粒细胞集落刺激因子缓释微球的研制

张宇桐，朱　琳，吴　飞，金　拓*
（上海交通大学药学院，上海 200240）

摘要：粒细胞集落刺激因子（**1**）半衰期短、易水解，临床应用时需多次注射，患者顺应性差。本研究分别通过高分子双水相乳液和双水相冷冻相分离法制备 **1**- 葡聚糖（DEX）颗粒预制剂，再通过 S/O/W 型乳化法制备多糖颗粒复合聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PLGA）缓释微球，以提高 **1** 稳定性。结果显示，制备的 2 种 **1**-DEX-PLGA 缓释微球均粒度分布均一，包封率 >70%，且能实现 40 d 内连续缓慢释放，最终释放量为 75%～ 80%，并可使小鼠髓性白血病淋巴细胞株（NSF-60 细胞）的增殖活性保持在 85%以上。该研究表明，2 种方法制备的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球均可有效保护 **1** 活性，实现 4 周以上的平稳缓释，为制备蛋白缓释微球制剂提供了数据参考。

关键词：粒细胞集落刺激因子；双水相乳液；冷冻相分离；缓释；微球；蛋白活性
中图分类号：R944.9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)02-0216-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.02.009

Preparation of Sustained-release Microspheres Loaded with Granulocyte Colony-stimulating Factor

ZHANG Yutong, ZHU Lin, WU Fei, JIN Tuo*
(*School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240*)

ABSTRACT: Granulocyte colony-stimulating factor(**1**) has a short half-life and is easily hydrolyzed by enzymes, so that it usually requires multiple injections in clinical application, and shows poor patient compliance. In this study, prefabricated polysaccharide particles, **1**-dextran(DEX), were respectively prepared by the double aqueous emulsion and double aqueous lyophilization-induced phase separation methods, and then were loaded by poly(lactic-*co*-glycolic acid)(PLGA) microspheres through the S/O/W emulsion method to improve the stability of **1**. The results showed that both two kinds of PLGA microspheres loaded with **1**-DEX had homogenous particle size distribution, high encapsulation efficiency(>70%), 75%－80% of total drug sustained-release in 40 days, and more than 85% of proliferative activity of mouse myeloid leukemia lymphocyte cell lines(NSF-60 cells). The PLGA microspheres loaded with **1**-DEX by the two methods could improve the stability of **1** and realize sustained-release for over four weeks, providing a reference for preparing sustained-release microspheres loaded with protein drugs.

Key Words: granulocyte colony-stimulating factor; double aqueous emulsion; lyophilization-induced phase separation; sustained-release; microsphere; protein bioactivity

粒细胞集落刺激因子（granulocyte colony-stimulating factor，G-CSF，**1**）主要用于治疗化疗引起的中性粒细胞减少。随着研究的深入，**1** 已广泛应用于临床，适应证包括先天性中性粒细胞减少症、各种肿瘤放化疗和骨髓移植后的造血功能恢复、外周血干细胞动员等[1—2]。**1** 主要通过肾脏清除，体内半衰期短，平均仅为 3.5 h，且易被酶水解，需要频繁给药才能达到相应的疗效，不仅患者顺应性差，而且重复注射也易增加注射部位感染率[3]。

将蛋白药物包封进可注射的聚合物微球制剂

收稿日期：2022-07-08
基金项目：国家自然科学基金项目(81872802)
作者简介：张宇桐(1998—)，男，硕士研究生，专业方向：蛋白和多肽药物长效缓释制剂。
通信作者：金　拓(1952—)，男，教授，博士，从事生物大分子递药系统的研究。
E-mail：tjin@sjtu.edu.cn

中，理论上可实现长达 1 个月至数月之久的相对恒定释放，从而实现缓释，降低注射频率。但因为蛋白质与小分子类药物不同，具有三级结构，在涉及水 - 油或水 - 空气界面张力的微囊化过程中容易变性或聚集，因而目前市场上的蛋白缓释微球制剂产品甚少[4—6]。常用的微球制备工艺，如乳化 - 溶剂挥发法和喷雾干燥法等，其制备过程存在多种破坏蛋白质分子高级结构的因素，如油 - 水界面张力、液体 - 空气界面张力、有机试剂和高温等。在利用乳化 - 溶剂挥发法制备产品过程中，蛋白药物可能变性、失活，且复杂的乳化工艺也不适于工业化生产[7]。此外，利用该方法制备多肽类微球存在药物（尤其是高水溶性药物）包封率（encapsulation efficiency，EE）低的问题[8]。

