

综述

脂质体(Liposomes)技术在医学中的应用

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

张荣珍 综述 聂弟楷 审校

20多年前Banghan A D等(1965)发现了水溶液形成的单层或多层同心圆结构的磷脂膜微囊,即脂质体(Liposomes)。由于这种结构与哺乳动物的细胞膜极相似,所以在随后的时间里主要把它作为生物膜的模型来研究。又由于脂质体是由脂类和类固醇制作的,因此它没有毒性,有生物相容性,并可被生物所降解。近10年来脂质体技术应用越来越广泛。在治疗上包裹药物作药物的载体,提高疗效,减低药物的毒性;在基因工程上将基因包入脂质体内转导已获得成功;在免疫学上把它作抗原的载体,可起到佐剂作用。此外,还可把脂质体用作诊断的工具。

一、脂质体的性质:一般,所有双链有极性的磷脂均能用于制作脂质体,这包括除了少于12个碳的短链脂类之外大多数自然来源的和人工合成的脂类。单链的像溶血磷脂不能用来制作脂质体。固醇类像胆固醇也不能形成稳定的脂质体。但这些磷脂可彼此混合而形成稳定的脂质体。制备脂质体使用最广泛的是磷脂酰胆碱和胆固醇。有人认为唯有纯磷脂才能用于制备脂质体。但也有的试验证明市售不纯的磷脂也能较容易的制成脂质体。但为了系统比较试验结果,用纯磷脂还是较适宜的。

由于脂质体主要由磷脂双分子层组成,根据其层数多少和囊的大小可分为:1.多层大脂质体(MLV):直径约为 $0.1\sim 50\mu\text{m}$,它的制作比较容易及渗漏较低,已被广泛用于药物的载体;2.单层小脂质体(SUV):直径为 $200\sim 500\text{\AA}$,这种脂质体包裹体积小,不适宜做贵重药物的载体;3.单层大脂质体(LUV):直径为 $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$,这种脂质体包裹率较高,主要用倒相蒸发法制备,不适于包裹蛋白分子,但可以包裹核酸。

由于所制备的脂质体往往是大小不均的,因而会影响试验结果。因此不少科学工作者对制备大小均一的脂质体进行了研究(Papahadjopoulos等,1967; Hauser H等,1971)。他们多数以延长超声处理的时间来获得均一单层小的脂质体。Huang等(1972)认为这样制备的脂质体还需要经过Sepharose 4B凝

胶柱层析进一步分离才能得到均一的脂质体。但是,Andrews等(1975)通过Sepharose 2B柱层析也仍然能得到均一的脂质体。李才元等(1982)用超声波制备大小均一的脂质体,通过琼脂糖凝胶2B或4B也达到了此目的。

温度较高时,脂质体可以自由流动,当温度降低到一定程度时,脂分子不能自由流动而成为“固态”,这个温度称为相变温度(transition temperature),这是脂质体一个重要的物理性质——流动性的标志。

脂质体的通透性是使用脂质体时必须考虑的问题。脂质体的可透性与它的组分有关,组成脂质体的磷脂不饱和脂肪酸链越长,一般通透性就越小。外源蛋白可增加脂质体的通透性,而胆固醇则能显著地减少其通透性。当脂质体含33%(克分子)以上的胆固醇时,渗透性下降。不同物质透过脂质体的顺序为:水>小分子非电解质>阳离子>阴离子。分子越小,带电荷越少,越易透过。多价离子与大分子则不能透过。

脂质体所带电荷,一般用磷脂酰胆碱和胆固醇制备的脂质体是中性的。当脂质体含有酸性脂像磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、磷脂酰肌醇、磷脂酸、心磷脂及二乙酰磷酸盐在中性pH值时,带阴电荷。当脂质体含有硬脂酰胺时带阳电荷。

