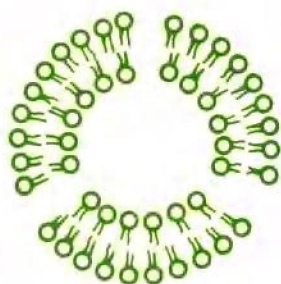


脂质体制备及其在 生物医学中的应用



编著 张灵芝

北京医科大学 联合出版社
中国协和医科大学

脂质体制备及其在 生物医学中的应用

张灵芝 编著

参加编写人员

常英姿 刘乃奎 庞永政

欧和生 凌世长 李 夏

唐朝枢 汤 健 苏静怡

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

凡在本社出版图书的作者，均须向本社提供书稿，以便本社进行审核，合格后方可出版。

(京)新登字 147 号

图书在版编目(CIP)数据

脂质体制备及其在生物学中的应用/张灵芝编著.
-北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,
1998.5

ISBN 7-81034-813-2

I.脂… II.张… III.①药物-载体,脂质体-制备②药
物-载体,脂质体-应用-生物学 IV.R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 03179 号

ZHIZHITI ZHIBEI JIQI ZAI SHENGWU YIXUE ZHONGDE
YINGYONG

责任编辑:谢琳 李正香

责任印制:张京生

北京医科大学
中国协和医科大学

联合出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

泰山新华印刷厂莱芜厂印刷 新华书店经销

※ ※ ※

开本:850×1168 1/32 印张:7.125 字数:185 千字

1998 年 4 月第 1 版 1998 年 4 月山东第 1 次印刷 印数:1-3000 册

定价:14.00 元

序 言

脂质体(liposomes)是磷脂分散在水中时形成的脂质双分子层,其内部为水相的闭合囊泡。由于其结构类似生物膜,故又称人工生物膜(artificial biological membrane)。脂质体自1965年被英国Bangham发现并首创制备后,它作为生物膜的模型和药物载体被广泛用于实验研究,并向临床应用发展。根据实验和临床应用的需 要,可以改变脂质体的脂质成分提高脂质体的靶向性。脂质体作为抗肿瘤药物和抗菌药物载体已试用于临床并取得了较满意的疗效。当前分子生物学正在飞速发展,基因治疗受到高度重视,美国重组DNA咨询委员会批准将脂质体作为基因载体用于临床基因治疗的方案。因此,脂质体将是一种颇有价值的基因转移手段和方法。三十年来,国外对脂质体的研究一直在不断深入地进行,出版了许多有关脂质体的参考书。近年来,国内对脂质体的研究也越来越重视,但是缺乏参考书,尤其有关制备的专著。

本书的主编张灵芝副研究员,自1990年开始从事脂质体作为药物载体导向治疗心血管疾病的研究,发表论文30余篇,连续获得国家自然科学基金资助。作者复习了大量文献,归纳了所在单位(北京医科大学心血管基础研究所)积累的资料和经验整理成册。系统介绍了脂质体的概念,脂质体常用的制备方法,脂质体纯化、消毒和储存方法,脂质体稳定性,脂质体靶向性,脂质体作为药物载体和基因载体在医学领域中的应用。最后录入该所部分研究论文。每章结尾均引用主要参考文献,使读者了解脂质体的最新研究方向。该书可供从事生理、药理、病理生理以及分子生物专业的科研工作者参考应用,也可以作为研究生、进修生以及大学生的参考书。

张灵芝作为青年科技工作者,不计报酬和名利,在繁重的科研和教学任务之余,为编写这本书付出了大量心血和劳动,其精神难能可贵。希望本书对从事有关工作的同道有一些帮助,殷切希望得到读者、专家和老师们的批评指正。

