·药剂学进展·

五种新型脂质体的研究概况

第二军医大学药学院（上海 200433）　束宇惊　周全

脂质体是由磷脂双分子层定向排列成的几毫微米至几微米的超细粒子。自从60年代问世后，70年代初便开始作为药物载体应用。最成功的便是1977年国外有人用脂质体包封抗肝利什曼原虫药物锑剂，结果药物在肝脏浓集200～700倍，治疗指数提高35～40倍[1]。但随着脂质体应用、研究的深入，人们发现一般脂质体作为药物载体，其靶向分布并不理想，贮存中稳定性也较差。近几年来为提高其靶向性和疗效，逐步开发、利用一些新型脂质体。现将温度敏感脂质体、pH敏感脂质体、免疫脂质体、聚合膜脂质体、前体脂质体等新型脂质体的研究概况介绍如下：

一、温度敏感脂质体

Yatvin[2]创造出的温度敏感脂质体，是将不同比例的膜材，如二棕榈酸磷脂(DPPC)和二硬脂酸磷脂(DSPC)混合，从而得到不同的由凝胶向液晶转化的膜相变温度（从41℃到54℃）。当脂质体达液晶态的相变温度时，在某种血浆成分主要是脂蛋白作用下，迅速完全地释放药物，使血管内外的药物浓度趋于平衡。据此，人们提出可将肿瘤或区域性感染灶局部升温，同时结合使用温度敏感脂质体进行治疗的方法。根据荷瘤肝脏的血流分布[3]，即肝脏肿瘤和正常肝组织分别由肝动脉和门静脉提供血源的原理，顾学裘等人[4~5]通过实验研究肝动脉注射阿霉素温度敏感脂质体（LADM）后的情况，得出LADM经过改进的REV法制备后粒径均匀，且室温下5周内不发生分层，也几乎不发生泄漏的体外稳定性。同时验证其相变温度Tm为41℃时，其包封药物的释放百分比最大。最后还用动物实验表明用高频发生器装置加热整个肝脏后，肿瘤中的阿霉素含量至少8h内无任何衰减，而阿霉素应该以同样速度从正常组织和肿瘤中衰减。该“异常”现象说明另有药物进入肿瘤补充了衰减的损失，那只能是滞留在肝动脉中的温度敏感脂质体释放的药物。同时该方法减少了网状内皮系统对脂质体的破坏，延长了作用时间。日本有人[6]利用局部升温技术和包含博莱霉素的温度敏感脂质体治疗小鼠AH—66腹水癌的淋巴节转移，取得了明显的抑制肿瘤生长和扩散及延长小鼠存活时间的效果。为了进一步提高药物向靶细胞的释放，Sullivan等人[7]制备了用 ^3H—油酸标记的温度敏感的免疫脂质体，由于其表面带有抗体，可以特异地结合在靶向细胞表面，提高了疗效。由此可见，利用病变部位温度变化而影响脂质体膜的通透性，可引起选择性地释放药物。

二、pH敏感脂质体（又称“酸敏脂质体”）

尽管使用温度敏感脂质体和局部升温技术可以较好地释放药物并实施体外控释，但它也存在局限性，即肿瘤组织虽比周围正常组织具略高一些的温度，但加热时间过长也可造成正常组织的损伤。因此，Yatvin等人[8]又发明出pH敏感脂质体(酸敏脂质体)他们使用二棕榈酸磷脂(DPPC)、十七烷酸

