

脂质体包裹血红蛋白的制备方法及其质量影响因素

吴忠斌, 陈建明 (第二军医大学药学院, 上海 200433)

摘要 本文以国内外脂质体包裹血红蛋白的研究为基础, 介绍了脂质体包裹血红蛋白的主要制备方法, 并对其质量影响因素进行了简要地综述。

关键词 脂质体; 血红蛋白; 制备方法; 质量影响因素

中图分类号: R 94 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2008)01-0001-04

由于临床急救输血大量需求与血源短缺的矛盾, 以及输血过程中烦琐费时的操作、可能发生的不良反应和某些传染性疾病 (如乙型肝炎、艾滋病) 的传播, 为此, 寻找安全有效的血液代用品成为医学研究的热点之一。目前, 临床常用的主要血液代用品是血浆扩容药, 如右旋糖酐、706代血浆等, 它们虽有血浆扩容和维持血液动力学的作用, 但本身无携氧能力。为了寻找具有携氧能力的血液代用品, 人们尝试利用血红蛋白 (hemoglobin, Hb) 作为氧载体, 用于动物急性缺血试验, 但研究发现, 天然血红蛋白四聚体在体内易裂解成二聚体, 携氧量低, 半衰期短 (不超过 4 h), 且有肾毒性。为解决天然 Hb 的缺陷, 人们采用两种方法: 一种是修饰血红蛋白 (modified hemoglobin), 其又可分为内交联 Hb 多聚 Hb, 高分子化合物共轭 Hb 这类产品已开发到临床试验 III 期, 有的已在个别国家上市。另一种是脂质体包裹血红蛋白 (liposome-encapsulated hemoglobin, LEH), 目前只处于动物试验研究阶段^[1]。由于 LEH 不仅具有细胞膜结构, 能有效地保护 Hb 和控制 Hb 的释放, 而且可以包裹 Hb 外的红细胞辅助酶系统和偶联物, 更接近天然红细胞, 从而能更好发挥调节携氧和释氧能力, 进一步提高稳定性, 延长半衰期, 降低副作用。因此已成为人工血液代用品的研究重点^[2-4]。本文就 LEH 主要制备方法和其质量影响因素等方面进行综述。

1 LEH 的制备方法

目前, 关于 LEH 的制备方法已进行了大量的研究, 其中超声处理、表面活性剂透析、逆相蒸发等可导致 Hb 变性, 冻融法可使 Hb 泄漏, 因此, 研究试验

中使用较多的是微射流法、挤压法、注入法、脱水-再水化法等方法, 其中前两者应用范围较为广泛。

1.1 微射流法 (microfluidization) 微射流法是常用的制备方法。Rudolph 等人^[5]报道, 将双硬脂酰卵磷脂, 双肉豆蔻酰磷脂酰甘油, 胆固醇和维生素 E 按 10:9:0.9:0.1 摩尔比溶解于氯仿, 将溶液置于烧瓶中, 真空状态挥发溶剂, 使脂质在烧瓶壁上成膜, 将干膜用去离子注射用水水化后, 冷冻干燥成粉, 再与无基质的血红蛋白溶液充分混合, 在微射流仪 (microfluidizer) 的高速剪切力作用下形成大单室脂质体, 用聚酰胺透析器滤过未包裹的 Hb 包裹的 Hb 用磷酸缓冲溶液冲洗, 即得。该法优点是, Hb 不与有机溶剂接触, 不易变性; 制得的 LEH 粒径分布较均匀, 多在 0.2~0.5 μm 之间; 制备 LEH 的速度快, 可进行大规模生产, 是目前较常用的 LEH 制备技术。主要缺点是, 要获得较理想的粒径需反复微流化, 这容易导致 Hb 破碎, 且包裹率也不高, 仅为 20%~25%。