针对以上问题，研究者们提出了多种策略。葡聚糖（dextran，DEX）能和聚乙二醇（PEG）形成双水相体系，以二者为分散相和连续相，产生的界面张力低于传统乳液中的油 - 水界面张力，可降低蛋白质分子在界面去折叠而失活的概率，对蛋白质结构的影响较小[9]。并且，当体系快速降温时，水溶性蛋白在 DEX 和 PEG 的水溶液中优先分散在 DEX 中，因此可采用冷冻相分离的方法制备蛋白 -DEX 颗粒[10]，即首先采用冷冻干燥法去除水，然后用二氯甲烷洗涤除去连续相 PEG。此过程中 DEX 颗粒可有效防止有机溶剂二氯甲烷向内渗透以保护蛋白。此外，可采用双水相乳液法制备蛋白 -DEX 颗粒。高分子双水相乳液需要在较高浓度（室温下自发形成相分离时的浓度）条件下制备，通过添加海藻酸钠（sodium alginate，Alg）在双水相乳液表面引入扩散双电层，可使 DEX 和 PEG 溶液形成稳定的双水相乳液微滴[11]。

本研究分别通过双水相乳液和双水相冷冻相分离 2 种方法制备 **1**-DEX 颗粒预制剂，再采用水包油包固（S/O/W）型乳化法将含 **1**-DEX 微粒载于聚乳酸 - 羟基乙酸共聚物（PLGA）缓释微球中，制备了能以蛋白天然形态缓释 4 周以上的微球制剂，制备流程如图 1 所示。随后考察了制得微球的理化性质和体外释放，并在后续采用了噻唑蓝（MTT）比色法和酶联免疫吸附测定（ELISA）法考察了不同处方和制备方法所得的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球在制备和体外释放过程中 **1** 的活性，为制备蛋白缓释微球制剂提供了数据参考。

1 仪器与试药

Reference 2 型微量移液器（德国 Eppendorf 公司）；BS110S 型电子天平（德国 Sartorius 公司）；F6/10 型分散乳化机（上海弗鲁克流体机械制造有限公司）；CX41 型光学显微镜（日本 Olympus 公司）；Alpha 1-4 型真空冷冻干燥机（德国 Christ 公司）；TGL-16C 型高速离心机（上海安亭科学仪器厂）；A10 型超纯水仪器（美国 Millipore 公司）；MK3 型酶标仪（芬兰 Labsystem 公司）；Sirion 200 型场发射扫描电镜（SEM，美国 FEI 公司）；S3500 型激光粒度仪（美国 Microtrac 公司）；ZS-90 型马尔文纳米粒度仪（英国马尔文帕纳科公司）；LC-20A 型液相色谱仪（日本岛津公司）。

1（长春金赛药业有限责任公司，批号 2015070905，纯度 99.5%）；MicroBCA 蛋白浓度测定试剂盒（美国 Pierce 公司）；PLGA（美国 LakeShore 公司，型号 5050 2A 和 5050 3A，相对分子质量为 14 000 和 47 000）；ELISA 试剂盒（美国 BD 公司）；PEG8000、DEX（M_W 64 000 ～ 70 000）、蔗糖、Alg（中黏度）均购自德国 Sigma-Aldrich 公司；二氯甲烷、磷酸氢钠、磷酸二氢钠、磷酸氢钾、磷酸二氢钾、聚乙烯醇 124（PVA）均为分析纯，购自国药集团。

