复合材料学报 Acta Materiae Compositae Sinica
第25卷 第6期 12月 2008年
Vol. 25 No. 6 December 2008

文章编号：1000-3851(2008)06-0016-06

海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊的制备及其生物相容性

杨达云[1]，黄晓楠[1]，王士斌*[1,2]，刘源岗[1]，蓝 琪[1]，吴文果[1]
(1. 华侨大学 化工学院，厦门 361021；2. 华侨大学 制药工程研究所，厦门 361021)

摘 要： 以海藻酸盐、聚精氨酸为壁材，采用高压静电法制备了球形度好、表面光洁、粒径均匀的新型药物载体——海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊。参照医疗器械生物学评价标准，对其生物相容性进行了研究。细胞毒性试验结果显示，当海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊的含量为0.1、0.5、1.0 mg/mL时，微胶囊对L929细胞生长无明显抑制作用，海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊浸提产物在10.0 mg/mL时仍无细胞毒性作用。海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊不引起急性全身毒性反应，不引起溶血反应。通过本组试验可见，采用高压静电法制备的药物载体——海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊具有较好的生物相容性，具有开发和应用价值。

关键词： 海藻酸盐；聚精氨酸；微胶囊；生物相容性
中图分类号： R318.08；TB34 **文献标志码：** A

Preparation and biocompatibility of alginate/poly(L-arginine) microcapsules

YANG Dayun[1], HUANG Xiaonan[1], WANG Shibin*[1,2], LIU Yuangang[1], LAN Qi[1], WU Wenguo[1]
(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;
2. Institutes of Pharmaceutical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: A novel drug carrier based on alginate and poly-L-arginine was fabricated. The alginate/poly(L-arginine) microcapsules with good sphericity, smooth surface and well-proportioned particle size were prepared by the high voltage electrostatic method. According to the standard for the biological evaluation of medical devices, the biocompatibility of alginate/poly(L-arginine) microcapsules was studied. The cytotoxicity studies show that the alginate/poly(L-arginine) microcapsules have no significant growth inhibition effect on L929 cells when they were used at 0.1, 0.5, 1.0 mg/mL. The extract productions of the alginate/poly(L-arginine) microcapsules do not show cytotoxic effect even at 10.0 mg/mL. The alginate/poly(L-arginine) microcapsules have no acute systemic toxicity and no hemolytic reaction. All results indicate that the alginate/poly(L-arginine) microcapsules, prepared by the high voltage electrostatic method, have acceptable biocompatibility and might be an appropriate candidate for macromolecule drug delivery, and it is worthy of a further research.

Keywords: alginate; poly-L-arginine; microcapsule; biocompatibility

近年来，微胶囊被广泛用于蛋白质、多肽、基因药物的控制释放及细胞免疫隔离移植，在药物体内传递及细胞治疗研究领域引起了极大的关注[1-3]。探索和应用各种类型合成的或天然的聚合物制备结构稳定、生物相容性好、生物可降解的微胶囊是该领域的研究重点。目前的制备材料主要有聚乳酸、聚乙醇酸、乳酸乙醇酸共聚物、聚氨基酸、多聚糖、聚碳酸酯、聚原磷酯、聚磷脂、聚酸酐、聚己内酯、乙基纤维素、纤维蛋白等[4-5]。

聚精氨酸是人工合成的生物可降解的氨基酸类聚合物，具有优良的物理化学性能，如可进行功能化设计，容易与阴离子型聚合物结合形成稳定的复合物，比其它阳离子型聚合物更容易穿越细胞，能够促进药物穿越生物膜和组织进行释放[6-7]等。其降解产物精氨酸是人体半必需氨基酸之一，具有营养作用和药理功效，如可改善肠黏膜屏障功能，促进黏膜细胞的增殖和抑制其凋亡[8]，具有免疫促进作用，能提高机体免疫功能[9]，能促进伤口治愈[10]，增强创伤肌肉的再生[11]等。海藻酸钠是天然的可生物降解高分子聚合物，其来源丰富、生物

收稿日期： 2008-03-06；**收修改稿日期：** 2008-06-02
基金项目： 国家863计划项目(2006AA02A118)；国家自然科学基金资助项目(30370415)；福建省自然科学基金资助项目(C0710034)
通讯作者： 王士斌，教授，主要从事生物复合材料研究 E-mail：sbwang@hqu.edu.cn