1.2 挤压法 (extrusion) 挤压法也是常用的制备方法。Sou 等^[6]报道, 将 1,2-双棕榈酰-甘油-3-磷酸卵磷脂 (DPPC), 胆固醇, 1,5-双棕榈酰-1-谷氨酸-N-琥珀酸 (DPEA), 1,2-双硬脂酰-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基-聚乙二醇 (5000)] (PEG-DSPE) 按 5:5:1:0.033 摩尔比在 NaOH 溶液 (7.6 mM) 中水化, 得到多分散相多层的小囊泡分散体系 (粒径分布 50 nm~30 μm), 通过冻融法使多分散相的小囊泡转化为粒径范围相对较窄的平均约为 500 nm 的小囊泡, 再冷冻干燥, 所得冻干粉加入到含有 Hb 的溶液中, 通过膜过滤器挤压渗透, 即可得到粒径为 250±20 nm 的 LEH 溶液。该方法中, 冻融后的小囊泡通过膜过滤器挤压渗透速率是简单水化后小囊泡的 30 倍。在挤压过程中 Hb 被小囊泡包裹而形成 LEH。Arifin 等^[7]以摩尔比为 10:9:1 的双肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、胆固醇、双肉豆蔻酰磷脂酰甘油

作者简介: 吴忠斌 (1971-), 男, 硕士生。E-mail: wuzhongbin_3379@sjna.com

通讯作者: 陈建明, E-mail: yjcjm@163.com

为材料,通过挤压法制备脂质体,考察不同膜孔对 LEH 的粒径分布的影响,结果表明,通过 400 nm 膜孔制得的 LEH 粒径小于膜孔,通过 200 nm 膜孔制得的 LEH 粒径接近于膜孔,而通过 100 80 50 nm 膜孔制得的 LEH 粒径大于膜孔。该法主要优点是,可以根据膜孔大小来制备所需的 LEH,制得的单层脂质体的比例也增多,而且脂质体分布趋于均一。此外,该法的包裹率较高,在磷酸盐缓冲溶液中可达 70%^[7]。缺点是,该法制备中的膜渗透速度相对较慢,可减压抽滤或加压挤出。

1.3 注入法 (injection) 李立新等^[8]报道,将卵磷脂和聚乳酸溶于乙醇和丙酮溶液中,每次抽取 3 mL 采用注入法(注射器+磁力搅拌),在 4℃、氮气情况下以 50 μ L/min 滴入到待包裹的无基质血红蛋白(SFHb)溶液(10 mL SFHb 加 4 mL 红细胞保存液,加 0.3 mL 吐温-20 加 25 mg 2,3-DPG)中,滴入结束后,固化 2 h 后,高速离心去除未被包裹的 Hb 上清液,再经 2~3 遍生理盐水离心洗涤即成 LEH。该法操作相对简单,重现性好,但使用有机溶剂会使 Hb 变性,脂质体粒度均匀度一般,包裹率不高,本例中仅为 27.2%。

1.4 脱水-再水化法 (dehydration-rehydration) Shew 等^[9]将 Hb 和碱性磷酸酯酶分别用磷酸卵磷脂包裹制成脂质体,方法是 1:2~1:3 摩尔比的磷脂和溶质混合于水相中,超声得混合物,在氮气下旋转蒸发干燥成膜,膜再水化,形成夹带溶质的多层膜的脂质体。该法优点是无需使用有机溶剂、去污剂和透析仪器,适合大规模生产,但存在问题是 Hb 易变性,包裹率不高。为此,Brandl 等^[10]采用冷冻干燥脱水,再水化制备 LEH,并且选择冷冻保护剂来保护 Hb 在冷冻干燥和水化过程中不受影响,不仅解决了 Hb 变性的问题,而且提高了包裹率,延长了循环半衰期。

2 影响 LEH 质量的因素

影响 LEH 质量的因素较多。本文主要从 Hb 来源与浓度,脂质膜组分、电性与修饰,协同包裹物和制备条件等方面,来探讨它们对 Hb 的稳定,LEH 的携氧能力、包裹率、循环半衰期,以及在 LEH 制备和储存中的稳定性等方面的影响。