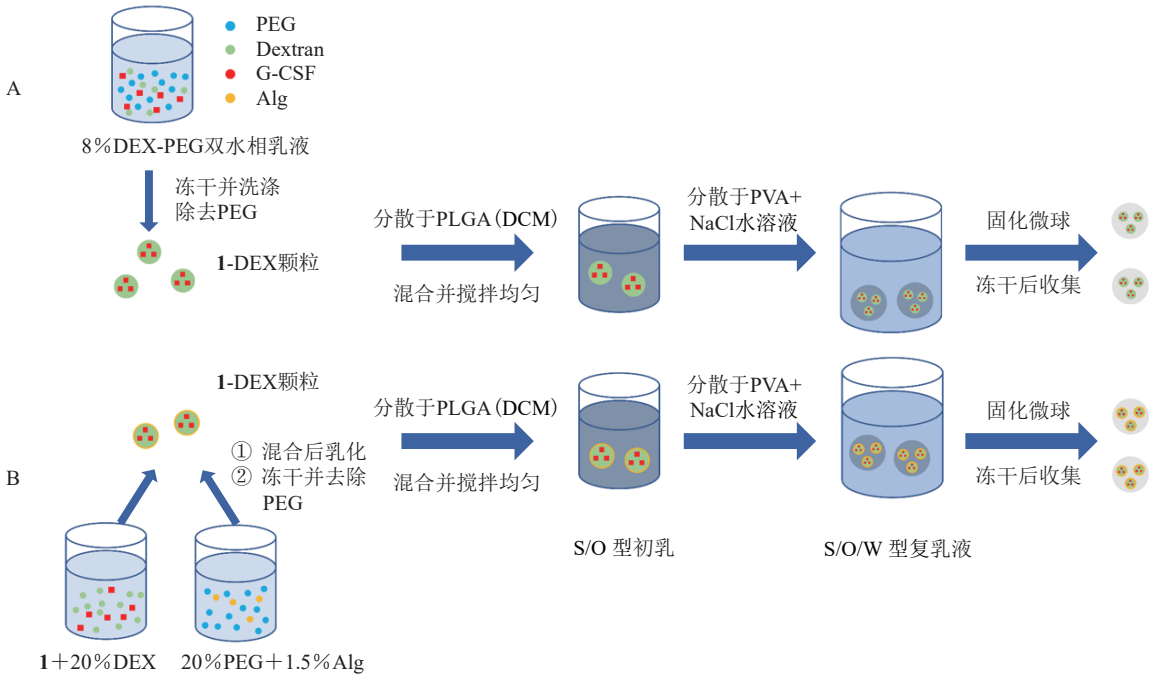
小鼠髓性白血病淋巴细胞株（NSF-60 细胞）购自中国药品生物制品检定研究院。

2 方法与结果

2.1 **1** PLGA 缓释微球的制备

2.1.1 冷冻相分离法制备 **1**-DEX 颗粒

采用 DEX、PEG 分别作为分散相和连续相构建无油 - 水界面的 DEX-PEG 双水相体系。精密量取 0.78 mg/mL 的 **1** 溶液 100 μL，与质量分数为 8% 的 DEX 溶液 4.875 mg 混合，再加入 0.78 mg/mL 的蔗糖溶液 100 μL，轻微涡旋成澄清溶液。另配制质量分数为 8% 的 PEG 溶液，将上述 **1**-DEX 溶液与 PEG 溶液以质量比 1 ∶ 5 混合，于 20 000 r/min 转速下分散乳化 10 s，使乳匀，重复 3 次，即得均一溶液。于 －20 ℃冷冻 12 h 后，减压冷冻干燥 24 h，得干燥粉末。所得粉末用二氯甲烷洗涤，并涡旋



A—冷冻相分离颗粒；B—双水相乳液颗粒。

图 1　不同方法制备微球的流程示意图

Fig.1　Schematic Diagrams of PLGA Microspheres Prepared by Different Methods

30 s 使 PEG 充分溶解，然后离心（13 176×*g*）5 min，弃去上清液，重复该洗涤步骤 3 ～ 5 次。除去 PEG 的样品在通风橱中自然挥干 12 ～ 24 h 或减压干燥 8 ～ 12 h，得到干燥的 **1**-DEX 颗粒，于 －20 ℃密封、备用。

2.1.2　双水相乳液法制备 **1**-DEX 颗粒

精密量取 0.78 mg/mL 的 **1** 溶液 100 μL，与质量分数为 20% DEX 溶液 1.95 mg 混合，再加入 0.78 mg/mL 的蔗糖溶液 100 μL，轻微涡旋成澄清溶液。另配制 PEG 和 Alg 的质量分数为 20% 和 1.5% 的混合溶液，加入上述 DEX 溶液，使之与 PEG-Alg 溶液以质量比 1 ∶ 5 混合，于 20 000 r/min 转速下分散乳化 10 s，使乳匀，重复 3 次，即得 **1**-DEX-PEG 双水相乳液。于 －20 ℃冷冻 12 h 后，减压冷冻干燥 24 h，即得粉末。所得粉末用二氯甲烷洗涤，再涡旋 30 s 使 PEG 充分溶解，然后离心（13 176×*g*）5 min，弃去上清液，重复该洗涤步骤 3 ～ 5 次。去除 PEG 的样品在通风橱中自然挥干 12 ～ 24 h 或减压干燥 8 ～ 12 h，得到干燥的 **1**-DEX 颗粒，于 －20 ℃密封、备用。

2.1.3　S/O/W 型乳化法制备 **1**-DEX-PLGA 缓释微球

取“**2.1.1**”“**2.1.2**”项下照双水相冷冻相分离法、双水相乳液法制得的 **1**-DEX 颗粒，分别以质量比 1 ∶ 10 加至质量分数为 20% PLGA- 二氯甲烷溶液中，磁力搅拌至分散成 S/O 型初乳，迅速转移到 1% PVA 溶液（含有 5% 氯化钠）4 mL 中，采用十字形磁子，搅拌（2 000 r/min）1 min，形成 S/O/W 型复乳液，然后转移至 10% 氯化钠溶液 2 L 中固化（100 r/min）4 h。采用沉降法收集微球，用超纯水洗涤 5 次，减压冷冻干燥（－58 ℃，气压小于 5.25×10^{-3} Pa）24 h，于 －20 ℃密封、备用。