相容性好、易于凝胶化，已被广泛应用于微胶囊骨架及成膜材料。

本课题组以聚精氨酸(poly-L-arginine)为膜材料，借助高压静电液滴装置制备了结构稳定、粒径均匀的海藻酸钙/聚精氨酸微胶，并以牛血红蛋白等为模型药物考察了微胶囊对药物的控制释放性能。研究表明，聚精氨酸微胶囊对大分子药物有较好的缓释性能，有望成为一种具有介入治疗效果的药物缓控释载体[12-13]。

良好的生物相容性是生物材料临床应用的前提条件。本文中采用高压静电法制备了海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊，并拟通过细胞毒性、急性全身毒性、溶血试验对其生物相容性进行研究。

1 实验部分

1.1 实验材料

海藻酸钠(Alginate，M_w：12000～80000)及聚精氨酸(poly-L-arginine，M_w：55300)购自 Sigma 公司，新生牛血清及 DMEM 培养基为 GIBCO 产品，MTT 及胰蛋白酶购自 Amresco 公司，氨卞青霉素及硫酸链霉素购自 BBI，其它试剂均为国产分析纯试剂。L929 小鼠成纤维细胞购自中国科学院上海细胞库，SPF 级昆明种小鼠由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。

1.2 海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊的制备及灭菌

将海藻酸钠溶于去离子水中配制成质量浓度为 20.0 g/L 的溶液，再将海藻酸钠溶液依次经过 0.8 μm、0.45 μm、0.22 μm 微孔滤膜过滤。通过高压静电液滴装置，将过滤的海藻酸钠溶液滴入质量浓度为 15.0 g/L 的 $CaCl_2$ 水溶液中制备海藻酸钙胶珠，实验条件：电压 6.3 kV，液面距 20 mm，注射泵推进速度 50 mm/h，针头内径 0.4 mm[1, 13]。收集海藻酸钙胶珠并用蒸馏水洗涤 2 次，然后将胶珠转移至质量浓度为 0.5 g/L 的聚精氨酸水溶液中，连续浸泡反应 10 min，制备海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊，收集微胶囊，经乙醇梯度洗脱后冷冻干燥。按试验需要，将一定量的海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊转入铝箔封帽的小玻璃瓶内，经过标记和包装后，进行^{60}Co 辐射灭菌，灭菌剂量为 6.0 kGy。

1.3 微胶囊的形态特征及粒径分布

采用日本奥林巴斯公司 BHS 型生物显微镜观察微胶囊在溶液中的形态；采用日本日立公司 S-3500N 型扫描电子显微镜观察微胶囊干燥后的表面形貌。采用济南微纳仪器有限公司 Winner 2000 激光粒度分析仪测定海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊干燥后的粒径及粒度分布。

1.4 微胶囊浸提液的制备

将经过辐射灭菌的海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊分别按 20.0 mg/mL 的比例加入 DMEM 完全培养液(含 10%新生牛血清，100 μg/mL 氨卞青霉素，100 μg/mL 硫酸链霉素)，按 100 mg/mL 的比例加入生理盐水，无菌条件下，37℃恒温浸提 72 h，各自取上清液于 4℃冰箱保存。

1.5 细胞毒性试验

取对数生长期的 L929 细胞，用细胞消化液(质量浓度为 2.5 g/L 的胰酶和 0.2 g/L 的乙二胺四乙酸 EDTA)消化分散细胞，用 DMEM 完全培养液制成浓度 6.0×10^4 个/mL 的细胞悬液，按 100 μL/孔接种于 96 孔培养板中，复种 6 孔，置入 37℃、5% CO_2、饱和湿度的培养箱中。边缘孔不接种细胞，只加入 100 μL/孔的 DMEM 培养液，起边缘封闭作用。在细胞接种 24 h 后，取出 96 孔板，吸去旧培养液。样本组分别加入 0.1、0.5、1.0、10.0 mg/mL 4 种浓度的材料(直接接触组加 DMEM 完全培养液混悬的微胶囊，浸提液组加微胶囊的浸提液)，空白组加入 DMEM 完全培养液，阳性对照组加入含苯酚的 DMEM 完全培养液(苯酚质量浓度为 64.0 g/L)，200 μL/孔。每 2 天更换培养液。于加样后 24、48、72、96 h 各取出一块 96 孔板，加入 5 mg/mL 的 MTT(20 μL/孔)，送回培养箱继续培养 4 h，吸除各孔旧液，加入二甲基亚砜(DMSO)(150 μL/孔)，于室温放置 15 min～20 min，酶标仪上振荡混匀 1 min，采用双波长法测定其吸光值(*OD* 值)，测试波长为 550 nm，参考波长为 670 nm。计算相对增殖率(Relative growth rate，RGR)及毒性分级。细胞相对增殖率计算公式为：*RGR*＝(样本组平均 *OD* 值/空白对照组平均 *OD* 值)×100%。细胞毒性分级标准为：*RGR*≥100%，0 级；75%～99%，1 级；50%～74%，2 级；25%～49%，3 级；1%～24%，4 级；0%，5 级。