2.1 Hb 的影响

2.1.1 Hb 的来源 Hb 的来源对 LEH 的制备和质量有影响。实验研究的 Hb 主要来源于过期的人血液制品、新鲜的猪血和牛血。由于过期的人血液制品来源有限,实验研究中多用猪血或牛血。在人 Hb 和牛 Hb 性质的比较上,Sakai 等报道,采用超滤法

能去除红细胞磷脂的效率在 99.99%,获得的蛋白纯度为 99.99%,纯牛血红蛋白的浓度超过 40 g/dL;还原型的和羧基化的牛血红蛋白的解链温度分别是 83℃和 87℃,高于人血红蛋白的解链温度 80℃和 78℃,可用巴斯德灭菌法;牛的 LEH 不需要 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-DGP)来调节载氧能力,LEH 粒径 280 nm,半饱和氧分压(P_{50})为 16~28 mmHg,与人的 Hb 相比,牛 Hb 具有易纯化,更稳定,能调节血氧亲和力等优点。在猪血和牛血的选择应用上,Johnstone 等^[12]研究表明,牛红细胞不易溶血,脆性较低,在体外实验牛红细胞引起的人血清反应低于猪的红细胞。总之,牛 Hb 由于其特定的理化性质和来源丰富、易采集等优势成为异种输血最佳来源,目前,有关牛 Hb 作为人血液代用品的研究工作已经进入临床 II 期试验。

2.1.2 LEH 中的 Hb 浓度 LEH 中 Hb 的浓度取决于待包裹的 Hb 的初浓度,随着初浓度的升高,脂质体中的 Hb 浓度升高,包裹率也升高,携氧能力相应增强。但是,实际应用中的 LEH 中 Hb 的浓度要根据实际载氧量和临床要求来寻求平衡。Greenburg 等^[13]提出研究红细胞代用品的参考标准值,Hb 浓度期望值为 7~14 g/dL,半饱和氧分压 P_{50} > 26~28 mmHg。Sakai 等^[14]报道,在大鼠出血性休克模型复苏实验中,分散于 8 g/dL 人血清白蛋白中的 3.8 g/dL 和 7.6 g/dL 的 LEH,对出血性休克的大鼠能迅速恢复血压,并能显著改善功能性毛细血管的密度和组织的氧合作用。值得注意的是 3.8 g/dL LEH 在恢复微血管的血流量方面比 7.6 g/dL LEH 的效果更好。

2.2 LEH 脂质膜的影响

2.2.1 脂质膜组分 在许多文献报道中,LEH 的脂质膜通常由 4 部分组成:一是脂质,如二硬脂酰卵磷脂、氢化大豆卵磷脂,主要是参与形成双分子膜,是脂质和外水相间的表面活性剂;二是胆固醇,是脂质和内水相间的表面活性剂,可使脂质体不受血清脂蛋白的攻击,并可防止其他细胞的胆固醇进入脂质体,减小脂质体对小离子的通透性;三是带负电荷的磷脂,如双肉豆蔻酰磷脂酰甘油、磷脂酰醇、PI-PEG-PE 等,主要用来防止脂质体解聚;四是作为抗氧化剂的维生素 E,可减少脂质在制备及贮存过程中的脂质氧化。此 4 种成分随制备方法选择不同,组分的品种、数量和比例不同,对脂质体质量的影响也不同。例如,在脂质的选用上,饱和长链的脂质制得的 LEH 比不饱和的更稳定;在胆固醇的用量上,增加一定比例的胆固醇,可提高包裹率,而且胆固醇含量越高,LEH 降解速度越低,内在黏度降低,并对

氧自由基有显著的防护效应^[15],但是过多的胆固醇则增加脂质双分子膜不对称而发生 Hb 渗漏。

2.2.2 脂质膜电性 脂质体膜表面的电性能影响脂质体的质量。如果脂质膜表面电性与药物带电相反,则包裹率高,稳定性好。LEH 脂质膜中一般加入带负电荷的磷脂,目的在于改善 LEH 的黏度和改善血液流变学性能,从而提高包裹率和稳定性。邓百龙等^[16]分别对带中性电荷、阴性电荷的 LEH,利用驻极体技术对 LEH 的驻极体特性进行主动调整,改善其表面电荷特性,从而改善血液流变学性能,且能够有效地抑制体外血栓的形成。