2.1.4　水包油包水（W/O/W）型乳化法制备 **1** PLGA 缓释微球

精密量取 0.78 mg/mL **1** 水溶液 100 μL，加入 0.78 mg/mL 蔗糖溶液 100 μL，加至质量分数为 20% 的 PLGA- 二氯甲烷溶液中，磁力搅拌，使之

分散均匀，得初乳；再迅速转移到 1% PVA 溶液（含有 5%氯化钠）4 mL 中，采用十字形磁子，搅拌（2 000 r/min）1 min，形成 W/O/W 型复乳液，然后在 10%氯化钠溶液 2 L 中固化（100 r/min）4 h。采用沉降法收集微球，用超纯水洗涤 5 次，减压冷冻干燥（－58 ℃，气压小于 5.25×10^{-3} Pa）24 h，于－20 ℃密封、备用。

两种方法制备的微球处方如表 1 所示。

2.2 **1**-DEX 颗粒及其复合缓释微球的体外表征

2.2.1 SEM

取适量样品置于导电胶上，涂布均匀，用离子膜仪溅金后采用 SEM 观察颗粒大小和表面形态。结果如图 2 所示。冷冻相分离法制备的 **1**-DEX 颗粒粒径在 1.5 μm 左右，双水相乳液法制备的 **1**-DEX 颗粒粒径为 1 ～ 3 μm。2 种方法所得颗粒均外观圆整，分散均匀，颗粒与颗粒间未观察到粘连（图 2A、2B）。F2 组微球粒径为 90 ～ 130 μm，F1 组微球粒径大部分为 70 ～ 110 μm。2 组颗粒用 S/O/W 型乳化法制成的微球也均外观圆整，分散均匀，没有破损和凹陷，微球间未观察到粘连等情况（图 2C、2D）。

2.2.2 粒径与ζ电位

量取 **1**-DEX 颗粒 10 mg，分散于超纯水 5 mL 中，置纳米粒度仪中测定粒度分布。重复试验 3 次。结果显示，双水相乳液法制备的颗粒粒度分布较均匀，为 1 ～ 5 μm；相较而言，冷冻相分离法制备的颗粒粒度分布更均一，为 2 ～ 3 μm。

将 **1**-DEX-PLGA 缓释微球 30 mg 分散于超纯水 5 mL 中，将混悬液置入激光粒度仪中考察粒度分布。另取相同样品 10 mg，分散于超纯水 5 mL 中，置纳米粒度仪中测量ζ电位。重复试验 3 次。结果表明，F2 组微球体的平均粒径为（111.17±33.47）μm，ζ电位为（－11.58±1.11）mV；F1 组微球平均粒径（105.42±26.42）μm，ζ电位为（－12.11±2.56）mV。

2.2.3 EE

1-DEX 颗粒中蛋白药物的回收：精密称取按“**2.1.1**”“**2.1.2**”项下方法制得的 **1**-DEX 颗粒 10 mg，溶于磷酸盐缓冲液（PBS，pH 7.4、0.1 mol/L，下同）1 mL 中，室温静置至 DEX 颗粒充分溶解，得回收的 **1** 溶液。

1 PLGA 缓释微球中蛋白药物的回收：精密称取照 S/O/W 型乳化法制得的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球 10 mg 于离心管中，加入二氯甲烷洗涤微球，离心（212×*g*）1 min，弃去上清液，重复洗涤 3 次，剩余物置通风橱中挥干二氯甲烷，精密称定后溶于 PBS 1 mL 中，得到回收的 **1** 溶液。同上操作（省略颗粒回收及称重步骤），制备采用 W/O/W 型复乳法制得的 **1** PLGA 缓释微球的蛋白药物回收液。

采用 MicroBCA 方法测试各溶液中的蛋白含量，通过式①计算 EE。结果表明，冷冻相分离法和双水相乳液法所得的 **1**-DEX 颗粒、F2 组微球、F1 组微球、F3 组微球的 EE 分别为（98.67±3.06）%、（100.57±1.69）%、（76.87±5.67）%、（73.29±3.57）%和（43.27±3.06）%（n=3）。

