

## 促卵泡激素和干细胞因子缓释微球的制备

程波<sup>1,2)</sup>, 陈云建<sup>3)</sup>, 邱学德<sup>1)</sup>, 普俊学<sup>2)</sup>, 刘仲伟<sup>4)</sup>, 孟昱时<sup>4)</sup>, 李志鹏<sup>1)</sup>, 曹贵华<sup>1)</sup>

(1) 昆明医科大学第二附属医院泌尿外科二病区 云南昆明 650101; 2) 滕州市中心人民医院 泌尿外科 山东滕州 277500; 3) 昆明制药集团股份有限公司药物研究院, 云南昆明 650100; 4) 昆明医科大学第二附属医院生殖医学科, 云南昆明 650101)

**[摘要]** **目的** 以乳酸-羟乙酸聚合物为载体材料, 制备包含促卵泡激素和干细胞因子的长效缓释微球, 并考察微球质量相关参数, 探讨影响微球粒径和包封率的因素. **方法** 使用复乳-溶剂挥发法制备微球, 观察微球形态, 计算微球粒径、回收率、包封率和载药量等相关参数. 用不同分子量和浓度的乳酸-羟乙酸聚合物制备微球, 观察微球粒径及包封率的变化. **结果** 所得微球形态呈圆整规则的球形, 粒径呈正态分布, 主要分布在 6~12  $\mu\text{m}$  范围内, 再分散性好, 促卵泡激素的包封率为 85.5%, 载药量为 33.7 mIU/mg. 干细胞因子的包封率为 87.1%, 载药量为 4.6 ng/mg. PLGA 分子量增加, 微球粒径增加, PLGA 浓度升高, 微球粒径及包封率也升高. **结论** 复乳-溶剂挥发法工艺简单, 重现性好. 所制促卵泡激素和干细胞因子微球粒径均匀, 包封率高.

**[关键词]** 促卵泡激素; 干细胞因子; 乳酸-羟乙酸共聚物

**[中图分类号]** R318.08 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 01-0019-05

## Preparation of Sustained Release FSH and SCF Microspheres

CHENG Bo<sup>1, 2)</sup>, CHEN Yun-jian<sup>3)</sup>, QIU Xue-de<sup>1)</sup>, PU Jun-xue<sup>3)</sup>, LIU Zhong-wei<sup>4)</sup>, MENG Yu-shi<sup>4)</sup>, LI Zhi-peng<sup>1)</sup>, CAO Gui-hua<sup>1)</sup>

(1) Dept. of Urology, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Urology, The Central Hospital of Tengzhou, Tengzhou Shandong 277500; 3) Institute for Drug Research and Development of Kunming Pharmaceutical Corporation, Kunming Yunnan 650100; 4) Dept. of Reproduction, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101, China)

**[Abstract]** **Objective** This study was aimed to prepare poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres containing follicle stimulating hormone (FSH) or stem cell factor (SCF), investigate its quality parameters, and study the influence factors of microsphere size and encapsulation efficiency. **Methods** FSH and SCF microspheres were prepared by a double emulsion-solvent evaporation method. Scanning electron microscopy was used for the observation of microspheres. The quality parameters such as particle size, recovery, encapsulation efficiency and drug loading were calculated. The microspheres were prepared with different molecular weight and concentration of PLGA, and the changes about particle size and encapsulation efficiency were observed. **Results** The microspheres of FSH and SCF showed regular spherical. Diameter of the particles with 6  $\mu\text{m}$  to 12  $\mu\text{m}$  mainly showed a normal distribution. The rate of encapsulation and quantity of drug loading of FSH were 85.5% and 33.7 mIU/mg, and of SCF were 87.1% and 4.6 ng/mg. The particle diameter and encapsulation efficiency of microspheres were increased when increasing molecular weight and concentration of PLGA. **Conclusion** This technique of double emulsion-solvent evaporation process was simple and had a good reproducibility, and it might get uniform particle size and high encapsulation efficiency of FSH and SCF microspheres.

**[Key words]** Follicle stimulating hormone; Stem cell factor; Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30760250) .