2.2.3 脂质膜表面修饰 Phillips^[17]和 Awasthi 等^[18]用 PEG 对 LEH 进行脂质膜表面化学修饰,主要作用有:参与构成膜,使囊泡壁稳固;增加脂质体内 Hb 的浓度来提高携氧能力;增加 LEH 的亲水性,提高存贮稳定性;减少网状内皮系统的摄取,增加立体位阻,延长其循环半衰期。Phillips 等^[17]在家兔试验中发现,PEG 修饰的 LEH 循环半衰期达 65 h,3 倍于无 PEG 修饰的 LEH。而且, Awasthi 等^[18]研究表明,PEG-5 000 比 PEG-1 900 在延长 LEH 循环半衰期和改变组织生物分布的作用更显著。在 PEG 修饰的 LEH 的稳定性机制和包裹率研究上, Arifin 等^[19]报道,在 PEG 分子量较大(2 000 Da)的 PEG-LEH 中,通过 PEG 与脂质共轭形成较高的双分子层刚性结构和自发弯曲的作用来形成稳定的脂质体分散相,可获得较高的包裹率 27%~36% (82~109 mg Hb/mL);而 PEG 分子量较小(550 Da)的 PEG-LEH 主要是依靠热力学弯曲波动作用机制来稳定分散相,因而, Hb 能从脂质双分子层泄漏,包裹率较低,仅为 1%~10% (3~32 mg Hb/mL)。此外, Sakai 等^[20]的实验表明,用 PEG 修饰和氮气脱氧制备的 LEH 能增加其存贮的稳定性,在室温条件下能保存 1 年以上。

2.3 LEH 的协同包裹 为提高 LEH 的稳定性,增加携氧量,调节释氧能力,延长其循环半衰期,人们在包裹 Hb 时,也同时包裹各种协同物或 Hb 的偶联物,主要有:①包裹抗氧化酶系统如触酶、谷胱甘肽、高铁 Hb 还原酶、超氧化物歧化酶^[21]、过氧化氢酶^[22]等,消除氧自由基及过氧化物,减少高价铁和血红素的析出,抑制高铁血红蛋白的形成,从而提高 LEH 的稳定性和增加携氧量。②包裹 Hb 变构调节剂如 2,3-DPG、5'-磷酸吡哆醛 (PLP)、六磷酸肌醇 (HP)等,使 LEH 发挥携氧和释氧功能。③包裹碳酸酐酶,使 LEH 具有调节血浆中 P_{CO_2} 的能力。④包裹神经节苷脂 GM₁,避免网状内皮系统作用,延长循环半衰期。⑤与血清白蛋白偶联^[23],血清白蛋

白有支持脂质膜和延长循环半衰期作用。

2.4 LEH 制备工艺条件的影响

2.4.1 LEH 制备方法的选择 不同的制备方法对 LEH 的质量有影响。一是影响脂质体形态粒径。有文献报道,LEH 的相对分子质量应在 128 000 或更高,主要避免肾脏滤过、免疫原性和高黏度^[13],但有上限,如当大于 700~900 nm 可导致肺栓塞等微循环栓塞。早期的 LEH 粒径较大,易被网状内皮细胞系统的巨噬细胞吞噬清除,半衰期短。目前,不同方法制得的脂质体有单室脂质体、多室脂质体、泡囊等形态,脂质体的粒径均匀度也不一致,采用微射流法和挤压法制得的 LEH 多为单室脂质体,LEH 的粒径也较均匀。微射流法制得的 LEH 粒径一般被限制在 200~500 nm 之间,接近于正常人红细胞的直径,而 Arifin 等^[24]考察挤压法制备的 LEH 稳定性时,认为通过 200 nm 和 100 nm 膜孔制得的 LEH 有较合适的 Hb 浓度和较好的机械稳定性。二是影响包裹率。不同制备方法对包裹率的影响不同,冻干技术的引入可提高 LEH 的包裹率。此外,如果制得 LEH 平均粒径较大的方法有可能得到较高的包裹率,例如,挤压法制得的 LEH 有较高的包裹率^[7]。三是影响 LEH 的稳定性和循环半衰期。如使用 PEG 化法,提高 LEH 的稳定性和延长其循环半衰期。

