,作为原液,然后对其进行梯度稀释,获得浓度分别为8、6、4、2、1和0.5 mg/mL的标准溶液;分别称取0.01 g $R_1 \sim R_4$ 、 $T_1 \sim T_4$ 和RT样品溶于1 mL水中,制备相应的聚合物溶液,经紫外分光光度计检测并记录 OD_{230} 值,经标准曲线计算聚合物溶液中囊素肽的浓度,并根据下述公式计算各聚合物的产率和取代率:

产率=接枝到透明质酸的囊素肽的质量÷投入的囊素肽的质量;

取代率=接枝到HA的激动剂的摩尔量÷HA羧基的摩尔量。

1.3 囊素肽接枝透明质酸聚合物免疫增强活性评价

1.3.1 BS@HA诱导小鼠产生OVA特异性抗体的检测

称取适量OVA及聚合物 R_3 、 T_4 和RT溶于1 mL PBS,与等体积铝胶佐剂混匀;另外称取OVA及囊素肽或单独的OVA,溶于1 mL PBS,与铝胶佐剂混匀。最终每100 μL 含50 μg OVA和40 μg 囊素肽。

取24只雌性小鼠,随机分为3组,每组8只,皮下免疫,100 μL /只,于免后第14、28、35、42和49天采血分离血清,利用间接ELISA方法检测产生的OVA特异性抗体水平。

1.3.2 流式细胞术检测滤泡辅助性T细胞和生发中心B细胞水平

取9只雌性小鼠随机分为3组,每组3只,皮下免疫,100 μL /只,免疫后第14天,采集腹股沟淋巴结,使用含青链霉素的PBS冲洗5次,置于2 mL含有2%胎牛血清的PBS中,使用200目无菌细胞过滤器制备单个淋巴细胞悬液。计数后分别取 1×10^6 个细胞于2个1.5 mL EP管,分别标记I、II。管I利用流式抗体PE标记的anti-CXCR5、FITC标记的anti-Bcl-6和PE标记的anti-Vio770/CD4进行染色,标记滤泡辅助性T细胞(TFH细胞)管II利用流式抗体FITC标记的anti-220、PE标记的anti-GL-7和APC标记的anti-CD38进行染色,标记生发中心B细胞(GC B细胞),最后进行流式细胞术检测。

1.4 数据处理及差异性分析

利用Graph Prism软件对数据进行分析。2组之间的差异利用 t 检验评估。 $P > 0.05$ 表示差异不显著(ns); $P < 0.05$ 表示差异显著(*); $P < 0.01$ (**)、 $P < 0.001$ (***)、 $P < 0.0001$ (****)表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 囊素肽接枝透明质酸聚合物的结构鉴定

囊素肽接枝透明质酸聚合物的合成过程如图1所示,囊素肽通过EDC与NHS对羧基的活化,与透明质酸合成目标产物。使用傅里叶变换红外光谱表征其结构特征,由图2可知,透明质酸在3269、1605、1402、1026和945 cm^{-1} 处呈现典型条带,分别

对应于羟基(宽而钝的强峰)、羧基的反对称强峰、羧基的对称s伸缩振动中峰、C-O和C-OH对应的糖的特征吸收强峰和糖环反对称平面外振动弱峰。由于

透明质酸的羧基与囊素的氨基发生了酰胺化反应,透明质酸的特征峰发生红移,从 $1\ 605\text{ cm}^{-1}$ 移到 $1\ 632\text{ cm}^{-1}$,表明囊素肽成功接枝透明质酸。