EE= 微球或颗粒中蛋白药物的实测含量 / 微球或颗粒中蛋白药物的理论含量 ×100% ①

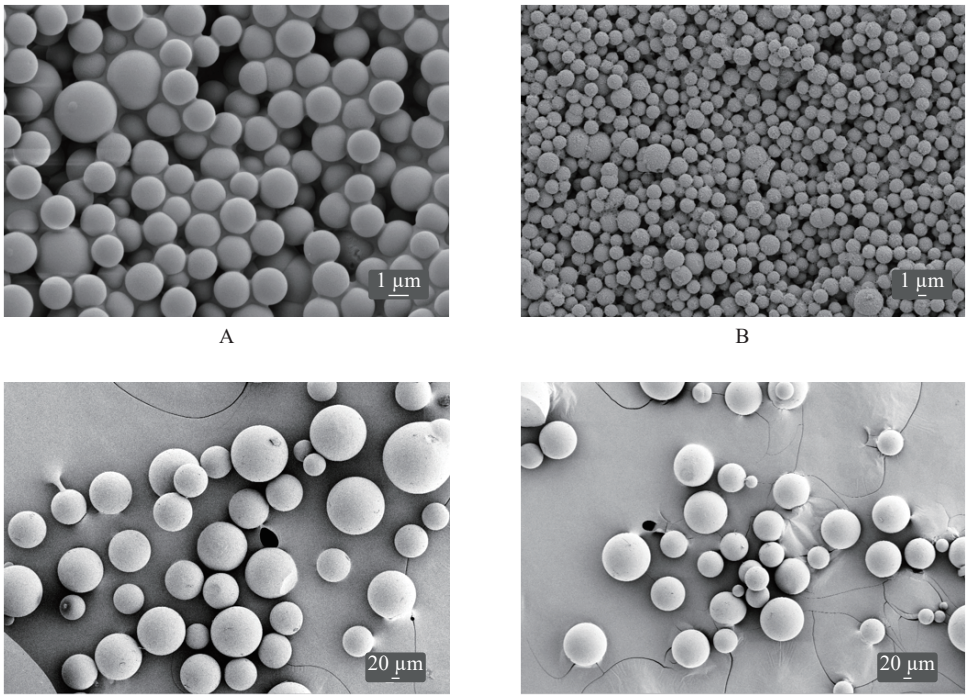
2.3 **1** PLGA 缓释微球的体外释放动力学

精密称取 F1 ～ F3 组微球各 20 mg，置 8 mL 释放瓶中，分别加入 PBS 1 mL 后密封，置 37 ℃恒温摇床（150 r/min）上，分别于 1、2、3、4、5、6、8、11、14、17、20、23、26、29、32、36、40 d 时精密量取全部体积上清液（及时补充同温等量缓

表 1 **1 PLGA 缓释微球的处方组成和制备方法**

Tab.1 The Formulation and Preparation Method of PLGA Microspheres Loaded with **1**

处方编号	处方组成		蛋白颗粒制备方法	微球制备方法
	成分	质量比		
F1	**1**，蔗糖，DEX，Alg，PLGA（5050 3A与5050 2A的质量比为75/25，下同）	1∶1∶5∶1.875∶88.75	DEX-PEG双水相乳液法	S/O/W型乳化法
F2	**1**，蔗糖，DEX，PLGA	1∶1∶5∶70	DEX-PEG双水相冷冻相分离法	S/O/W型乳化法
F3	**1**，蔗糖，PLGA	1∶1∶70	—	W/O/W型乳化法



A—冷冻相分离法所得 **1**-DEX 颗粒（×5 000）；B—双水相乳液法所得 **1**-DEX 颗粒（×2 000）；C—F2 组微球（×107），D—F1 组微球（×94）。

图 2　1-DEX 颗粒和载 1-DEX 颗粒的 PLGA 缓释微球的 SEM 照片

Fig.2　SEM Images of **1**-DEX Particles and PLGA Microspheres Loaded with **1**-DEX Particles

冲液），直接进行检测。采用 ELISA 测定上清液中 **1** 含量，绘制各组微球的体外释放曲线，分析比较不同制备方法对 **1** PLGA 缓释微球中药物释放行为的影响。结果如图 3 所示。

由图 3 可见，F3 组微球呈现传统的三相释放曲线形式，在 d1 突释载药量的 23%，d2、d3 有少量释放，然后进入迟滞释放期，d15 左右由于高分子材料降解产生了孔洞，开始持续缓慢释药直至 d20，之后几乎停止释放，累积释放总量约为载药量的 30%，释放不完全且效率较低。F2 组微球 d1 突释出载药量的 19%～20%，40 d 内连续缓慢释放至载药量的 80%左右，释药曲线趋于平稳，40 d 内释药基本结束。F1 组微球 d1 突释载药量的 16%，但 40 d 时的累积释放总量为 75%左右，略低于 F2 组微球。推测原因在于 **1** 容易形成聚集体，在弱酸环境中更稳定，而双水相乳液处方中含有海藻酸钠，抑制了体系的酸化，部分蛋白药物团聚在一起，释放不完全，使得 F1 组微球的释药总量略低于 F2 组微球。尽管由于制备方法不同，释放曲线稍有差异，但是 F1 和 F2 组微球基本可以实现 **1** 持续 1 个月的