**[作者简介]** 程波 (1983~), 男, 山东滕州市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事泌尿外科的诊疗工作.

**[通讯作者]** 邱学德. E-mail: scottqiuen@126.com

促卵泡激素 (follicle stimulating hormone, FSH) 和干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 均与人类睾丸的生精功能有关, 其中 FSH 可以刺激精子和卵细胞的形成, 通过改善精子和卵子超微结构和线粒体功能, 以及通过促进 DNA 的聚合提高精子质量与浓度<sup>[1]</sup>, SCF 可促进 A 型精原细胞 DNA 的合成<sup>[2]</sup>, 在原始生殖细胞和精原细胞的粘附, 迁移, 增殖和存活中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>. 然而, FSH 和 SCF 均属多肽类药物, 其半衰期短需, 需频繁给药来维持有效治疗浓度, 导致治疗周期长, 注射次数多, 给治疗带来不便.

可生物降解的缓释微球用药一次就可获得长达数周的缓释效果和较高的生物利用度, 大大提高患者的顺应性, 因此是多肽和蛋白质类药物比较理想的给药系统<sup>[4]</sup>. 笔者拟用 PLGA 为载体, 采用复乳-溶剂挥发法制备 FSH 和 SCF 缓释微球, 并对微球粒径、表面形态、产率、载药量和包封率等特性作初步测评, 为进一步考察 FSH 和 SCF 微球对无精症模型生精功能的影响建立基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

FSH、SCF、聚乳酸-羟乙酸 (Poly lactic-co-glycolic acid, PLGA) 均为 Sigma-Aldric 产品, 乳化分散机 (10 000  $\mu\text{rpm}$  IKA-Werk, 德国), 电动搅拌机 (IKA, 德国), 倒置显微镜 (Olympus 公司日本), 真空冷冻干燥机 (上海东富龙科技股份有限公司), ACCESS 全自动微粒子化学发光免疫分析系统及其配套试剂盒 (BECKMAN 公司, 美国), ELISA 测定仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司 RT21000C 酶标仪, 中国), 扫描电镜 (日立 X-650, 日本).

### 1.2 FSH、SCF 微球的制备方法

以 PLGA 为载体, 采用复乳-液中干燥法制备 FSH 和 SCF 缓释微球: 取 10  $\mu\text{g}$  FSH (SCF)、20 mg BEG, 加入蒸馏水配制内水相 ( $W_1$ ), PLGA 溶于  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  充分溶解, 配成 25% 的油相 (O)、称取

PVA1.0 g, 加注射用水溶解并定溶至 100 mL, 浓度为 1% 配制外水相 ( $W_2$ ), 用滤纸过滤后放置于 4 $^\circ\text{C}$ .

用加样枪将  $W_1$  滴入 O 中, 冰浴条件下, 乳化分散机 5 000 r/min 搅拌约 30 s, 形成初乳 ( $W_1/O$ ); 将初乳倒入  $W_2$  中, 冰浴条件下, 4 000 ~ 6 000 r/min 搅拌 3 ~ 4 min, 形成复乳 ( $W_1/O/W_2$ ); 电动搅拌机 1 000 r/min, 冰浴下搅拌 2 ~ 3 h, 挥发  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; 待有机溶媒挥尽, 2 000 r/min 离心, 上清液收集保存, 取沉淀. 蒸馏水洗涤 3 遍, 再次离心收集, 真空冷冻干燥, 60  $^\circ\text{C}$  辐照灭菌, -20  $^\circ\text{C}$  保存备用.

**1.2.1 不同分子量的 PLGA** 根据上述制作微球方法, 在其他条件不变的情况下选择不同分子量的 PLGA 制作微球, 考察其粒径及包封率, 见表 1.

**1.2.2 不同浓度的 PLGA** 在其他条件不变的情况下通过改变 PLGA 的浓度, 评价微球粒径及包封率, 见表 2.

### 1.3 微球形态观察及粒径分布

取已冻干的 PLGA 微球少许, 用 0.02% 吐温 80 的生理盐水分散, 光学显微镜下于 40 $\times$ 10 倍放大倍数下观察微球形态并用测微尺测定 500 个微球的粒径, 每隔 3  $\mu\text{m}$  粒径为一单元, 分别计数每一单元的微球数. 以微球个数的百分数为纵坐标 (%), 粒径大小为横坐标 ( $\mu\text{m}$ ), 绘制微球粒径分布的直方图. 随机观察 100 个微球, 根据其中圆形完整的微球占总数的百分数评价成球水平.