苏静怡 唐朝枢

1997年3月

略 语 表

AAV	adeno-associated virus	腺病毒相关病毒
AM	ammonium molybdate	钼酸铵
α -T	α -tocopherol	生育酚
BHT	butylated hydroxytoluene	丁酸羟甲醛
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CF	carboxyfluorescein	羧基荧光素
CHEMS	cholesteryl hemisuccinate	半琥珀酸胆固醇
Chol	cholesterol	胆固醇
CL	cardiolipin	心磷脂
CMC	critical micelle concentrtrion	临界微团浓度
CMP	capillary melting points	毛细熔点
DDAB	dimethy(dioctadecyl) ammonium bromide	二甲基溴铵
DMPC	dimyristoyl phosphatidyl choline	双肉豆蔻磷脂酰胆碱
DMPG	dimyristoyl phosphatidyl glycerol	双肉豆蔻磷脂酰甘油
DMRIE	N-[1-(2,3-ditetradecyloxy)propyl]-N,N-dimet hyl-N-hydroxyethylammonium bromide	
DOC	sodium deoxycholate	脱氧胆酸钠
DOPC	dioleoyl phosphatidylcholine	二油酰磷脂酰胆碱
DPPA	dipalmitoyl phosphatidic acid	二棕榈酰磷脂酸
DPPC	dipalmitoyl phosphatidyl choline	二棕榈酰磷脂酰胆碱
DPPG	dipalmitoyl phosphatidyl glycerol	二棕榈酰磷脂酰甘油
DRV	dried-reconstituted vesicle	干燥重组囊泡
DCP	dicetylphosphate	双鲸蜡磷脂酸
DSPC	distearoyl phosphatidylcholine	二硬脂酰磷脂酰胆碱

DTPA	diethylenetriaminepentaacetic acid	二乙烯三胺五乙酸
DTT	dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	乙二胺四乙酸
EYL	egg yolk lecithin	蛋黄卵磷脂
FPL	french pressed liposomes	French 压力脂质体
FTS	freeze-thaw sonication	冻融超声
GM ₁	monosialganglioside	单神经节苷脂
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony - stimulating factor	颗粒-巨噬细胞集落刺激因子
HDL	high density lipoprotein	高密度脂蛋白
IL	interleukin	干扰素
IUV	intermediate-sized unilamellar vesicle	中间大小囊泡
LDL	low density lipoprotein	低密度脂蛋白
LPC	lyso-phosphatidyl choline	溶血磷脂酰胆碱
LTR	long terminal repeat	长末端重复片断
LUV	large unilamellar vesicles	大单层脂质体
MDP	muramyl depeptide	细胞壁二肽
METT	marked endothermic transition temperature	内转换温度
MLV	multilamellar vesicles	多层脂质体
NHSP	N - hydroxysuccinimide ester of palmitic acid	棕榈酸羟基琥珀酰亚胺酯
OA	oleic acid	油酸
ODN	oligodeoxynucleotide	寡脱氧核苷酸
PA	phosphatidic acid	磷脂酸
PAC	gamma-ray perturbed angular correlation	γ -射线扰动角度相关
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸缓冲液
PC	phosphatidylcholine	磷脂酰胆碱
PE	phosphatidylethanolamine	磷脂酰乙醇胺
PEG	poly(ethylene glycol)	聚乙二醇
PG	phosphatidylglycerol	磷脂酰甘油

PHC	N-palmitoyl homocysteine	N-棕榈酰同型半胱氨酸
PI	phosphatidylinositol ₁	磷脂酰肌醇
PL	phospholipid	磷脂
PS	phosphatidylserine	磷脂酰丝氨酸
PTA	phosphotungstic acid	磷钨酸
REV	reverse evaporation vesicles	反相蒸发脂质体
RSA	rous sarcoma virus	劳斯肉瘤病毒
SA	stearylamine	硬脂酰胺
SMPB	N-succinimidyl(- 4 - 2- <i>p</i> -maleimidophenyl butylate)	
SPDP	N-succinimidyl pyridyl dithio propionate	
SPH(SM)	sphingomyelin	鞘磷脂
SUV	small unilamellar vesicles	小单层脂质体
Tc	transition temperature	相变温度
TEA	triethylamine	三乙胺
Tk	thymidine kinase	胸腺素激酶
VSMC	vascular smooth muscle cell	血管平滑肌细胞

目 录

略语表	(1)
1 章 脂质体概述	(1)
1.1 脂质体的定义	(1)
1.2 脂质体的脂质组成及其性质	(2)
1.2.1 脂质组成	(2)
1.2.2 脂质体的性质	(7)
1.3 脂质体的分类	(11)
1.3.1 根据脂质体的大小及双层数目	(11)
1.3.2 根据脂质体的表面电荷	(12)
1.3.3 根据脂质体的制备方法	(12)
1.3.4 根据脂质体脂膜结构性能	(12)
参考文献	(13)
2 章 脂质体制备	(15)
2.1 前言	(15)
2.2 脂质的处理	(16)
2.2.1 储存	(16)
2.2.2 测定	(17)
2.3 脂质体的制备方法	(18)
2.3.1 机械分散法	(18)
2.3.2 钙融合法	(26)
2.3.3 有机溶剂分散法	(28)
2.3.4 反相蒸发法	(31)
2.3.5 去污剂分散法	(32)
2.3.6 气泡方法	(39)