2.4.2 温度的控制 温度是影响脂质体氧化的重要因素,随着温度的升高,氧化反应速率加快,故要获得较理想的 LEH,就需要控制各环节在适宜的温度。如,在旋转蒸发时温度要严格控制在磷脂的相变温度上,但要防止温度过高导致磷脂化学分解;冰冻保存可延缓脂质氧化,提高脂质体在贮存期的稳定性,降低泄漏率。此外,温度能影响 Hb 性质和包裹率,如低温离心(4℃),可防止 Hb 的氧化和变性;控制脂质膜与 Hb 溶液水化时温度(如 35℃),可提高包裹率。

2.4.3 缓冲溶液的选择 脂质体的 pH 值、离子强度、不同的缓冲体系对膜材的水解速率有不同的影响,同时对脂质体的形态、粒径和粒度分布也有影响。Arifin 等^[7,19]用挤压法制备 LEH 时,对 pH 值相同,离子强度不同的两种缓冲溶液做了研究,结果表明,在磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)中制得的 LEH 有较低的包裹率、Hb 浓度和较高的血氧亲和力(P_{50})、希尔系数,它们分别为 62.38%、187.14 mg Hb/mL 和 27.25 mmHg。而在磷酸盐缓冲液(PB)中则有较高的包裹率、Hb 浓度和较低的血氧亲和力(P_{50})、希尔系数,其分别为 69.98%、209.94 mg Hb/mL 和 23.04 mmHg。

3 展望

LEH作为人工血红蛋白制品,由于属于细胞型Hb,具有双分子磷脂膜结构,无抗原性,无病毒;阻止Hb的解聚和从肾脏的滤过,增加Hb的循环时间,保证气体交换的迅速完成,降低肾毒性,延缓胶体渗透压;在制备和存储时有足够的稳定性;从而成为人工红细胞最为活跃和最有潜力的研究方向,在未来的临床输血治疗,战场救护,重大自然灾害急救等方面均将发挥重要的作用,具有广阔的发展前景。但LEH并不是真正的血液,不具备红细胞复杂的功能,体内循环时间相对较短,存在一定的副作用,如磷脂易过氧化和对网状内皮系统潜在影响等。此外,在制备工艺研究上,有待进一步寻求更好的工艺,以提高其包裹率和稳定性,延长循环半衰期,并优化工艺条件,以适应大规模生产。目前,在LEH生物效应及其机制的研究上,国外报道较多并取得了很大的进展,国内研究较少,说明我国在这一方面尚有一定的差距,有待于借鉴国外先进的研究方法和科研成果以促进国内LEH研究水平的提高。

参考文献:

[1] Donat RS, Roman K. Artificial O₂ Carriers Status in 2005 [J]. *Current Pharmaceutical Design* 2005, 11: 4099.

[2] Kawaguchi AT, Fukumoto D, Haida M, *et al*. Liposome encapsulated hemoglobin reduces the size of cerebral infarction in the rat evaluation with photochemically induced thrombosis of the middle cerebral artery [J]. *Stroke* 2007, 38(5): 1626

[3] Sakai H, Tsuchida E, Horinouchi H, *et al*. One-year observation of Wistar rats after intravenous infusion of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) [J]. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2007, 35(1): 81

[4] Pöök JA, Tromp AE, Conaldo C, *et al*. Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue [J]. *Crit Care Med* 2007, 35(3): 899.