脂质体在体内的代谢,脂质体进入循环系统后,可能以完整的形式逐渐地进入各种组织。这个过程是受各种因素影响的。首先脂质体的大小和表面所带电荷是两个重要的因素。直径为 $200\sim 500\text{\AA}$ 单层小的脂质体在循环系统中存留的时间要比相同组成的直径为 $1\mu\text{m}$ 多层大的脂质体长。其次,脂质体表面所带电荷的种类,带阳性或中性电荷单层小的脂质体在循环系统中存留时间长,而带阴电荷小脂质体很快被清除掉。Juliano RL等(1980)发现表面带不同电荷的脂质体包裹不同种类的浆蛋白。同时所包裹的蛋白又决定脂质体在体内的命运。当脂质体从循环系统被清除掉以后,随后就进入各组织和器官。许多研究者已报告(Gregoriadis和Ryman,1972; Gregoriadis

和 Neerunjun, 1974; Juliano和Stamp, 1978), 多层大脂质体首先被肝脏和脾脏吸收。因为肝脏和脾脏的网状内皮系统有丰富的吞噬细胞。还有人 (Hunt等, 1979) 观察到, 多层大脂质体主要存留在肺中, 单层小的脂质体有广泛的分布, 但主要还是在肝脏和脾脏中。

脂质体的毒性: 一般, 脂质体的毒性是很低的。主要取决于脂质体的大小和表面所带电荷的种类。带阳电荷的脂质体是最有毒性的, 其次是带阴电荷的, 中性脂质体毒性很小。毒性主要是引起肝脏坏死和网状内皮细胞堵塞。但无论哪种脂质体只有在大剂量下才产生毒性。即 5 克/公斤 体重时在小白鼠体内才产生毒性反应, 急性毒性作用几天内很快消失。此外, 长期注射脂质体同样会对网状内皮细胞有损害作用, 主要因脂质体中含有神经鞘磷脂所致。所以脂质体是相对无毒的。

脂质体的服用途径: 可根据不同的目的采用不同途径。如脂质体作为免疫佐剂以采用皮下或肌肉内注射为好, 因为这种途径免疫原在局部释放较慢, 使机体不断的受到免疫原刺激。如果将胰岛素包裹于脂质体中, 口服给药可有效降低血糖 (Patel H M 等, 1977及1976)。但也有人认为会受到胆盐的破坏, 只有较稳定的脂质体才能抵抗这种作用。如果脂质体包裹的是抗肿瘤药物, 支气管内注射, 就会延长在肺内保留的时间, 而经血液循环则药物出现较晚 (Juliano R L等, 1978; McCullough H N等, 1979)。由于血脑屏障, 脂质体作静脉注射就达不到中枢神经系统。为了增加在脑中脂质体的浓度, 可直接于脑脊液内注射 (Kimelberg H K等, 1978; Adams D M等, 1977)。

可包裹脂质体内的物质:

1. 蛋白类: 溶菌酶、Amyloglucosidase、 β -D-fructofuranoside、人血清白蛋白、Obelin、Asparanase、牛血清白蛋白、过氧化酶、右旋糖酐、 α -Mannosidase、胰岛素、己糖激酶、dehydrogenase、 β -半乳糖酐酶、葡萄糖脑酐酶等。

2. 药物: 抗菌素、激素、抗血吸虫药、锑剂、抗疟药 (伯奎)、抗肿瘤药 (阿糖胞苷、氮芥、甲氨喋呤)、酶疗药物 (淀粉酶、糖酐酶、葡糖脑酐、门冬酰胺酶, 乙糖胺酶A)

二、脂质体的制备: 制备脂质体用的脂类必须非常纯, 即使少量的脂肪酸或可溶性磷脂酸均对脂质体表面所带电荷及渗透性有很大影响。所以最好预先纯

化, 纯化后应放在有机溶剂中及惰性气体中保存于 -20°C 。

脂质体的制备并不很复杂, 只要将磷脂与胆固醇按一定克分子比例混合起来, 再经一系列的步骤就能制得。现将已有的方法归纳如下 (附表):