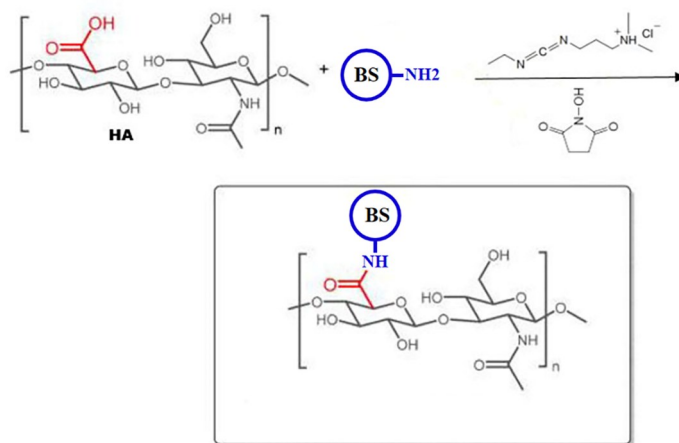


图1 囊素肽接枝透明质酸聚合物的合成路线

Fig. 1 Synthesis route of hyaluronic acid polymer with grafted bursin

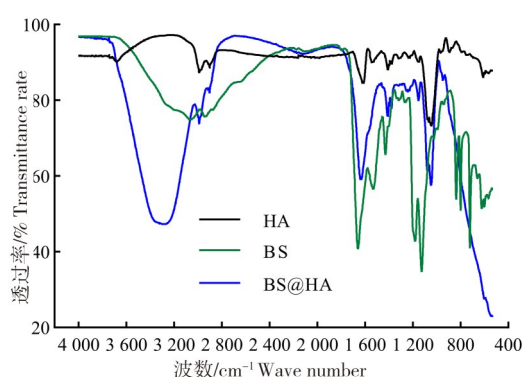


图2 囊素肽接枝透明质酸聚合物的红外光谱图

Fig. 2 FTIR spectra of hyaluronic acid polymer with grafted bursin

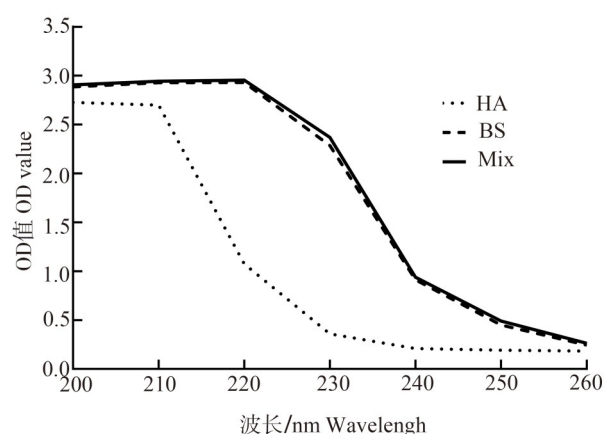


图3 HA、BS及HA-BS混合物的紫外吸收

Fig. 3 The UV absorption of HA, BS and HA-BS mixture

2.2 囊素肽接枝透明质酸聚合物紫外检测方法的建立

利用紫外分光光度计对透明质酸、囊素肽及其混合物进行全波段扫描,图3表明囊素肽在230 nm处有强吸收,而透明质酸在230 nm处无吸收,基于此建立了检测BS@HA的紫外吸收法。囊素肽在0.5~8 mg/mL范围内,线性关系良好,标准曲线方程为 $y=0.335\ 3x+0.271\ 2$, $R^2=0.992$,可以用于BS@HA的定量分析。

2.3 反应物摩尔比和反应时间对聚合物产率的影响

利用2.1建立的囊素肽检测方法,对聚合物中

囊素肽进行定量,进行产率分析。表1显示当EDC/NHS的摩尔比为2:3、3:4.5和4:6时,产率分别为36.6%、51.6%和60.4%,产率随着EDC和NHS使用量的增加而显著提高,继续增加EDC和NHS的使用量,其摩尔比为5:7.5时,产率未见显著提升,因此,透明质酸、EDC、NHS和囊素肽的最佳反应摩尔比为1:4:6:1。

当加入EDC和NHS后的反应时间为2和5 h、2和16 h、4和5 h、4和16 h时,产率分别为65.8%、95.9%、85.4%和97.1%,随着第一步和第二步反应时间的延长,产率有不同程度的提升,当固定第一步反应时间为2或4 h,第二步反应时间为16 h