磷脂(DHPC)等作为酸敏脂质体的膜材，用荧光标记——羧甲基荧光素(CF)证明药物释放量在pH6.5和pH6.0时，分别3倍和5倍于pH7.4时的释放量。因肿瘤细胞一般具有比周围正常细胞低的pH值，同时实验表明可以依靠服用乳糖或吸入CO_2来降低肿瘤周围间质液的pH值，从而使酸敏脂质体更容易释放其内容药物。为证明药物进入细胞后的分布情况，刘启光等人[9]利用由二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)：胆固醇(CHOL)：油酸(OA)以4：4：3比例组成的酸敏脂质体将荧光染料导入NIH3T3细胞及人胚肺成纤维细胞。发现脂质体进入细胞后，在微酸环境中破裂将荧光物质均匀分布到细胞质中，同时验证了一定浓度的膜融合剂——聚乙二醇可增加荧光物质进入细胞的量。同时酸敏脂质体因其特性应用于基因工程：Hughes等人[10]利用它将含有卡那霉素抗性基因的DNA转入烟草原生质体。这种转运是否成功可以通过植株的自传粉和交叉传粉转移到下一代植株，并成为其显性特征。还有人[11]利用酸敏的免疫脂质体运转质粒DNA进入靶细胞，试验表明没有加以抗体修饰的酸敏脂质体转运质粒DNA的活性受到大量非特异性DNA的抑制。而当某些DNA吸附于酸敏的免疫脂质体上，则其可表现出游离DNA所不具备的活性。酸敏脂质体与温度敏感脂质体相比可避免组织损伤，但由于需调节肿瘤细胞周围的pH值，实际应用中有一定难度，这类问题只能留待日后解决。

三、免疫脂质体

由于脂质体组分可以任意选择和调整，所以可被看作是一类理想的抗原、抗体乃至各种细胞活化因子的携带、运输、转移的载体。苏东辉等人[12]通过研究脂质体对低免疫原性的革兰氏阴性细菌脂多糖(LPS)的佐剂活性，指出脂质体对LPS的免疫增强作用来源于将其类脂A部分的疏水基团部分嵌入脂质体膜，而将其抗原决定簇——亲水的多糖链暴露在表面水介质中，从而利于小鼠细胞对抗原的识别和处理，引起比游离LPS诱发强得多的免疫应答。国内还有人[13]采用冬虫夏草脂质体，利用巨噬细胞吞噬与融合作用，发挥激活功效，从而增强人体对慢性乙肝的免疫功能。经抗体修饰的脂质体甚至可以抑制病毒RNA的复制[14]，其作用原理是将羟基核糖核酸接到病毒RNA的5′——末端，使其序列发生错误，影响病毒RNA复制，最终干涉扰蛋白质合成。免疫脂质体还可应用于细胞内的寄生菌的诊断及接种疫苗，Franz等人[16]制备荧光标记(钙黄绿素)的内含结核菌素的敏感脂质体，分别与正常人和患结核病人的血清反应，根据脂质体被溶解的多少来判别是否染病。同时接种过该种脂质体的猪对结核杆菌产生了细胞免疫。王述姐等[16]利用旋毛虫幼虫的单克隆抗体修饰的脂质体，使离体孵育的的幼虫摄入脂质体的量增加843%，而且延缓其代谢速度，这就提供了免疫脂质体载上药物治疗胞内寄生虫的可行性。单克隆抗体单独用于癌症治疗效果不佳，但由于其特异性高，生物活性稳定，易于批量生产，故此可用来赋予脂质体主动向靶性。如下图所示[17]，有人利用对C3H/He小鼠乳癌的单克隆抗体修饰的含细胞亲和性和脂溶性高的放线菌素D脂质体进行动物实验，表明治愈剂量只到单独应用放线菌素D的有效量的1/10。上面提到可以使用抗原作为免疫应答的激活剂，但效率毕竟较低。因而人们常用胞壁二酰肽(MDP)和巨噬细胞激活因子(MAF)作为免疫激活剂，但游离的MDP和MAF效果不好，故而想到用脂质体包封它们进行转运。Koff等[18]利用MAF脂质体活化巨噬细胞，可以选择性地杀死被疱疹病毒感染的细胞而不损伤正常细胞。同样，免疫脂质体可以应用于肿瘤治疗，国外有人[16]利用单克隆抗体修饰的包含巨噬细胞活化因子和r——干扰素的脂质