[5] Rudolph AS, Sulipizio A, Heible P, *et al*. Liposome encapsulation attenuated hemoglobin-induced vasoconstriction in rabbit arterial segments [J]. *J Appl Physiol* 1997, 82: 1826

[6] Sou K, Naito Y, Endo T, *et al*. Effective encapsulation of protein into size controlled phospholipid vesicles using freeze thawing and extrusion [J]. *Biotechnol Prog* 2003, 19(5): 1547

[7] Arifin DR, Palmer AF. Determination of size distribution and encapsulation efficiency of liposome encapsulated hemoglobin in blood substitutes using asymmetric flow field-flow fractionation coupled with multi-angle static light scattering [J]. *Biotechnol Prog* 2003, 19(6): 1798

[8] 李立新,樊晶,王学谦. 脂质体包裹人血红蛋白微囊的制备及其对大鼠血液的影响 [J]. *天津医药*, 2004, 32(2): 101.

[9] Shew RL, Deaner DW. A novel method for encapsulation of macromolecules in liposomes [J]. *Biochim Biophys Acta* 1985, 816

(1): 1

[10] Brand IM, Gregoriadis G. Entrapment of hemoglobin into liposomes by the dehydration-rehydration method: vesicle characterization and in vivo behaviour [J]. *Biochim Biophys Acta* 1994, 1196(1): 65.

[11] Sakai H, Masada Y, Takeoka S, *et al*. Characteristics of bovine hemoglobin as a potential source of hemoglobin-vesicles for an artificial oxygen carrier [J]. *JBiochem* (Tokyo), 2002, 131(4): 611

[12] Johnstone JE, McLaren LA, Doucet J, *et al*. In vitro studies regarding the feasibility of bovine erythrocyte xenotransfusion [J]. *Xenotransplantation* 2004, 11: 11

[13] Greenburg GA, Kim HW. Civilian uses of hemoglobin-based oxygen carriers [J]. *Artif Organs* 2004, 28(9): 795

[14] Sakai H, Takeoka S, Wettstein R, *et al*. Systemic and microvascular responses to hemorrhagic shock and resuscitation with Hb vesicles [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 283: H191.

[15] Gomicki A. The influence of oxidative stress on microviscosity of hemoglobin containing liposomes [J]. *Ger Physiol Biophys* 2003, 22(1): 121

[16] 邓百明,史向阳,邓劲光,等. 驻极体技术改进的脂质体包封血红蛋白及其对体外血液流变学性能的影响 [J]. *生物医学工程学杂志*, 2000, 17(1): 29

[17] Phillips WT, Klipper RW, Awasthi AS, *et al*. Polyethylene glycol modified liposome encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute [J]. *JPET*, 1999, 288: 665.

[18] Awasthi VD, Garcia D, Klipper R, *et al*. Neutral and anionic liposome encapsulated hemoglobin: effect of postinserted poly(ethylene glycol)-distearylphosphatidylethanolamine on distribution and circulation kinetics [J]. *J Pharmaco Exp Ther* 2004, 309(1): 241

[19] Arifin DR, Palmer AF. Physical properties and stability mechanisms of poly(ethylene glycol) conjugated liposome encapsulated hemoglobin dispersions [J]. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 2005, 33(2): 137

[20] Sakai H, Tamiyama KI, Sou K, *et al*. Poly(ethylene glycol)-conjugation and deoxygenation enable long-term preservation of hemoglobin-vesicles as oxygen carriers in a liquid state [J]. *Bir conjug-Chem*, 2000, 11(3): 425.

[21] Nobuko SE, Fumiyama H, Yoshitaka O, *et al*. Liposome encapsulated superoxide dismutase suppresses liposome mediated augmentation of TNF- α production from peripheral blood leukocytes [J]. *Life Sciences* 2001, 69, 2007

[22] Takeoka S, Teramura Y, Tsuchida E. Effect of Hb-encapsulation with vesicles on H₂O₂ reaction and lipid peroxidation [J]. *Bir conjug-Chem*, 2002, 13(6): 1302.

[23] Li S, Nickels J, Palmer AF. Liposome encapsulate actin-hemoglobin (LEA-Hb) artificial blood substitutes [J]. *Biomaterials* 2005, 26(17): 3759

[24] Arifin DR, Palmer AF. Stability of liposome encapsulated hemoglobin dispersions [J]. *Artif Cells Blood Subst Immobil Biotechnol* 2005, 33(2): 113