2.3.7	配体脂质体的制备	(40)
2.4	脂质体制备方法的比较	(46)
2.5	去除脂质体中残余有机溶剂和去污剂	(48)
2.5.1	透析	(48)
2.5.2	凝胶过滤	(49)
2.6	去除非包裹物质的方法	(51)
2.6.1	柱层析分离	(52)
2.6.2	透析	(52)
2.6.3	离心	(52)
2.6.4	微型柱离心	(53)
2.6.5	鱼精蛋白集聚	(53)
2.7	脂质体的消毒方法	(54)
2.7.1	高压加热	(54)
2.7.2	滤过消毒	(54)
2.7.3	γ 射线消毒	(55)
2.7.4	制备过程消毒	(55)
2.8	测定脂质体大小的方法	(55)
2.8.1	显微镜法	(56)
2.8.2	电子显微镜法	(56)
2.8.3	激光散射法	(57)
2.8.4	凝胶过滤	(57)
2.8.5	浊度/光散射测定	(57)
2.9	脂质体包封率的测定	(58)
2.9.1	重量包封率	(58)
2.9.2	容积包封率	(59)
2.9.3	药物包封比率	(59)
2.9.4	测定脂质体内容物的方法	(59)
2.9.5	影响脂质体包封率的因素	(60)
2.10	脂质体的储存	(61)

2.10.1 实验室用脂质体	(61)
2.10.2 临床用脂质体	(61)
2.10.3 冰冻引起的损害	(62)
2.10.4 冰冻干燥	(62)
参考文献	(63)
3 章 脂质体稳定性研究	(67)
3.1 药物脂质体的稳定性	(67)
3.1.1 药物的性质	(67)
3.1.2 磷脂和胆固醇的稳定性	(67)
3.2 影响脂质体稳定性的因素	(68)
3.2.1 生物体液	(68)
3.2.2 光和金属污染	(68)
3.2.3 蛋白质的作用	(68)
3.2.4 多聚磷脂的作用	(69)
3.2.5 非离子表面活性剂	(69)
3.2.6 醇类的作用	(69)
3.3 克服脂质体不稳定的方法	(69)
3.3.1 防止化学变性	(70)
3.3.2 防止物理变性	(70)
3.4 脂质体稳定性的研究方法	(70)
3.4.1 荧光染料特征	(71)
3.4.2 测定脂质体的稳定性	(73)
参考文献	(75)
4 章 脂质体的靶向性	(77)
4.1 靶向性的概念	(77)
4.2 脂质体作为药物载体的特点	(78)
4.3 实现脂质体靶向治疗的步骤	(79)
4.4 脂质体治疗的限制	(79)
4.5 靶向类型	(81)

4.5.1	被动靶向性·····	(81)
4.5.2	主动靶向性·····	(83)
4.5.3	特殊性能脂质体的靶向性·····	(84)
4.6	脂质体与细胞的相互作用·····	(86)
4.6.1	接触释放·····	(87)
4.6.2	吸附·····	(87)
4.6.3	内吞/吞噬·····	(87)
4.6.4	融合·····	(88)
4.6.5	脂质交换·····	(88)
参考文献 ·····		(89)
5章	脂质体及其携载药物的动力学 ·····	(92)
5.1	脂质体药物动力学的测定·····	(92)
5.2	脂质体在组织中释放的药物动力学·····	(94)
5.3	脂质体组分对药物动力学的影响·····	(95)
5.4	给药途径对脂质体动力学的影响·····	(96)
5.4.1	静脉注射·····	(96)
5.4.2	口服给药·····	(98)
5.4.3	局部给药·····	(98)
5.5	制备液闪测定标本·····	(102)
5.5.1	四价氢氧化铵溶解组织·····	(102)
5.5.2	湿氧化·····	(102)
参考文献 ·····		(103)
6章	脂质体作为药物载体的应用 ·····	(107)
6.1	肿瘤·····	(107)
6.2	感染性疾病·····	(108)
6.3	免疫佐剂·····	(111)
6.4	心血管疾病·····	(112)
6.5	皮肤疾病·····	(113)
6.5.1	治疗皮肤疾病传统药物存在的问题·····	(113)