将冻干后的微球样品通过双面胶固定在铝质圆台上喷金, 采用电子扫描显微镜 (SEM) 观察微球表面以及内部的外观形貌和分散性、计算微球的平均粒径及其分布.

### 1.4 微球回收率、载药量、包封率质量评价

**1.4.1 微球回收率的测定** 收集冷冻干燥后的所有微球, 在精密电子天平上称重后除以总的投料量计算回收率, 评价微球制备工艺配方的优劣.

**1.4.2 微球载药量、包封率的测定** 载药量及包封率公式为:

$$\text{载药量} = \frac{\text{总投量与损失药量之差即微球中实际含药量}}{\text{所得微球质量}} \times 100\%$$

$$\text{包封率} = \frac{\text{总投量与损失药量之差}}{\text{总投药量}} \times 100\%$$

### 1.5 微球中实际药物含量测定

将载药微球完全溶解于有机溶剂中, 再采用缓冲溶液萃取, 测定溶液中的药物浓度. 差减法是在制备过程中待有机溶剂挥发完全后, 测定其药物浓

度. FSH 采用化学发光法、SCF 采用酶联免疫吸附法.

**1.5.1 ELISA 检测法测定 SCF 浓度** 对于 SCF 的检测目前比较精确的方法为双抗体夹心 ELISA 测

试法: 利用抗鼠 SCF 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的 SCF 与单抗结合, 加入生物素化的抗鼠 SCF 抗体 (二抗), 它将与结合在单抗上的鼠 SCF 结合而形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的亲合素与二抗的生物素结合, 加入底物溶液 (TMB) 显色. 用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度 (OD) 值, SCF 浓度与 OD 值成正比, 以标准物的浓度为横坐标 (对数坐标), OD 值为纵坐标 (普通坐标), 绘出标准曲线并得出标准方程, 可通过标准曲线求出样品中 SCF 浓度.

**1.5.2 ACCESS 检测法测定 hFSH 浓度** Access hFSH 测定是一种连续两步酶免法测定. 将样本添加到含包被着山羊抗小鼠 - 小鼠抗 hFSH 复合物的顺磁性微粒和含蛋白质的 TRIS 缓冲盐水的反应管中. hFSH 与固相上静置的 hFSH 结合. 结合在固相上的物质将置于一个磁场内被吸住, 而未结合的物质被冲洗除去. 然后碱性磷酸酶山羊抗 hFSH 结合物被添加进来并和先前结合在微粒上的 hFSH 结合. 再度分离和冲洗掉未结合的物质. 然后将化学发光底物 Lumi-Phos530 添加到反应管内, 再由照度计对反应中所产生的光进行测量. 所产生光的量与样本内 hFSH 的浓度成正比. 样本内分析物的量由所储存的多点校准曲线来确定.

## 1.6 统计学处理

所有数据用平均数和标准差  $\bar{x} \pm s$  表示.

## 2 结果

### 2.1 微球的大小、形态及粒径分布

肉眼观察制备的微球呈白色粉末状. 电镜下见微球表面光滑, 分散好, 彼此间无粘连 (图 1).

FSH 和 SCF 粒径大小及分布见表 3、表 4. 由微球粒径分布直方图图形可以看出微球粒径分布基本符合正态分布 (图 2、图 3). 通过计算得微球平均粒径 FSH 为  $(8.6 \pm 0.5) \mu\text{m}$ , SCF 为  $(9.1 \pm 0.7) \mu\text{m}$ . 光镜下随机观察 100 个微球, 其中圆形完整的微球为 92 个, 由此得出成球率达 92%.

### 2.2 PLGA 平均分子量对微球粒径的影响

不同分子量的 PLGA 的实验结果表明, 随着 PLGA 分子量的增加, 微球粒径也增加, 见图 4.