表1 各样品的产率和取代率
Table 1 Yield and degree of substitution of each samples %

样品号 Sample No.	产率 Yield	取代率 Degree of substitution
R ₁	36.6	44
R ₂	51.6	61
R ₃	60.4	70
R ₄	55.9	66
T ₁	65.8	62
T ₂	95.9	89
T ₃	85.4	79
T ₄	97.1	91
C	6.8	10
RT	98	35.8

时,产率达到了95%以上,表明加入NHS后的反应时间对反应效率有着较大的影响。表3还显示对照组聚合物产率为6.8%,表明在缺少EDC/NHS时,透明质酸与囊素肽几乎不发生反应。

2.4 小鼠产生的OVA特异性抗体

选择取代率不同的3种聚合物R₃(70%)、T₄(91%)和RT(35.8%)制备疫苗,利用间接ELISA方法检测各时间点小鼠OVA IgG抗体水平。图4显示:免疫后第14~49天RT组抗体水平显著高于其他组,且第21天和第28天,RT组抗体水平较第14天显著提高,缓慢下降至第42天;R₃组抗体水平明显低于RT组,但较T₄组高,提示取代率可能影响

着聚合物的免疫增强作用,上述结果表明囊素肽接枝透明质酸聚合物当羧基取代率为35%左右时可以增强OVA诱导的免疫应答,显著提高抗体水平。

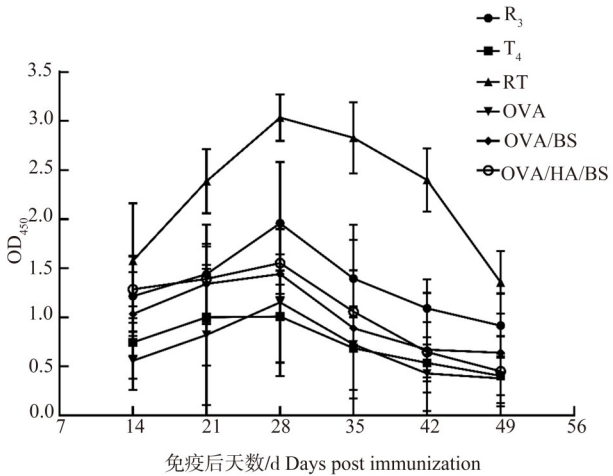
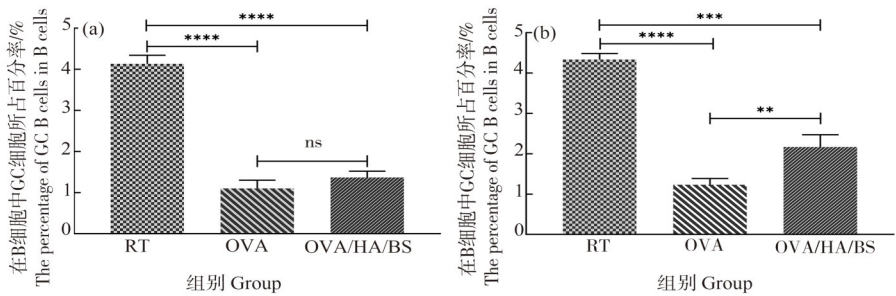


图4 免疫OVA后小鼠特异性抗体检测
Fig.4 Specific antibody titers in mice following vaccination with OVA

2.5 BS@HA对小鼠腹股沟淋巴结TFH细胞和GC B细胞的影响

流式细胞术检测免疫后第14天GC B细胞和TFH细胞比例。如图5所示,RT组GC B细胞占总B细胞比例显著高于OVA疫苗组($P<0.0001$)和OVA/HA/BS疫苗组小鼠($P<0.0001$),且RT疫苗组TFH占CD4⁺T细胞比例也显著高于OVA疫苗($P<0.0001$)和OVA/HA/BS疫苗组小鼠($P<0.001$)。



ns代表组间差异不显著($P>0.05$);**、***、****分别代表组间差异极显著($P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$)。
(a)在B细胞中GC B细胞所占百分率;(b)在T细胞中TFH细胞所占百分比。
ns represents no differences between groups ($P>0.05$) and **, ***, **** represent extremely significant differences between groups ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$). (a) The percentage of GC B cells in B cells; (b) The percentage of TFH cells in T cells.