1.6 急性全身毒性试验

取体重 20 g±3 g 的 SPF 级昆明种小鼠 20 只，随机分为试验组和阴性对照组，每组 10 只，其中雌雄各半。按 50 mL/kg 剂量标准，在无菌条件下将材料浸提液缓慢注入试验组小鼠尾静脉，阴性对照

组注入生理盐水。注入后即刻、4、24、48 及 72 h 观察记录各组小鼠的一般状态、毒性表现及死亡情况，记录 24、48、72 h 的体重变化。并在随后的 1 周内观察小鼠的毒性表现和死亡情况。

1.7　溶血试验

通过真空采血抗凝管抽取新鲜健康成人外周血 2.0 mL，EDTA2K 抗凝。取 1.6 mL 新鲜抗凝血加 2.0 mL 生理盐水稀释。取灭菌备用的海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊，用生理盐水制备成 0.1 及 0.2 g/mL的混悬液，取微胶囊混悬液和蒸馏水(阳性对照)、生理盐水(阴性对照)各 10 mL 于无菌带盖塑料离心管内，重复 3 份。将上述离心管于 37℃恒温水浴中保温 30 min，然后在每一个离心管内分别加入 0.2 mL 已制备好的稀释抗凝血，轻轻混匀，继续于 37℃恒温水浴中保温 60 min。750 g 离心 5 min，取上清液，于 545 nm 处测量吸光度值，取平均值。计算材料的溶血率，计算式为：溶血率＝(材料组吸光度－阴性组吸光度)/(阳性对照组吸光度－阴性组吸光度)×100%。

2　结果与讨论

2.1　海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊的形态及粒径分布

图 1(a)是微胶囊在水溶液中的光学照片，图 1(b)是微胶囊经过乙醇梯度洗脱-冷冻干燥后的扫描电镜照片。由图 1(a)可知，采用高压静电法可制备出球形度好、表面光洁、粒径均匀的海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊。微胶囊的干燥是微胶囊制备的重要内容，冷冻干燥是一种常用的干燥方法。以前的研究表明，海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊直接冷冻干燥后，其球形度变差，表面出现明显内陷[14]，而经过乙醇梯度洗脱-冷冻干燥后，大部分微胶囊能够保持较好的球形度，其表面也无明显内陷，见图 1(b)。这可能是由于冷冻干燥过程中水分快速升华引起了孔壁收缩、交联结构内陷，而经过乙醇梯度洗脱后，微胶囊所含水分较少，在冷冻干燥时，微胶囊表面的收缩程度较轻，因而能够保持较好的球形度。微胶囊干燥后的平均粒径为 131 μm，粒径主要分布于 90～160 μm，见图 2。