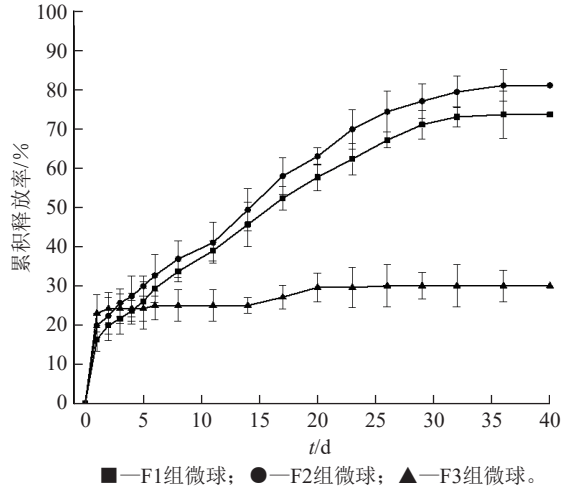


图 3　不同方法制备的 1 PLGA 缓释微球的体外释放曲线（*n*=3）

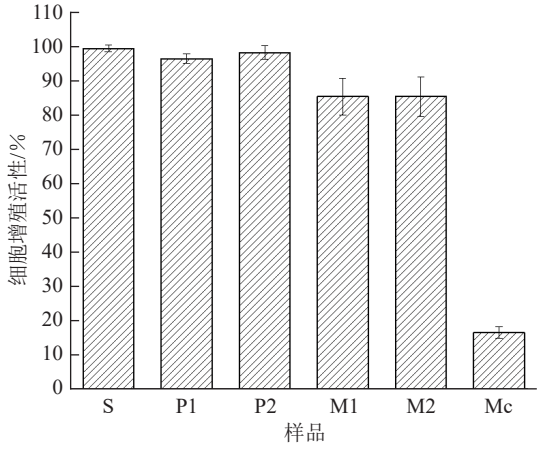
Fig.3　*In vitro* Release Curves of **1** PLGA Microspheres Prepared with Different Methods (*n*=3)

连续、平稳、完全释放。

2.4 制备和体外释放过程对 **1** PLGA 缓释微球中蛋白活性的影响

2.4.1 制备过程的影响

按“**2.2.3**”项下方法分别从各组微球样品中回收蛋白药物，得到回收的 **1** 溶液，以 NSF-60 细胞为模型，采用 MTT 比色法检测其对 NSF-60 细胞增殖活性的影响。各试验组于 37 ℃培养箱内培养 48 h。每孔加入 MTT 溶液（5 mg/mL）20 μL，继续在培养箱内孵育 5 h。弃去上清液，每孔加入 DMSO 150 μL，使结晶物甲瓒充分溶解，于酶标仪上测定各孔吸光度（检测波长 570 nm，参比波长 630 nm）。计算各试验组的细胞增殖活性，以间接反映 **1** 在 **1**-DEX 颗粒、**1** PLGA 缓释微球的制备过程中的活性变化，结果如图 4 所示。



S—**1**；P1—双水相乳液法制备的 **1**-DEX 颗粒；P2—冷冻相分离法制备的 **1**-DEX 颗粒；M1—F1 组微球；M2—F2 组微球；Mc—F3 组微球。

图 4 从 1-DEX 颗粒、1 PLGA 缓释微球中回收的 1 对细胞增殖活性的影响（*n*=3）

Fig.4 Effect of **1** Recovered from **1**-DEX Particles and **1** PLGA Microspheres on Cell Proliferation Activity（*n*=3）

由图 4 可见，从 **1**-DEX 颗粒中回收的 **1** 刺激 NSF-60 细胞增殖的活性均高于 96%，从 F1 和 F2 组微球中回收的 **1** 的活性均达到 85%，而从 F3 组微球中回收的 **1** 的活性仅为 16.36%。这说明在采用冷冻相分离法和双水相乳液法制备 **1**-DEX 颗粒以及 S/O/W 型乳化法制备 **1**-DEX-PLGA 缓释微球的过程中，蛋白药物的活性受到保护，基本没有损失，而 W/O/W 型乳化法制品（对照组）则缺少保护蛋白活性的机制，导致负载的蛋白活性损失较大。