体对人体 A——375 黑瘤进行治疗，取得了较为满意的结果。由此可见，免疫脂质体可以提高人体的免疫功能，加速免疫应答，增强脂质体结合靶细胞释放药物的能力。

四、聚合膜脂质体

人们发现用常规方法制得的脂质体易于聚集和融合，有效期较短。因此提出了三种方法来防止脂质体粒子的融合：(1) 在脂质体双分子膜上加入第二种表面活性剂，而其不能单独形成脂质体（如胆固醇）[20]。(2) 用带电荷的化学基团修饰膜的表面(如β——氨基半乳糖)[21]，因同种电荷相斥可增加其稳定性。(3) 通过共价键将构成膜的类脂分子连接起来，即产生出聚合膜脂质体。目前采用含丁二炔基团的卵磷脂来制备聚合膜脂质体，Johnston[22] 等人研究表明当含有丁二炔基团的磷脂在水中分散成多室或大单室脂质体时，易于发生聚合，但如果形成小单室脂质体就不能发生聚合反应。Tundo 等人[25] 用带乙烯基 C—C 双键作为部分极性端的表面活性剂制成脂质体，60℃加偶氮异丁晴处理，脂质体只发生60%双键聚合，而用紫外线照射可使 100% 双键聚合。由于偶氮异丁晴不能穿过双分子膜，故聚合反应只能发生在脂质体外层。该方法可选择性地聚合脂质体粒子的外表面。Juliano等人[24]研究了巨噬细胞对聚合膜脂质体的吞噬作用。37℃时，其吞噬速度是非聚合膜脂质体的 3 倍。其进入细胞的主要途径依靠脂质体吸附到细胞表面及激活细胞的内吞功能。4℃时，巨噬细胞对聚合膜脂质体的吸收速度也比非聚合膜脂质体快，这时巨噬细胞的主动吞噬功能已被阻断，说明聚合膜脂质体更易吸附于细胞表面。因为聚合膜脂质体为内容物提供了一个相对稳定的环境，有可能用来克服体内给药时，生物膜溶解因子对膜的溶解作用。日本已有人[25]申请该项专利，即将 Fe—卟啉包入聚合膜脂质体中作为体内运输氧气的载体，可见聚合膜脂质体应用前景是光明的。

五、前体脂质体

对肿瘤进行化疗时，人们发现由于抗癌药物的毒副作用较大，容易引起病人的某些不良反应，如骨髓抑制、脱发、消瘦等等。由此产生了将药物包封于脂质体的想法。Eric 等人[26]研究了阿霉素脂质体，其心脏毒性比游离药物降低50～70%，抑癌活性却增强了许多。动物实验表明阿霉素脂质体注射 3 次后可找到接近痊愈的动物，而游离药物可致明显毒性。能不能再将毒性减小呢？于是产生出前体质脂体。顾学裘等人[27] 制备了环磷酰胺(CTX)多相脂质体。因 CTX 是一种潜化型氮芥类药物，体外无抗肿瘤活性，进入体内经肝微粒体酶代谢后才有效。他们将 CTX与免疫多糖(人参、冬虫夏草、猪苓等）合用，进一步提高疗效，同时采用重建型 CTX 脂质体的制备新工艺[28]，提高了包封率，有利于长期贮存。童平等人[29] 将无环岛苷(ACY)与月桂酸酰氯和棕榈酰氯反应，生成亲脂性前体药无环鸟月桂酸脂(C_{12}—ACV)和无环鸟苷棕榈酸脂(C_{16}—ACV)，分别提高包封率至 95.6%和 97.1%。4℃透析 60h 后，一半以上的 ACV 从脂质体渗漏，而 C_{12}—ACV 和 C_{16}—ACV的滞留率分别为 70% 和 80%，体外抗疱疹病毒试验表明前体药物进入细胞增加，从而使抗病毒能力增大。侯新朴等人[30] 制备环胞苷二棕榈酸脂(DPC)前体脂质体，因环胞苷接上了两条长疏水链，亲脂性大为增加。同时受酶的作用可以缓慢水解释放环胞苷，一方面避免了大量环苷聚集，大部分在未发挥药效前就被脱氨破坏；另一方面又起到药物“贮库”作用，可以延长环胞苷作用的有效时间。因此，前体药物脂质体在抗肿瘤作用方面越来越受到重视，很可能成为化疗中主要使用的手段。