6.5.2	脂质体在皮肤应用的优越性	(114)
6.5.3	脂质体在皮肤领域中的应用	(115)
6.5.4	脂质体的作用机制	(115)
6.6	脂质体的其它用途	(117)
6.6.1	血红蛋白载体—红细胞替代物	(117)
6.6.2	酶缺陷病	(118)
6.6.3	金属中毒	(118)
6.6.4	抑制免疫反应	(118)
6.6.5	影像诊断	(118)
	参考文献	(119)
7 章	脂质体介导的基因转移	(127)
7.1	理想的基因载体条件	(127)
7.2	脂质体作为基因载体的特征	(128)
7.3	介导基因转移的脂质体	(128)
7.3.1	pH 敏感脂质体	(130)
7.3.2	阳离子脂质体	(131)
7.4	基因转移过程	(134)
7.4.1	靶向结合	(134)
7.4.2	释放	(135)
7.4.3	表达	(135)
7.5	脂质体介导基因转移	(136)
7.5.1	体外应用	(136)
7.5.2	体内应用	(137)
7.6	脂质体介导基因转移的安全性	(138)
	参考文献	(139)
	附研究论文	(147)

1 章 脂质体概述

1.1 脂质体的定义

1965 年,英国 Bangham 发现,当磷脂分散在水中时形成多层囊泡,而且每一层均为脂质双分子层,各层之间被水相隔开,这种由脂质双分子层组成,内部为水相的闭合囊泡称为脂质体(liposome)。由于它的结构类似生物膜,故又称人工生物膜(artificial biological membrane)。脂质体在水中平衡后具有两性性质,即亲水性和疏水性,故其确切术语是兼性小体(smectic mesophase, amphisome)。脂质体大小从直径几十个纳米(nanometres)到几十个微米(microns),在脂质体的水相和膜内可以包裹多种物质。脂质体结构如图 1-1 所示。由天然膜(natural membrane)成分组成的脂质体,其脂质体膜的双层结构原则上与天然细胞膜一样。通过对脂质体膜广泛的化学修饰增加脂质体与天然膜的相似性,在体内外能够模拟或改进天然膜的功能。另外脂质体还可以完全由人工合成的脂质组成,以改善它们的化学性质。最初脂质体主要作为人工生物膜用于研究生物膜的结构与功能的关系。70 年代初期, Gregoriadis 首先提出用脂质体作为 β -半乳糖苷酶载体治疗糖原累积疾病后,人们开始应用脂质体作为药物载体控制药物释放,提高药物靶向性以减少药物毒性,减低其毒副作用,提高药物疗效。