2.4.2 体外释放过程的影响

精密量取各组微球，照“**2.3**”项下方法操作，分别于 1、2、3、4、6、8、11、14、17、20、23、26、29、32、36、40 d 定时吸取上清液，采用 ELISA 法测定上清液中 **1** 的释放总量，同时用 MTT 法测定上清液的细胞增殖活性，间接得到具有活性的 **1** 释放量，然后计算二者比值，以评价释放过程中不同制备方法所得制品对 **1** 活性的保护情况，结果如图 5 所示。

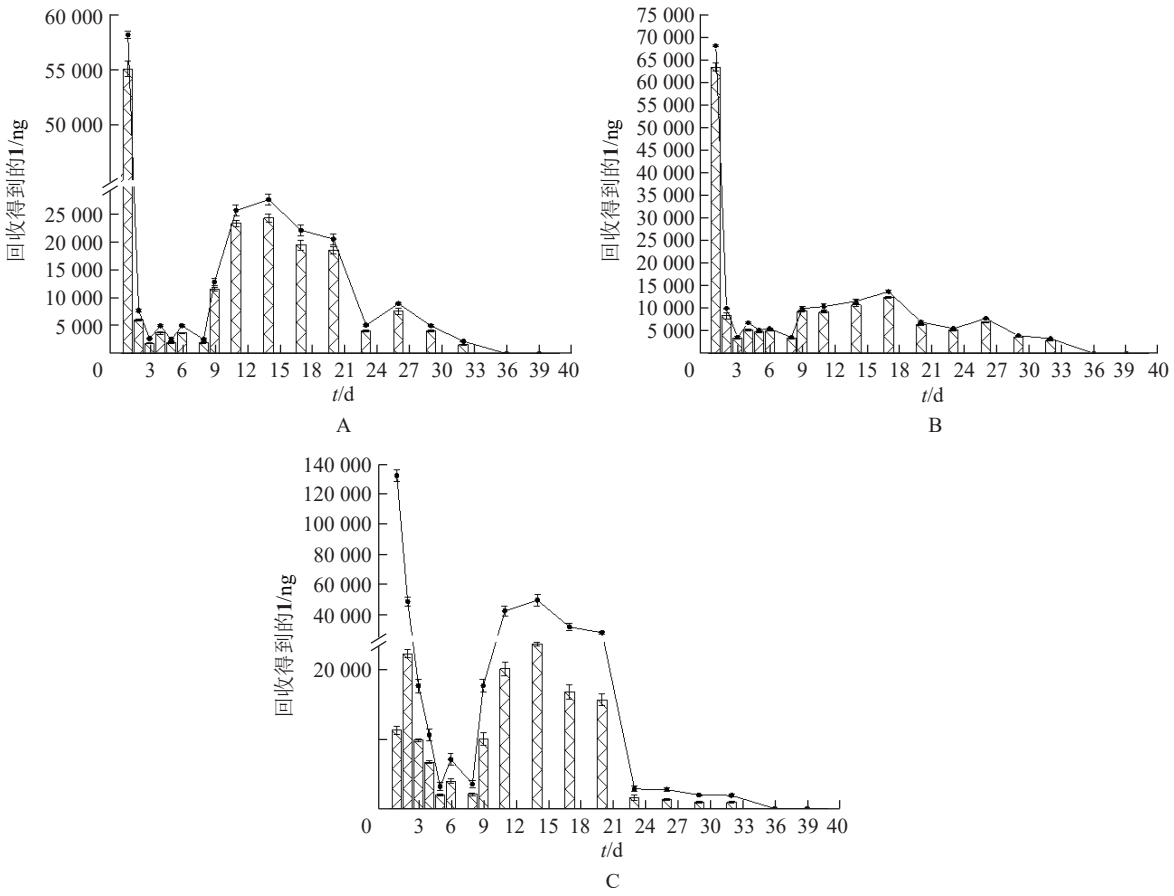
计算结果表明，采用冷冻相分离法、双水相乳液法 2 种方法制备的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球中具有细胞增殖活性的 **1** 释放量与 **1** 释放总量的比值分别为 >85%和 >90%，表明在整个体外释放过程中，大部分释放出的 **1** 都保持了细胞增殖活性。而对照组制品中具有细胞增殖活性的 **1** 释放量与 **1** 释放总量的比值为 30%～50%，且 d30 之后释放出的 **1** 已无法检出细胞增殖活性了。这些结果说明载 **1**-DEX 颗粒的 PLGA 缓释微球有效保护了 **1** 对 NSF-60 细胞的增殖活性。

3 讨论

本研究采用 DEX 和 PEG 双水相体系稳定蛋白，将 **1** 通过热力学分配的原理包裹至 DEX 相中形成 **1**-DEX 颗粒，再通过 S/O/W 型乳化法制备了载 **1**-DEX 颗粒的 PLGA 缓释微球，同时利用 W/O/W 型复乳法方法制备了 **1** PLGA 缓释微球作为对照。