### 2.3 不同 PLGA 浓度对微球粒径的影响

不同 PLGA 浓度对微球粒径影响的测定结果表明 PLGA 的浓度越大, 微球的平均粒径也越大, 见图 5.

### 2.4 FSH 化学发光法标准曲线

用含 0 IU/L、1.0 IU/L、10 IU/L、50 IU/L、100 IU/L、200 IU/L 的标准液上机测定, 绘制标准曲线.

### 2.5 SCF 酶联免疫法标准曲线

分别取 0  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$ 、2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、10.0  $\mu\text{g/mL}$ 、25  $\mu\text{g/mL}$  标准品, 根据实验步骤计算出每个标准品的 OD 值, 绘制标准曲线. 线性回归后得标准曲线回归方程:

$Y = -0.001821X^2 + 0.09712X + 0.062851$  相关系数  $r = 0.9965$ , 结果表明 SCF 浓度在 0 ~ 25  $\mu\text{g/mL}$  范围内线性良好. 微球的回收率、载药量、包封率 (表 5).

### 2.6 PLGA 浓度对微球包封率的影响

PLGA 的浓度对包封率有较大影响, 随着 PLGA 浓度的增加, 微球的包封率也有所增加, 见图 6.

表 1 不同分子量的 PGLA 选择

Tab. 1 PGLA with different molecular weights

转速	PVA 浓度 (%)	PLGA 浓度 (%)	油 / 水	PLGA 分子量
5 000	1	25	16	8 000
5 000	1	25	16	14 000
5 000	1	25	16	25 000

表 2 不同浓度的 PLGA 选择

Tab. 2 PGLA with different concentrations

转速	PVA 浓度 (%)	PLGA 分子量	油 / 水	PLGA 浓度 (%)
5 000	1	8 000	16	10
5 000	1	14 000	16	25
5 000	1	25 000	16	33

表 3 FSH 微球的大小及分布 (μm)

Tab. 3 The size and distribution of FSH microspheres (μm)

粒径分布 (μm)	0~3	3~6	6~9	9~12	12~15	>15
微球数量 (个)	34	113	187	127	26	13
微球百分数 (%)	6.8	22.6	37.4	25.4	5.2	2.6

表 4 SCF 微球的大小及分布

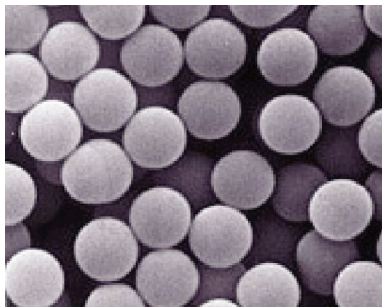
Tab. 4 The size and distribution of SCF microspheres

粒径分布 (μm)	0~3	3~6	6~9	9~12	12~15	>15
微球数量 (个)	28	12	175	130	31	16
微球百分数 (%)	5.6	2.4	35	26	6.2	3.2

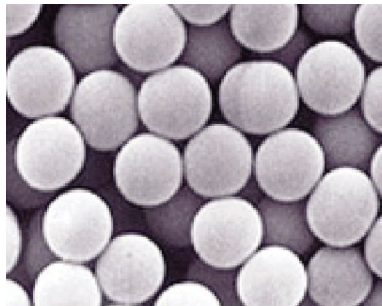
表 5 微球的回收率、载药量、封装率

Tab. 5 The recovery rate, loading capacity and encapsulation efficiency of microspheres

种类	回收率 (%)	载药量	封装率 (%)
FSH 微球	59.6	33.7 mIU/mg	85.5
SCF 微球	63.58	3.2 ng/mg	87.1



A



B

图 1 扫描电镜下 FSH 和 SCF 微球 (WD15.3, 10.0 kV, ×1.5 k, 10 μm)

Fig. 1 The FSH and SCF microspheres observed by SEM

A:FSH 微球; B:SCF 微球.