图5 免疫后14d小鼠腹股沟淋巴结GC B细胞和TFH细胞分化水平

Fig. 5 The differentiation levels of GC B and TFH cells in draining lymph nodes of mice at 14 days post-immunization

3 讨论与结论

囊素肽是一种广谱免疫增强剂,可以提高鸡新城疫、鸡传染性法氏囊病、禽流感、鸭疫里氏杆菌病、牛病毒性腹泻、猪口蹄疫、猪链球菌II型感染、猪伪狂犬病和猪瘟等多种疫苗的免疫水平^[15-16]。但是,多肽在复杂的生理环境中易被蛋白酶降解,生物利用率不高,严重限制了其在生产中的应用。

透明质酸富含可化学修饰改性的羧基和羟基等功能基团,近年来越来越多地应用到药物递送领域。本研究通过酰胺化反应,制备囊素肽接枝透明质酸聚合物。紫外吸收和红外图谱表征显示囊素肽已成功接枝到透明质酸上,结果还表明反应物摩尔比例和反应时间对接枝效率有着重要的影响,这与前人的研究结果是一致的^[17-19]。当透明质酸:EDC:NHS:囊素肽的摩尔比为1:4:6:0.4时,加入EDC后的反应时间为2~4 h,加入NHS后的反应时间为16 h时,接枝产率能够达到95%。该反应条件温和,所需设备简单,制备步骤便捷,具有实际生产应用的潜在价值。

疫苗发挥作用的关键在于抗原呈递细胞有效摄取抗原和免疫增强剂,并将其呈递给T细胞和B细胞,诱导适应性免疫应答。淋巴结拥有大量免疫细胞,也是适应性免疫应答的主要场所,因此抗原或免疫增强剂靶向递送至淋巴结,对高亲和力抗体的产生具有十分重要的作用^[20-21]。研究结果发现相较于取代率为70%和91%的BS@HA,取代率为35.8%的BS@HA能够诱导产生更高水平的抗原特异性IgG,羧基参与透明质酸和受体的结合,笔者推测羧基取代率较高的BS@HA与受体的亲和力下降,因此由透明质酸靶向携带至淋巴结的BS减少,进而影响其免疫效果。研究结果还表明取代率为35.8%的BS@HA能够活化诱导TFH细胞,促进生发中心B细胞的形成。有报道将TLR7和TLR8激动剂接枝到透明质酸或N-2-羟丙基-甲基丙烯酰胺聚合物上,可以显著提高淋巴结中细胞因子的表达,诱导产生更高水平的IgG抗体^[13,22],Zhang等^[14]使用右旋糖酐可以将CpG运输至淋巴结,提高被树突状细胞、巨噬细胞等提呈细胞的摄取率,诱导产生CD8⁺T细胞反应。由此可以推测透明质酸携带囊素肽可能通过淋巴管进入引流淋巴结的被膜下窦,有助于被膜下窦巨噬细胞的摄取,增强局部先天免疫信号,诱导随后的适应性免疫应答。

综上,本研究成功将囊素肽接枝到透明质酸上,利用小鼠作为模式动物,OVA作为模式抗原,检测了囊素肽接枝透明质酸聚合物对OVA免疫原性的增强作用并对其免疫增强活性进行了初步评价,后期将进一步检测其对禽流感、猪瘟等抗原的免疫增强活性,以评价其实际应用价值;并解析其发挥免疫增强作用的机制,为新型免疫增强剂的开发提供一种思路,同时为高质量兽用疫苗的研发奠定基础。