结果表明，冷冻相分离法、双水相乳液法 2 种方法制备的 **1**-DEX 颗粒的 EE 都在 95%以上，制成微球后也均大于 70%，远高于复乳法所得 **1**-PLGA 缓释微球，实现了对蛋白药物的高效包封。

由图 3 可见，载 **1**-DEX 颗粒和载 **1** 的微球在体外的释药行为不同，前者中的蛋白药物被 DEX 颗粒分隔，降低了团聚的可能，蛋白药物得以连续、缓慢、平稳地释放；后者中的蛋白团聚在一起，并吸附于疏水性高分子基质上，释放不完全[12]。



A—F1 组微球；B—F2 组微球；C—F3 组微球。

▨—NSF-60 细胞增殖法测得的活性**1**释放量；　—●— —ELISA 法测得的**1**释放总量。

图 5　体外释放过程中 1 PLGA 缓释微球的累积释放量及具有细胞增殖活性的 1 释放量（*n*=3）

Fig.5　Cumulative Amounts of **1** and **1** with Cell Proliferation Activity Released from PLGA Microspheres during the *in vitro* Release Process (*n*=3)

在制备和体外释放过程中，**1**-DEX 颗粒、**1**-DEX-PLGA 缓释微球对 NSF-60 细胞均具有良好细胞增殖活性，证明了 DEX 可对蛋白活性进行有效保护，预制剂避免了油 - 水界面张力和有机试剂对蛋白活性的损害。此外，与双水相乳液法制备的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球相比，冷冻相分离法制备的 **1**-DEX-PLGA 缓释微球释放更完全，且对蛋白的活性保护效果更好。

综上所述，载 **1**-DEX 颗粒的 PLGA 缓释微球能够在保护蛋白活性的前提下显著提高药物 EE，避免突释，实现缓慢释放，且蛋白药物释放较完全，对制备大分子蛋白药物的长效缓释微球制剂具有积极意义，有潜力提高大分子蛋白药物注射制剂的顺应性，避免不良反应的发生，提高患者生存质量。

参考文献：

[1] LI H, LI L J, WANG Y P. G-CSF improves CUMS-induced depressive behaviors through downregulating Ras/ERK/MAPK signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, **479**(4): 827-832.

[2] KUAN J W, SU A T, WONG S P, *et al*. A randomized double blind control trial comparing filgrastim and pegfilgrastim in cyclophosphamide peripheral blood hematopoietic stem cell mobilization [J]. *Transfus Apher Sci*, 2015, **53**(2): 196-204.

[3] 周建红, 罗文苹, 张日光, 等. 聚乙二醇化重组人粒细胞集落刺激因子的临床应用进展[J]. 医学综述, 2021, **27**(15): 3067-3072.

[4] SCHWENDEMAN S P. Recent advances in the stabilization of proteins encapsulated in injectable PLGA delivery systems [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2002, **19**(1): 73-98.

[5] D'IMPRIMA E, FLORIS D, JOPPE M, *et al*. Protein denaturation at the air-water interface and how to prevent it [J]. *Elife*, 2019, **4**(8): e42747.

[6] SAH H. Protein behavior at the water/methylene chloride interface [J]. *J Pharm Sci*, 1999, **88**(12): 1320-1325.

[7] 苏 玲, 苏燕评, 俞昌喜. 天然药物聚乳酸或聚乳酸-羟基乙酸共聚物微球的研究进展[J]. 海峡药学, 2017, **29**(8): 1-4.

[8] SOPHOCLEOUS A M, DESAI K G H, MAZZARA J M, *et al*. The nature of peptide interactions with acid end-group PLGAs and facile aqueous-based microencapsulation of therapeutic peptides [J]. *J Control Release*, 2013, **172**(3): 662-670.

[9] 王金秋, 陈加传, 李柯萌, 等. 生物活性蛋白质分离纯化技术研究进展[J]. 食品工业, 2018, **39**(5): 259-263.

[10] JIN T, CHEN L, ZHU H. Stable polymer aqueous/aqueous emulsion system and uses thereof: US, 2002055461 [P]. 2002-05-09.

[11] WU F, DAI L L, GENG L, *et al*. Practically feasible production of sustained-release microspheres of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) [J]. *J Control Release*, 2017, **10**(259): 195-202.

[12] JIN T, ZHU J H, WU F, *et al*. Preparing polymer-based sustained-release systems without exposing proteins to water-oil or water-air interfaces and cross-linking reagents [J]. *J Control Release*, 2008, **128**(1): 50-59.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封三：鲁南厚普制药有限公司

封底：苏州海顺包装材料有限公司

190 页：公益广告