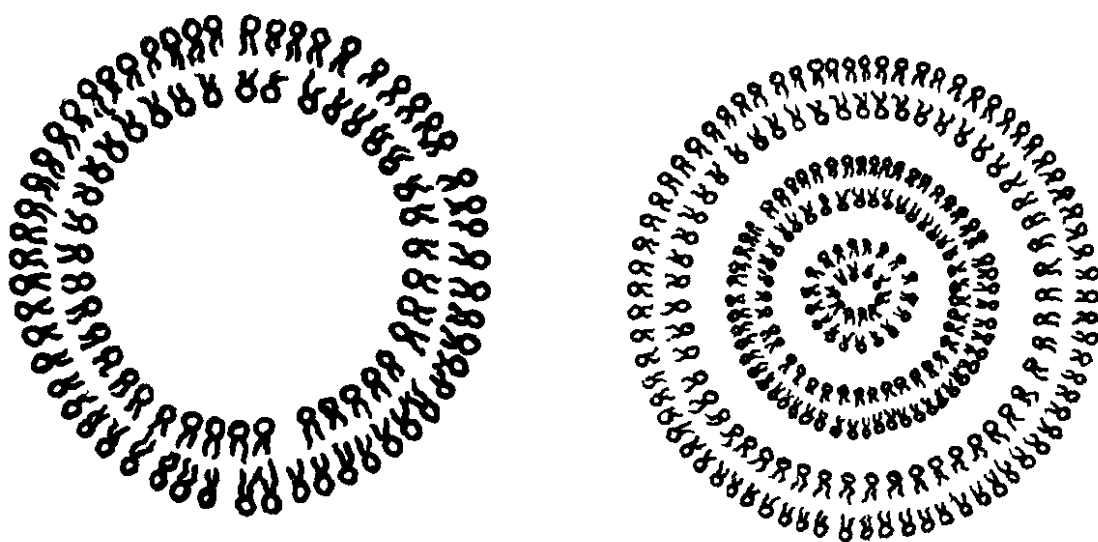


图 1-1 脂质体的结构示意图

1.2 脂质体的脂质组成及其性质

1.2.1 脂质组成

细胞膜的化学成分主要是类脂和蛋白质。类脂是脂的衍生物，质膜中的类脂主要是磷脂和胆固醇。各种脂质和脂质混合物均可用于制备脂质体，而磷脂最常用。但是在有等分子量胆固醇或其它单链兼性体（amphiphiles）存在情况下，溶血卵磷脂（lysophosphatides）也用于制备脂质体。磷脂由一个头部和两个尾部组成。头部由磷酸与水溶性分子如胆碱、丝氨酸酯化形成，可以溶于水；向下延伸的两条平行尾部是与油分子相似的脂肪酸链，每条链有 10~24 个碳原子和 0~6 个双键，不溶于水。由于这种分子的头部是亲水部分，而尾部是疏水部分，所以被称为双亲媒性分子或兼性分子。最简单的磷脂是磷脂酸（phosphatidic acid），其二酸甘油酯的自由 -OH 基被酯化为强酸—磷酸。由于两条烃链的组成在不同的磷脂酸分子是各不相同的，所以磷脂酸

一词指的是一类化合物，而不是指一种特异的化合物。细胞中最重要的磷脂是磷脂酸的衍生物（主要是 *L*-构型），同时还有其他的物质，常为含氮的碱基连接于一个磷酸羟基。连接于磷脂酸的物质包括胆碱、乙醇胺、丝氨酸和肌醇等，如图 1-2 所示。最常用的磷脂是磷脂酰胆碱（卵磷脂）phosphatidylcholines, lecithin, PC)。象磷脂酸一样，卵磷脂和其他的磷脂是代表好几类化合物的，因为个别分子中烃链的组成是有变化的。例如，文献报道，人体细胞膜中的卵磷脂是由 20 多个不同的分子所组成的。