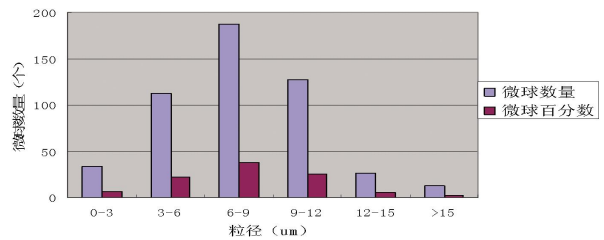


图 2 FSH 微球平均粒径为 (8.6 ± 1.1) μm, 集中分布在 6~9 μm, 分布呈正态分布

Fig. 2 Mean size of FSH microspheres was 8.6 ± 1.1 μm, which concentrated in the 6-9 micron with the normal distribution

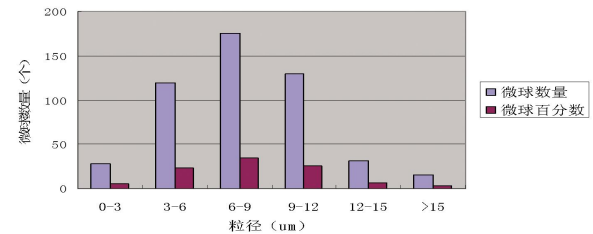


图 3 SCF 微球平均粒径为 (9.1 ± 1.3) μm, 集中分布在 6~9 μm, 分布呈正态分布

Fig. 3 Mean size of SCF microspheres was (9.1 ± 1.3) μm, which concentrated in the 6-9 micron with the normal distribution

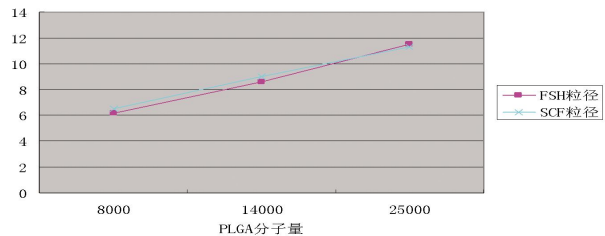


图 4 不同 PLGA 平均分子量和微球粒径之间的关系

Fig. 4 The relationship between average molecular weight of PLGA and the particle size of microspheres

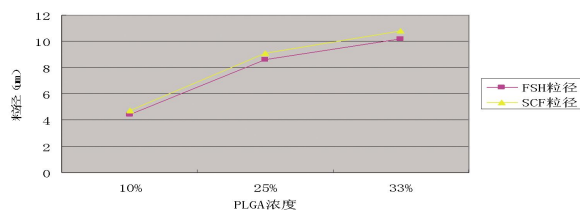


图 5 不同 PLGA 浓度和微球粒径之间的关系

Fig. 5 The relationship between the concentration of PLGA and the particle size of the microspheres

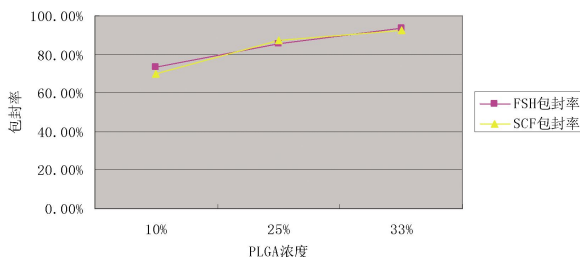


图 6 不同 PLGA 浓度和微球包封率的关系

Fig. 6 The relationship between the concentration of PLGA and encapsulation efficiency of microspheres

### 3 讨论

在生物可降解聚合物中, 聚乳酸 (PLA) 和乳酸 / 羟基乙酸共聚物 (PLGA) 由于其无毒且能在体内缓慢降解的特性而得到广泛的应用, 并且是已经被美国 FDA 批准为可用于人体的载体材料<sup>[5]</sup>。蛋白多肽类药物缓释微球制备方法有很多种, 其中复乳-溶剂蒸发法设备简单、工艺稳定, 能获得较高的药物包封率, 尤其适合于水溶性物质如多肽及蛋白类药物的制备, 因而是目前此类微球最常用的制备方法<sup>[6]</sup>。