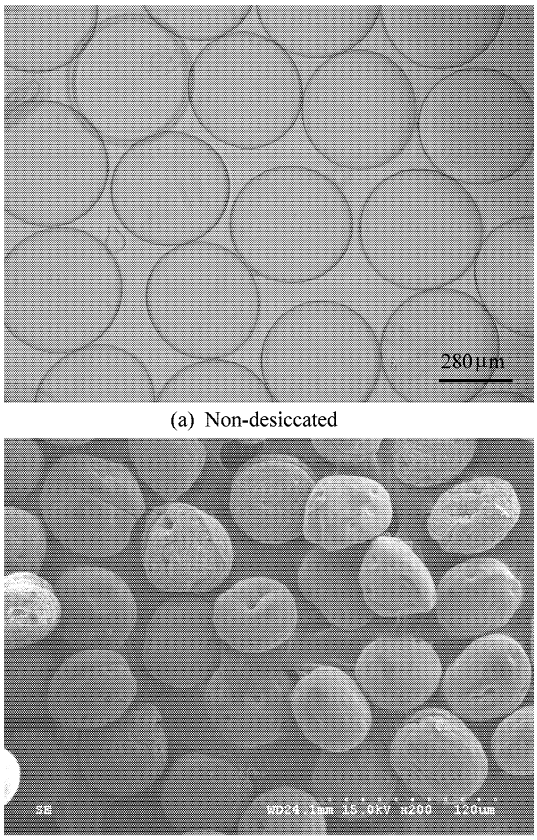


图 1　海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊干燥前后的表面形态

Fig. 1　Surface morphology of alginate/poly(L-arginine) microcapsules before and after desiccation

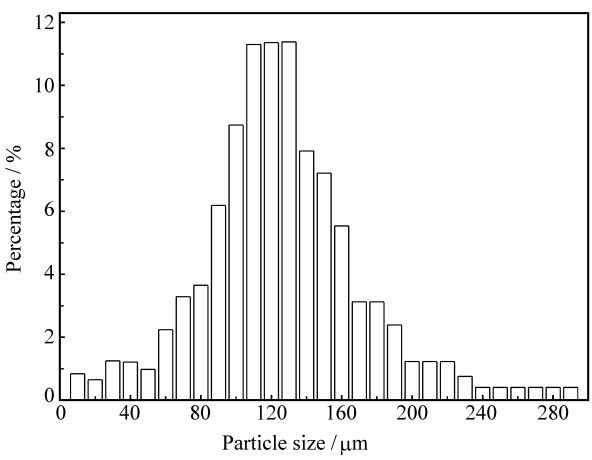


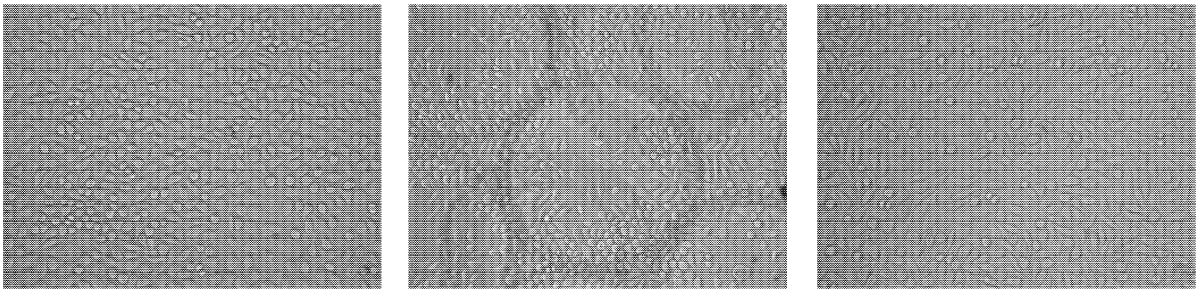
图 2　海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊干燥后的粒径分布

Fig. 2　Particle size distribution of the freeze-dried alginate/poly(L-arginine) microcapsules

2.2　细胞毒性试验

2.2.1　形态学观察

在细胞与微胶囊及其浸提液共培养的各时期，在倒置显微镜下观察细胞形态。结果表明：直接接触组、浸提液组、空白对照组中各孔细胞贴壁良好，折光性强，细胞形态基本相同，主要呈梭形或不规则形，在培养期间，各孔细胞数量不断增加(见图 3)；而阳性对照组中细胞圆缩，大部分脱落坏死，无增殖现象。



(a) Blank control (b) 1.0 mg / mL microcapsules (c) 10.0 mg / mL extract production

图 3 L929 细胞与海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊及其浸提物共培养 48 h 的光学照片

Fig. 3 Light micrographs of L929 cells co-cultured with alginate/poly(L-arginine) microcapsules and its extract production for 48 h

2.2.2 MTT 法试验结果

由表 1 可知，在微胶囊与细胞直接接触培养期间，随微胶囊浓度增加，L929 细胞的相对增殖率逐渐减小。其中当微胶囊浓度≤1.0 mg/mL 时，细胞相对增殖率基本上>75%，其毒性基本为 0 或 1 级；而当微胶囊浓度达到 10.0 mg/mL 时，细胞相对增殖率<46%，其毒性为 3 级。由表 2 可知，微胶囊浸提产物即使在 10.0 mg/mL 时，细胞相对增殖率仍>84%，其毒性为 0 或 1 级；而当其浓度≤1.0 mg/mL 时，细胞相对增殖率均≥100%，其毒性为 0 级。根据 GB/T 16175－1996 文件规定的细胞毒性为 0 或 1 级时反应为合格，为 2 级时应结合细胞形态分析综合评价。由形态学观察及 MTT 测定结果可看出，海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊≤

表 1 微胶囊与 L929 细胞直接接触培养后的吸光值及毒性等级($\bar{X}\pm S$, $n=6$)

Table 1 Absorbency value and toxicity grade of microcapsules directly contacted with of L929 cells ($\bar{X}\pm S$, $n=6$)

Group	24 h			48 h			72 h			96 h		
	OD	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade
BC	0.564±0.036	100.00	0	0.786±0.027	100.00	0	1.239±0.045	100.00	0	1.474±0.150	100.00	0
0.1 PM	0.584±0.050	103.55	0	0.770±0.043	97.96	1	1.186±0.134	95.72	1	1.422±0.153	96.47	1
0.5 PM	0.523±0.034	92.73	1	0.645±0.100	82.06	1	1.080±0.116	87.17	1	1.173±0.127	79.58	1
1.0 PM	0.442±0.058	78.37	1	0.613±0.074	77.99	1	0.939±0.043	75.79	1	1.047±0.148	71.03	2
10.0 PM	0.218±0.077	38.65	3	0.300±0.092	38.17	3	0.365±0.052	29.46	3	0.676±0.094	45.86	3
PC	0.013±0.005	2.30	4	0.018±0.007	2.29	4	0.032±0.011	2.58	4	0.031±0.023	2.10	4

Note: BC — Blank control; PC — Positive control; 0.1, 0.5, 1.0, 10.0 PM — 0.1, 0.5, 1.0, 10.0 mg/mL alginate/poly(L-arginine) microcapsules

表 2 微胶囊浸提液产物与 L929 细胞共培养后的吸光值及毒性等级($\bar{X}\pm S$, $n=6$)

Table 2 Absorbency value and toxicity grade of microcapsule extract productions co-cultured with of L929 cells ($\bar{X}\pm S$, $n=6$)

Group	24 h			48 h			72 h			96 h		
	OD	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade	*OD*	*RGR*/%	Grade
BC	0.680±0.060	100.00	0	1.187±0.010	100.00	0	1.638±0.074	100.00	0	1.649±0.108	100.00	0
0.1 PM	0.735±0.039	108.09	0	1.286±0.120	108.34	0	1.706±0.228	104.15	0	1.712±0.269	103.82	0
0.5 PM	0.753±0.042	110.74	0	1.317±0.048	110.95	0	1.646±0.155	100.49	0	1.704±0.138	103.34	0
1.0 PM	0.784±0.048	115.29	0	1.374±0.046	115.75	0	1.637±0.056	99.94	0	1.654±0.083	100.30	0
10.0 PM	0.737±0.040	108.38	0	1.104±0.064	93.01	1	1.391±0.120	84.92	1	1.440±0.059	87.33	1
PC	0.093±0.009	13.68	4	0.093±0.011	7.83	4	0.081±0.011	4.95	4	0.126±0.012	7.64	4

1.0 mg/mL时无细胞毒性，在 10.0 mg/mL 时对细胞增殖有较强的抑制作用；其浸提产物在 0.1～10.0 mg/mL 的浓度范围内无细胞毒性，而当其浓度≤1.0 mg/mL 时对细胞增殖有一定的促进作用。

Cheng[15]等在研究聚精氨酸(M_w：7500)、聚异丙基丙烯酰氨与聚精氨酸共聚物[poly(N-isopropylacrylamide)/poly (L - arginine) bioconjugate，PNIPArg]的体外细胞毒性时发现，当 2 种材料分别与非洲绿猴肾细胞(COS-1)共培养 48 h 后，聚精氨酸的细胞毒性随其浓度增加而增大。在 0.01 mg/mL时，细胞相对增殖率＞140%，而当其浓度为 0.5 mg/mL 时，细胞相对增殖率仅为 4%。聚精氨酸与聚异丙基丙烯酰氨聚合后，其细胞毒性降低。PNIPArg 在 0.05～5 mg/mL 的范围内，细胞的相对增殖率随微粒子浓度的增加而先增大后降低，其中在 2.5 mg/mL 时，细胞的相对增殖率达到最大值(为 140%)，在 5 mg/mL 时，细胞的相对增殖率仍高达 82%。Cheng 等认为这可能是因为聚精氨酸与中性的聚异丙基丙烯酰氨聚合后，其正电荷密度降低所致。