参考文献 References

- [1] Audhya T, Kroon D, Heavner G, Viamontes G, Goldstein G. Tripeptide structure of bursin, a selective B-cell-differentiating hormone of the bursa of fabricius[J]. *Science*, 1986, 231(4741):997-999
- [2] 宗玉霞, 卢宇, 郑其升, 侯继波, 陈博言. 不同结构对囊素样肽的免疫活性影响[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(11):1689-1693
Zong Y X, Lu Y, Zheng Q S, Hou J B, Chen P Y. The relationship between the structure and immune enhancement of bursin like peptides [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2012, 32(11): 1689-1693 (in Chinese)
- [3] Wang C, Li X K, Wu T C, Li D Y, Niu M F, Wang Y, Zhang C J, Cheng X C, Chen P Y. Bursin-like peptide (BLP) enhances H9N2 influenza vaccine induced humoral and cell mediated immune responses [J]. *Cellular Immunology*, 2014, 292(1/2):57-64
- [4] Cai M H, Zhu F, Wu H C, Shen P P. A new recombinant hybrid polypeptide and its immunologic adjuvant activity for inactivated infectious bursal disease vaccine[J]. *Biotechnology Letters*, 2014, 36(7): 1431-1437
- [5] Wang C, Wen W Y, Su C X, Ge F F, Dang Z G, Duan X G, Cao R B, Zhou B, Chen P Y. Bursin as an adjuvant is a potent enhancer of immune response in mice immunized with the JEV subunit vaccine[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 122(3/4):265-274
- [6] Gagnon L, DiMarco M, Kirby R, Zacharie B, Penney C L. D-LysAsnProTyr tetrapeptide: A novel B-cell stimulant and stabilized bursin mimetic[J]. *Vaccine*, 2000, 18(18):1886-1892
- [7] Bokaty A N, Dubashynskaya N V, Skorik Y A. Chemical modification of hyaluronic acid as a strategy for the development of advanced drug delivery systems[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 1(337):122145
- [8] Roth G A, Saouaf O M, Smith A A, Gale E C, Hernández M A, Idoyaga J, Appel E A. Prolonged codelivery of hemagglutinin and a TLR7/8 agonist in a supramolecular polymer-nanoparticle hydrogel enhances potency and breadth of influenza vaccination [J]. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 2021, 7(5):1889-1899
- [9] 张晓月, 王晓娜, 蒋敏, 韩婷婷, 龚劲松, 李清娜, 杨素珍, 史劲松. 酚酸-透明质酸钠接枝物的制备及体外抗氧化研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2024, 51(8):1-16
Zhang X Y, Wang X N, Jiang M, Han T T, Gong J S, Li Q N, Yang S Z, Shi J S. Preparation and physicochemical properties of phenolic acid-sodium hyaluronate copolymers and in vitro antioxidant activity assessment[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2024, 51(8): 1-16 (in Chinese)
- [10] Choi K Y, Han H S, Lee E S, Shin J M, Almquist B D, Lee D S, Park J H. Hyaluronic acid-based activatable nanomaterials for stimuli-responsive imaging and therapeutics: Beyond CD44-mediated drug delivery [J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(34):1803549
- [11] 王光伟. 透明质酸接枝原花青素的制备及干眼症缓解应用的探索性研究