除上述 5种类型的脂质体外，还有人[31] 研究制备磁性脂质体，即脂质体包裹极微细

的磁铁矿粉(Fe_3O_4)参与药物释放的可行性，证明了动脉注射该种脂质体可提高药物在Yoshida肉瘤中的浓度，尽管未达有效治疗浓度 但也预示着一条新路。刘宏志等人[32]制备了含β—胡萝卜素或全反视黄醇的光敏脂质体，光照后可发生不可逆光反应，从而影响膜的流动性，增加其通透性。为了提高脂质体对药物的包封率，解决渗漏，相分离等稳定性问题，林东海等人[33]采用冷冻干燥法制备重建型脂质体，从而延长了脂质体的贮存时间。

综上所述，近年来发展起来的几种新型脂质体分别在原有脂质体存在的问题如包封率、稳定性和靶向分布等方面有所改进。今后随着科学技术的发展和脂质体生产工艺、研究的深入，相信这些问题都能有可能被解决，将会创造出更多的新型脂质体。

参考文献

[1] Caoft SH. Pharm. Int.1986, 7(9): 229
[2] Yatvin et al. Science, 1978, 202: 1290～1292
[3] Lien et al. Surgery, 1970, 68: 334
[4] 邹一愚等. 药学学报,1991, 26(8): 622
[5] 顾学裘等. 药学学报,1991, 26(9): 705
[6] CA. 105:11903 j
[7] Sullivan et al. Proc. Natl. Acab. Sci. U. S.A. 1986, 83(116)
[8] Yatvin et al. Science, 1980, 210:1253
[9] 刘启光等.生物化学与生物物理进展. 1989, 16(3): 218
[10] Hughes et al. Plant Cell, Tissue Organ Cult, 1990, 22 (2): 135
[11] Huang et al. Biochim. Biophys. Res. Commun. 1987, 147(3):980
[12] 苏东辉等. 上海免疫学杂志,1985, 6(1):14
[13] 程琪琳等. 上海免疫学杂志,1989, 9(3):143
[14] Leohetti et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1990, 87 (7)2448
[15] CA. 111: 74384k
[16] 王述矩等.北京医科大学学报, 1990,22(3):165
[17] 蒋伯诚等.药学通报, 1988, 23 (2):93
[18] Koff et al. Science, 1984, 224:1007
[19] CA. 107:121076r
[20] Larrabee et al. Biochemistry, 1979, 18: 3321
[21] Wu PS et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 1981, 78:6211
[22] Johnston et al. Biochim. Biophys. Acta. 1980, 57:602
[23] Tundo et al. J. Am. Chem. Soc. 1982, 104: 456
[24] RL Juliano. Biochim. Biophys. Acta. 1985, 42:812
[25] CA. 102: 148998b
[26] Eric et al. Molecular basis of Cancer. PartB. Alan R Liss, Inc, 1985, 301
[27] 顾学裘等. 沈阳药学院学报,1990, 7(4):291
[28] 高晓彦等. 沈阳药学院学报,1987,4(3):157
[29] 童平等. 药学学报,1991, 27(1):15
[30] 侯新朴等. 中国药学杂志,1991,26(11):661
[31] Kiwada et al. Chem. Pharm. Bull. 1986, 34(10):4253
[32] 刘宏志等. 生物化学与生物物理学报,1986, 18(4): 358
[33] 林东海等. 中国药学杂志,1990, 25(2):71

·作者声明·

本刊1993年第3期“超滤法用于复方当归注射液制备工艺的改革”一文，作者应为：沈阳军区总医院药局 宋洪涛、郭涛、戴京美、王秀芬、吴宇航；沈阳军区药检所 韩家荣。特此声明！