海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊是阳离子型聚精氨酸与阴离子型海藻酸钙微胶珠通过静电络合形成的核壳结构。在直接接触试验中，L929 细胞的相对增殖率随微胶囊浓度的增加而逐渐减小，材料对细胞增殖的抑制可能主要是微胶囊自身重力所产生的压力影响了细胞的活力[16]，以及微胶囊与培养板接触减少了细胞的有效生长面积，并阻碍了细胞的铺展。毕竟在培养各时相，细胞形态没有发生改变，而同样浓度的微胶囊浸提产物也没有表现出细胞毒性作用。de Groot 等在研究右旋糖苷(Dextran)等材料浸提产物细胞毒性时，发现并证实成纤维细胞内含有一些颗粒状物质，认为可能是细胞吞噬材料和/或死亡细胞的结果[17]。另外有研究表明，在营养液中添加适量精氨酸可促进细胞增殖并抑制其凋亡[8,18]。在 L929 细胞与海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊浸提产物共培养期间，观察到细胞中有较多颗粒物质，因此认为浸提产物对细胞生长的促进可能是由于 L929 细胞通过胞饮或吞噬作用摄取了一定量的聚精氨酸/精氨酸滤离物，当摄入的聚精氨酸/精氨酸较多时，细胞生长又受到一定的抑制。

结合 Cheng 等的研究，认为聚精氨酸在较低浓度时，有利于细胞的增殖，而当其浓度达到一定值后对细胞生长有抑制作用。

2.3　急性全身毒性试验

在注射后规定的 72 h 内，所有试验小鼠均无死亡，其活动、进食正常，未观察到任何异常的不良反应，试验组和对照组无明显差异。注射后 72 h 内，除试验组 2 只雌鼠在第 24 h 体重出现轻微下降外(降幅≤0.4 g)，其他小鼠的体重均平稳上升，各组小鼠在各时间点的体重变化结果见表 3。根据小鼠注射后的行为表现及体重变化结果可知，海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊不引起急性全身毒性反应，无有毒的沥滤物和降解产物[19]。

表 3　小鼠平均体重的变化(n=10)

Table 3　The change of mice middleweight (n=10)

Group	Mice middleweight/g			
	0 h	24 h	48 h	72 h
PM	21.38	21.95	23.92	26.07
Negative control	16.30	18.10	19.10	21.90

Note：PM — Alginate/poly(L-arginine) microcapsules

2.4　溶血试验

溶血试验是通过材料与血液直接接触，测定红细胞释放的血红蛋白量以检测材料的体外溶血程度。由于该试验能敏感地反应试样对红细胞的影响，溶血试验除了作为血液相容性评价的一个试验外，还被认为是一个很好的材料粗筛试验。海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊是非实心的球形水凝胶，干燥后质轻，不适宜直接称重取样，因此按标准推荐的不规则材料的浸提比例(0.1～0.2 g/mL)量取材料[19]。由表 4 可知，海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊的溶血率远小于 5%，表明海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊基本不引起溶血反应，符合医用材料的溶血试验要求。

表 4　溶血试验结果

Table 4　Results of hemolysis test

Group	Absorbency value/($g\cdot mL^{-1}$)				Hemolysis rate/%
	1	2	3	mean	
0.1 g/mL PM	0.009	0.009	0.010	0.009	0.09
0.2 g/mL PM	0.013	0.012	0.013	0.013	0.47
Negative control	0.008	0.008	0.007	0.008	—
Positive control	1.071	1.065	1.094	1.077	—

3 结 论

（1）以海藻酸盐、聚精氨酸为壁材，采用高压静电法制备了球形度好、表面光洁、粒径均匀的海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊，经乙醇梯度洗脱-冷冻干燥后，微胶囊能够保持较好的形态。

（2）海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊在 0.1、0.5 及 1.0 mg/mL 时，微胶囊无细胞毒性；微胶囊浸提产物在 10.0 mg/mL 时仍无细胞毒性。

（3）海藻酸钙/聚精氨酸微胶囊不引起急性全身毒性反应，无溶血反应。

参考文献：

[1] Wang S B, Xu F H, He H S, et al. Novel alginate-poly(L-histidine) microcapsules as drug carriers: In vitro protein release and short term stability [J]. Macromolecular Bioscience, 2005, 5(5): 408-414.