附表 脂质体几种主要制备方法比较

方法	特 点	包裹率
手摇法	简单	低
减压蒸发	均一的多层大脂质体 (MLV)	低
超 声	均一的单层小脂质体 (SUV)	低
除清洁剂	主要用于膜的重建	中等
乙醇注射	简单、温和、所得脂质体大小可调节	低
压力挤出	无害、可重复	中等
醚注入法	可得 $1500 \sim 2500 \text{ \AA}$ LUV	中等
倒相蒸发	可得均一 LUV, 主要用在基因工程工作中	高
诱导融合	适用于酸性磷脂制备脂质体可得 LUV。	中等

总之, 脂质体可制成不同大小, 带不同电荷及流度。但有些方法需使用超声波及有机溶剂, 这些对包裹大分子物质像蛋白类是不适宜的。有些方法费时间, 甚至需要贵重的仪器。因此, 到底使用哪种方法可根据实验的目的及现有的条件来选择。

三、脂质体的应用:

1. 脂质体在免疫学方面的应用: 目前人用免疫佐剂, 其效果尚不够理想。福氏完全佐剂作用虽强, 但局部反应严重, 即使兽用疫苗也难推广。近年来发现, 脂质体有明显的佐剂作用, 且能为机体所代谢, 故认为是有前途的。

脂质体除对具有抗原性脂类产生抗体的作用外, 同样对蛋白类抗原也有佐剂的作用。首先为 Alliso和 Gregoriadis (1974) 用白喉类毒素作抗原所证明。随后 Hearth等 (1976) 使用牛血清白蛋白的结果进一步得到证实。

脂质体的佐剂作用是物理性的。一般, 免疫接种时采用皮下或皮内注射, 由于脂质体在注射的局部存留的时间较长。巨噬细胞吞噬脂质体可能同样是一个重要因素。Allison和Gregoriadis主张脂质体能增强免疫反应, 同样能预防超敏感反应。Gregoriadis G等 (1980) 用脂质体作乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 的佐剂, 皮下给豚鼠注射, 同时与不包裹于脂质体的 HBsAg 免疫豚鼠结果相比较, 血清滴度阳转率明显增高。Howard R SIX等 (1980) 从腺病毒提取的抗原亚单位包裹于脂质体中, 结果从血清学抗体反应的频率及中和抗体的水平都较未提取的腺病毒为

高。初连瑞等(1984)试验表明单独脂质体的作用尚有限,他们研究了脂质体与克雷白氏肺炎杆菌外分泌荚膜多糖(CPS-K)的联合佐剂作用。结果表明CPS-K-脂质体对A型肉毒类毒素也有类似强免疫佐剂的作用。此外, Gregoriadis G等(1980)同样证明了,包裹HBsAg的脂质体与其它的佐剂如MDP(胞壁二肽)或百日咳杆菌联合使用时,产生抗体反应强,抗体效价更高。

2.脂质体用作药物的载体:由于脂质体能改变药物的动力学如清除、代谢和排除,能选择的将药物带入靶器官。从而有减少药物的毒性并在一定部位持续释放药物等优点,所以,近年来把它作为药物载体的研究较多,并有一些成功的报道。

由于它能把药物携带进网状内皮系统,因此,可用于抗寄生虫病治疗、酶疗法、金属螯合治疗及抗肿瘤转移治疗上。抗寄生虫病的治疗主要是利什曼原虫和疟原虫。当将锑剂和其它有效药物包裹于脂质体时,药量低于常规量的1000倍时,能治疗动物的试验感染。

用脂质体裹入链霉素抗感染网状内皮细胞内的细菌,如布氏杆菌和结核菌;脂质体携带MAF(巨噬细胞活化因子)到巨噬细胞,可提高它的活性以消灭转移的肿瘤细胞。脂质体包裹EDTA(二乙胺四乙酸)可清除体内有害的重金属离子。