- [D]. 武汉:华中科技大学,2023
- Wang G W. Preparation of hyaluronan grafted procyanidins and exploratory study on the application of dry eye relief [D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology,2023 (in Chinese)
- [12] 姬胜利,殷金岗. 一种乙酰透明质酸寡肽及其制备与应用方法. 中国, ZL201910963468.3 [P]. 2022-11-1
- Ji S L, Yin J G. A preparation method of acetyl hyaluronic acid oligopeptide and its appliation. China, ZL201910963468.3 [P]. 2022-11-1 (in Chinese)
- [13] Yoo E, Salyer A C D, Brush M J H, Li Y P, Trautman K L, Shukla N M, De Beuckelaer A, Lienenklaus S, Deswarte K, Lambrecht B N, De Geest B G, David S A. Hyaluronic acid conjugates of TLR7/8 agonists for targeted delivery to secondary lymphoid tissue [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2018, 29(8): 2741-2754
- [14] Zhang W D, An M, Xi J C, Liu H P. Targeting CpG adjuvant to lymph node via dextran conjugate enhances antitumor immunotherapy [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2017, 28(7): 1993-2000
- [15] 丁丽军,潘陈苗,赵永前,俞火根,卢宇. 合成囊素三肽对猪瘟疫苗免疫效果的影响[J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(5): 18-20
- Ding L J, Pan C M, Zhao Y Q, Yu H G, Lu Y. Immune effect of synthetic bursin on classical swine fever vaccine [J]. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2014, 39(5): 18-20 (in Chinese)
- [16] Zeng Y K, Gong Z X, Wu B B, Guan W C, Yu S Y, An Y J, Lu R B, Zhao J R, Wu Y J, Huang Y F, Wu X P. A novel Bursin-like peptide as a potential virus inhibitor and immunity regulator in SPF chickens infected with recombinant ALV [J]. *BMC Veterinary Research*, 2019, 15(1): 447
- [17] Jang L S, Keng H K. Modified fabrication process of protein chips using a short-chain self-assembled monolayer [J]. *Biomedical Microdevices*, 2008, 10(2): 203-211
- [18] D'Este M, Eglin D, Alini M. A systematic analysis of DMTMM vs EDC/NHS for ligation of amines to hyaluronan in water [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2014, 108: 239-246
- [19] Ukawa M, Tanishita S, Yagi H, Yoshida Y, Tomono T, Shigeno K, Tobita E, Uto T, Baba M, Sakuma S. Biodegradable hyaluronic acid modified with tetraglycine-l-octaarginine as a safe adjuvant for mucosal vaccination [J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2019, 16(3): 1105-1118
- [20] 杜露平,侯立婷,于晓明,程海卫,郑其升,陈瑾. 免疫增强剂 CVC1302 辅助抗原诱导小鼠机体产生长效体液免疫应答的研究 [J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(3): 597-603
- Du L P, Hou L T, Yu X M, Cheng H W, Zheng Q S, Chen J. The mechanism of immunopotentiator CVC1302 in promoting long-term humoral immune responses in mice [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(3): 597-603 (in Chinese)
- [21] Ke X Y, Howard G P, Tang H Y, Cheng B, Saung M T, Santos J L, Mao H Q. Physical and chemical profiles of nanoparticles for lymphatic targeting [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2019, 151-152: 72-93
- [22] Lynn G M, Laga R, Darrah P A, Ishizuka A S, Balaci A J, Dulcey A E, Pechar M, Pola R, Gerner M Y, Yamamoto A, Buechler C R, Quinn K M, Smelkinson M G, Vanek O, Cawood R, Hills T, Vasalatiy O, Kastenmüller K, Francica J R, Stutts L, Tom J K, Ryu K A, Esser-Kahn A P, Etrych T, Fisher K D, Seymour L W, Seder R A. *In vivo* characterization of the physicochemical properties of polymer-linked TLR agonists that enhance vaccine immunogenicity [J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 1201-1210

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 李兰, 博士, 江苏省农业科学院助理研究员。研究方向为兽用免疫增强剂的研究, 获国家发明专利 1 项, 发表多篇学术论文。



通讯作者简介: 秦竹, 博士, 江苏省农业科学院副研究员。主要从事免疫增强分子结构设计、合成及其纳米化的研究工作, 主持国家自然科学基金、江苏省农业科技自主创新资金等项目 4 项, 相关研究成果已发表论文 20 余篇, 申请发明专利 6 项。