[2] Mohamed F, van der Walle C F. PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2006, 311(1/2): 97-107.

[3] Ding H F, Liu R, Li B G, et al. Biologic effect and immunoisolating behavior of BMP-2 gene-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells in APA microcapsules [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 362(4): 923-927.

[4] Wang X Q, Wenk E, Hu X, et al. Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery [J]. Biomaterials, 2007, 28(28): 4161-4169.

[5] 沈一丁，赖小娟，王 磊. 聚乳酸/乙基纤维素复合膜的制备及其性能 [J]. 复合材料学报，2007，24(3)：40-44.
Shen Yiding, Lai Xiaojuan, Wang Lei. Preparation and properties of poly(lactic acid)/ethyl cellulose composite films [J]. Acta Materiae Compositae Sinica, 2007, 24(3): 40-44.

[6] Mitchell D J, Kim D T, Steinman L, et al. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers [J]. Journal of Peptide Research, 2000, 56(5): 318-325.

[7] Ohtake K, Maeno T, Ueda H, et al. Poly-L-arginine predominantly increases the paracellular permeability of hydrophilic macromolecules across rabbit nasal epithelium in vitro [J]. Pharmaceutical Research, 2003, 20(2): 153-160.

[8] 刘怡晟，鲍倩玲，张伟利. 精氨酸强化全肠外营养对小肠上皮细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 肠外与肠内营养，2007，14(1)：6-9.
Liu Yisheng, Bao Qianling, Zhang Weili. Effects of arginine-enriched TPN on proliferation and apoptosis of intestinal epithelial cells [J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2007, 14(1): 6-9.

[9] Lingnau K, Egyed A, Schellack C, et al. Poly-L-arginine synergizes with oligodeoxynucleotides containing CpG-motifs (CpG-ODN) for enhanced and prolonged immune responses and prevents the CpG-ODN-induced systemic release of pro-inflammatory cytokines [J]. Vaccine, 2002, 20(29/30): 3498-3508.

[10] Shi H P, Wang S M, Zhang G X, et al. Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock [J]. Wound Repair and Regeneration, 2007, 15(1): 66-70.

[11] Neto H S, Vomero V U, Marques M J. L-arginine enhances muscle regeneration after experimental envenomation by B. jararacussu: A future for nitric oxide-based therapy? [J]. Toxicon, 2006, 48(3): 353-357.

[12] Wang S B, Liu Y G, Weng L J, et al. Effect of the molecular weights of poly-L-arginine on membrane strength and permeability of poly-L-arginine group microcapsules [J]. Macromolecular Bioscience, 2003, 3(7): 347-350.

[13] Wang S B, Chen A Z, Weng L J, et al. Effect of drug-loading methods on drug load, encapsulation efficiency and release properties of alginate/poly-L-arginine/chitosan ternary complex microcapsules [J]. Macromolecular Bioscience, 2004, 4(1): 21-30.

[14] 王 莹，刘 伟，王士斌，等. 海藻酸钙微胶珠的载药性能优化 [J]. 生物医学工程研究，2007，26(3)：271-274.
Wang Ying, Liu Wei, Wang Shibin, et al. Optimize conditions of preparation calcium alginate micro beads [J]. Journal of Biomedical Engineering Research, 2007, 26(3): 271-274.

[15] Cheng N, Liu W G, Cao Z Q, et al. A study of thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)/polyarginine bioconjugate non-viral transgene vectors [J]. Biomaterials, 2006, 27(28): 4984-4992.

[16] Chellag F, Tabrizian M, Dumitriu S, et al. In vitro and in vivo biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(1): 107-116.

[17] de groot C J, van Luyn M J A, van Dijk-Wolthuis W N E, et al. In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts [J]. Biomaterials, 2001, 22(11): 1197-1203.

[18] Sukhotnik I, Helou H, Mogilner J, et al. Oral arginine improves intestinal recovery following ischemia-reperfusion injury in rat [J]. Pediatric Surgery International, 2005, 21(3): 191-196.

[19] 国家技术监督局. GB/T 16175－1996 医用有机硅材料生物学评价试验方法[S]. 北京：中国标准出版社，2003.