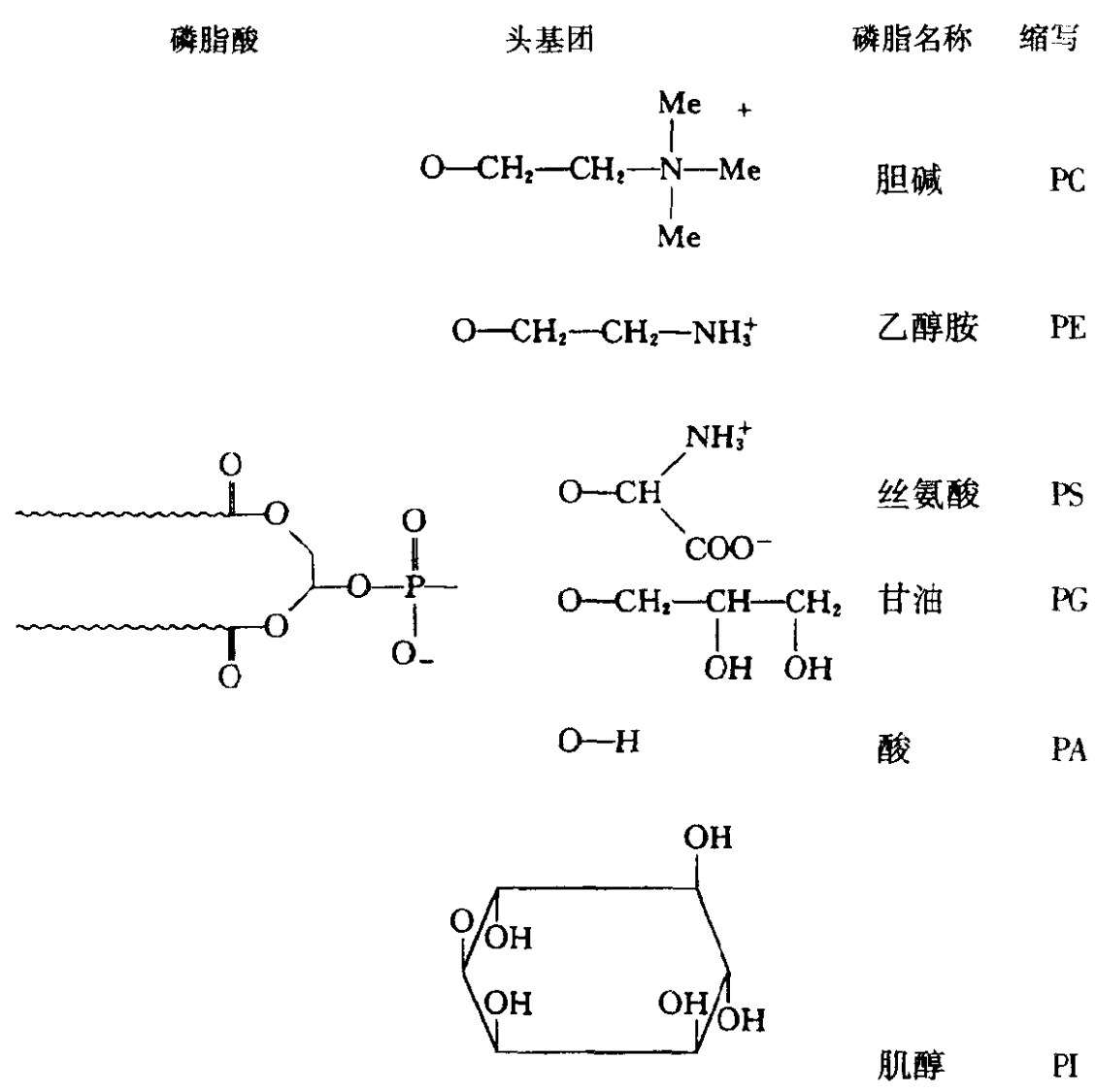


图 1-2 常见磷脂的分子结构

1.2.1.1 磷脂酰胆碱

磷脂酰胆碱有天然和合成两种来源。它们很容易从蛋黄和大豆中提取，从牛心脏和脊髓提取比较困难。磷脂酰胆碱是许多细胞膜的主要磷脂成分，它们也是脂质体的主要组成部分。与其它磷脂比较，它具有价格低、中性电荷、化学惰性等性质。天然来源的 PC 是一种混合物，每一种 PC 具有不同长度、不同饱和度的脂肪链。植物性 PC 的脂肪链具有高度不饱和性，而动物性 PC 的脂肪链大部分是饱和的。

1.2.1.2 其它中性磷脂

除了 PC 外，其它中性磷脂还有鞘磷脂或烷基醚磷脂酰胆碱 (alkyl ether lecithin) 类似物。在鞘磷脂，酰胺键（与 PC 相对应的甘油骨架）和羟基团之间形成氢键相互作用，因此它与 PC 比较具有更高秩序的胶相。

另一种较常见的中性磷脂是磷脂酰乙醇胺 (PE)，这种脂质具有一个不可置换的胺基团，在中性 pH 条件下发生质子化。它与磷脂酰胆碱比较，有两个不同点：①它的头基团比磷脂酰胆碱的小；②它在膜上与其邻近基团相互作用发生氢键结合。饱和 PEs 比 PC 的相变温度高 20℃。非饱和 PEs 与 PC 的相变温度相似，在低 pH 情况下，由于 PEs 的氮发生质子化，氢键结合减弱，因而饱和 PEs 的相变温度亦与 PC 相似。PE 由于头部基团小，容易形成非双层构型。PE 分子形成长的圆柱状结构，头部基团朝向中心，这种结构被称为六角相 (hexagonal phase HII)。所有 PEs，在主要的胶一液转换温度以上时转变成六角相。所有合成的 PEs 以及饱和的 PEs 在室温下形成双层胶相，而非饱和的 PE 形成 HII (非脂质体)。非饱和的 PEs 与其它磷脂如 PC 混合可以形成稳定的双层相，防止转换成 HII 相。然而如果稳定脂质的浓度低，形成双层后易发生相分离，在板层结构中形成六角相或反向微团 (inverted micelle structures)。在自然界，PE 的酰基链的长度不同，呈高度不饱和状态，这提示 PE 参与了生物系统中膜脂质的非双层结构。