本研究在其他条件相同的情况下, 用 3 种不同分子量的 PLGA 制作 3 批微球, 结果显示随着分子量的增加, 微球粒径也增加。PLGA 浓度对微球的粒径及包封率影响显著, 提高聚合物浓度可以提高微球的包封率。其原因可以归结于两点: (1) 聚合物在分散相表面固化速度的加快阻止了药物的扩散; (2) 高浓度的聚合物增加了分散相的粘度, 增加了药物从聚合物中扩散出来的阻力<sup>[7]</sup>。Zhang 等<sup>[8]</sup>制备的牛血清蛋白 (BSA) 微球, 当聚合物浓度从 2% 上升到 8% 的时候, 包封率从 66.5% 上升到 91.2%。Shenderova 等<sup>[9]</sup>研究认为聚合物在载体溶液中的浓度降低, 包封率也随之降低。另外随着 PLGA 浓度升高, 微球粒径也增加。原因可能是 PLGA 浓度的升高导致其溶液黏度增大, 在相同条件下制备较小粒径微球所需的剪切力较大。杜丽娜<sup>[10]</sup>制备 BSA-PLGA 微球, PLGA 浓度分别为 400

mg/mL, 500 mg/mL, 650 mg/mL, 分析其浓度对微球粒径的影响, 随着 PLGA 浓度的升高, 微球粒径升高。本研究 PLGA 浓度分别为 10%, 25% 和 30% 时 FSH 和 SCF 微球粒径及包封率都相应升高, 与文献报道基本符合。

本研究通过对 PLGA 浓度、外水相 PVA 浓度、制复乳时的搅拌速度、内水相的体积、PLGA 浓度、平均分子量等因素的调节, 最终确定了制备 FSH 和 SCF 微球处方: 内水相体积为 0.5 mL、PEG 用量为 20 mg、油相 PLGA 浓度为 250 mg/mL、外水相 PVA 浓度为 1%、复乳搅拌速率为 5 000 r/min, 在此条件下可以制得包封率较高、粒径适宜的微球, 且经过重复性实验验证后, 证明该批微球具有形态良好, 粒径分布均匀, 可重复性好等优点。

### [参考文献]

- [1] BACCETTI B, PIOM BONI P, BRUNI E, et al. Effect of follicle stimulating hormone on sperm quality and pregnancy rate [J]. *Asian J Androl*, 2004, 6 (2): 133 - 137.
- [2] ROSSI P, SETTE C, DOLCI S, et al. Role of ckit in mammalian spermatogenesis [J]. *J Endocrinol Invest*, 2000, 23 (9): 609 - 615.
- [3] YAN W, SUOMINEN J, TOPPARI J. Stem cell factor protects germ cells from apoptosis in vitro [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113 (1): 161 - 168.
- [4] 陈庆华, 瞿文. 多肽、蛋白质类药物缓释剂型的研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2000, 35 (3): 147 - 150.
- [5] BOISDRON C M, MENEI P, BENOIT J P, et al. Preparation and characterization of 5-fluorouracil-loaded microparticles as a biodegradable anticancer drug carriers [J]. *J Pharmacy and Pharmacology*, 1995, 47 (2): 108 - 114.
- [6] 华苏, 许向阳, 周建平. 复乳法制备蛋白质药物 PLGA 微球的影响因素 [J]. *药学进展*, 2009, 33 (10): 45.
- [7] CHO M, SAH H. Formulation and process parameters affecting protein encapsulation into PLGA microspheres during ethyl acetate-based microencapsulation process [J]. *J Microencapsul*, 2005, 22 (1): 1 - 12.
- [8] ZHANG J X, ZHU K J, CHEN D. Preparation of bovine serum albumin loaded poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) microspheres by a modified phase separation technique [J]. *J Microencapsul*, 2005, 22 (2): 117 - 126.
- [9] SHENDEROVA A, BURKE T G, SCHWENDEMAN S P. Stabilization of 10-hydroxycamptothecin in poly (lactide-co-glycolide) microsphere delivery vehicles [J]. *Pharm Res*, 1997, 14 (10): 1 406 - 1 414.
- [10] 杜丽娜, 郭庆东, 刘燕, 等. 牛血清白蛋白-PLGA 微球制备的单因素考察 [J]. *制剂技术*, 2005, 14 (5): 49 - 50.

(2014-12-17 收稿)