3.脂质体在基因工程中的应用:到目前为止,脂质体用于基因工程的例子不多。Fraley等(1979)将质粒pBR322包入脂质体,用通常质粒转化方法,将CaCl₂处理的大肠杆菌作为受体,在含四环素培养基上选转化子,转化子也获得了pBR322的T_c^r基因。用脂质体最大优点是它起着保护DNA不受胞外酶降解的作用,并易于通过细胞融合使DNA进入细胞。因此,脂质体作基因的载体更适合于真核细胞。Wong等(1980)也报道用E. coli, BglI和BamHI三种限制性内切酶从pBR322质粒上切下一段β-内酰胺酶基因,将这个DNA片段包入脂质体内,与Hela细胞或鸡胚细胞一起培养,结果发现每个细胞有5000个左右的DNA分子进入,并可检出β-内酰胺酶的活性。最近, Dellaporta等从农杆菌中提出Ti质粒包入带负电荷的单层大脂质体,转入烟草的原生质体。因此,脂质体的应用,将为DNA送入原来无法送入的细胞提供了希望,可能为高等生物的基因工程开辟一条新的途径。

我国从1980年以来也开展了应用脂质体的工作。沈阳药学院与上海长宁区中心医院合作研制了抗癌药物载体——多相脂质体、油酸多相脂质体、混悬型静脉注射脂质体,对中晚期胃癌术前给药有效率为67%,而复方唐松草新碱多相脂质体为64%。复方5-氟脲嘧啶,喜树碱多相脂质体同样显示了较好的疗效。上海肿瘤研究所制备的脂质体包裹长春新碱、环磷酰胺、氟脲嘧啶分别在临床上试用。南京药物研究所将氨甲喋呤包入脂质体,治疗试验动物的癌症也取得一定成功。

参 考 文 献

- 1.高昌烈:国外医学情报,18:320,1984
- 2.李才元等:膜分离科学与技术,2(1):1,1982
- 3.初连瑞等:上海免疫学杂志,4(3):164,1984
- 4.顾学裘等:中草药,13(4):13,1982
- 5.江宁:微生物动态,5:164,1983
- 6.Bangham A D et al: Nature, 182:642, 1958
- 7.Bangham A D et al: J Mol Biol, 13:38, 1965
- 8.Papahadjopoulos D et al: Biochem Biophys Act, 135:624, 1967
- 9.Hauser H et al: Biochem Biophys Res Commun, 45:1049, 1971
- 10.Huang C et al: Biochem Biophys Res Commun, 46:1660, 1972
- 11.Andrews S B: Biochem Biophys Res Commun, 65:915, 1975
- 12.Juliano R L; Knight (ed) Liposomes: From Physical structure to Therapeutic Applications Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 391, 1981
- 13.Gregoriadis G et al: Eur J Biochem, 24:485, 1972
- 14.Gregoriadis G et al: Eur J Biochem, 47:185, 1974
- 15.Juliano R L et al: Biochem Pharmacol, 27:21, 1978
- 16.Hunt C A et al: Drug Metab Dispos, 7:124, 1979
- 17.Patel H M et al: FEBS, 62:60, 1976
- 18.Patel H M et al: Biochem Soc Trans, 5:1054, 1977
- 19.Juliano R L et al: Ann N Y Acad Sci, 308:411, 1978
- 20.McCloughn H N et al: J Natl Cancer Inst, 63:727, 1979
- 21.Allison A C et al: Nature, 252:252, 1974
- 22.Gregoriadis G et al: Liposomes and Immunobiology, 271, 1980
- 23.Howard R SIX et al: Liposomes and Immunobiology, 119, 1980
- 24.Fraley et al: Proc Natl Acad Sci USA, 76:3348, 1979
- 25.Wong et al: Gene, 10:87, 1980
- 26.Sinil KIM et al: Biochem et Biophysica, Acta, 728:339, 1983
- 27.Gregoriadis G: Liposome Technology, Vol, I, 1984
- 28.Gregoriadis G: Liposome Technology, Vol II, 1984
- 29.Gregoriadis G: Liposome Technology, Vol III, 1984