

定因素可设法排除。比 Post 模型更进一步的是南云仁一和中野 馨 (1970 年) 的“联想机”(Associatron), 它是由大量的互相联结的神经元组成, 这种机器用于信息处理时, 除了本来学习机器的那些作用外, 还有根据“联想的反复”而进行“思考”的完全不同的一面, 具有模拟人的联想记忆的能力。最近, 还有人把全息照相术的原理和联想记忆联系起来。当分开的两个图形  $A(x)$  与  $B(x)$  合照成一个全息照象图形时, 得到的是  $\tilde{A}(\omega) + \tilde{B}(\omega)$  的融合在一起的全息图。即脑在记忆时, 是把与  $A(x)$  同时在场的  $B(x)$  一起记为  $\tilde{A}(\omega) + \tilde{B}(\omega)$ 。当单独看到  $B(x)$  时, 就经过  $\tilde{A}(\omega) + \tilde{B}(\omega)$  把  $A(x')$  及  $B(x')$  [ $A(x)$  与  $B(x)$  的像] 同时输出, 这就是看到  $B(x)$  时联想到  $A(x)$  的原理。当然, 这种看法完全是设想性的。

## 四、视觉系统的模型

(请参阅本刊 1976 年第 2 期, 汪云九:《视觉系统感受野的研究概况及其模拟》) (待续)

### 主要参考资料

- [1] McCulloch, W. S. et al.: *Bull. Math. Biophysics*, 5, 115, 1943.
- [2] 南雲仁一 生体システム 日刊工業新聞社, 昭和 46 年。
- [3] 南雲仁一 バイオニクス 共立出版社株式会社, 昭和 41 年。
- [4] 木村正行 自己組織系構成論 共立出版株式会社, 昭和 48 年。
- [5] 塚原伸晃 小脳の神経回路網とそのモデル <数理科学>, 9, 67, 1973.
- [6] 永野俊 脳モデルとしての学習機械 <数理科学>, 9, 44, 1973.
- [7] 甘利俊一 神経回路とホログラフイ—I, II <数理科学>, 1, 177, 1975. 2, 81, 1975.

[本文于 1977 年 1 月 28 日收到]

# 脂质体 (Liposome) 在生物膜研究和药理学方面的应用

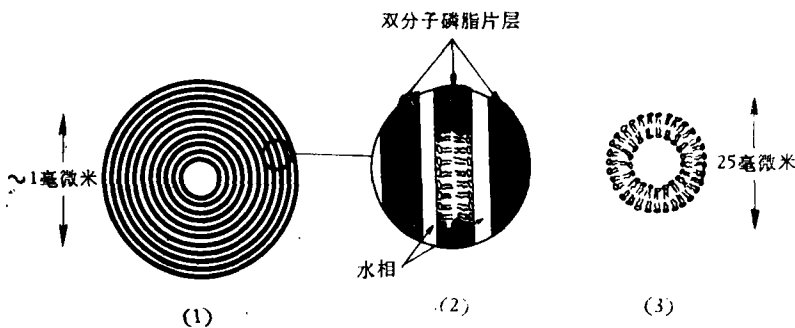
杨 福 愉

(中国科学院生物物理研究所三室)

## 一、什么叫脂质体

脂质体是由双分子磷脂组成的一种人工

膜, 或称“液晶微囊”。将磷脂悬浮分散在水溶液中, 它们就自发膨胀形成多层的类似洋葱状的封闭球形结构。在双分子磷脂组成的片层之



(1) 多层脂质体

(2), (1) 的部分放大

(3) 小的单层脂质体

图 1

间和中心部分充满着水溶液，多层脂质体经过高频声波处理可以变成单层脂质体(见图1)。脂质体的水相中可以包进各种溶质(包括金属、非金属离子)，因而提供了研究生物膜通透性的一个简便模型。也可以将生物膜的功能蛋白(包括酶或酶系)分离后包入或嵌入脂质体以研究它们在生物膜中作用的机理以及与脂类的相互作用。脂质体的磷脂组份可以从生物膜提取的混合磷脂，也可以用提纯的磷脂。因此，脂质体又为研究生物膜中各种磷脂组份的作用提供了一个比较理想的工具。总之，近年来由于上述各种原因，脂质体作为研究生物膜的一个比较简便的模型而日益受到广泛的注意和应用。

1971年以后国外又有人想将脂质体作为药物载体来治疗一些疾病，因而为脂质体的研究开辟了联系医疗实践的前景。脂质体作为药物载体主要有以下几个优点：(1)脂质体在免疫上是惰性的，因此将一些生化药物(如治疗白血病的门冬酰氨酶)包在脂质体中可以避免机体防御系统产生抗御异体的免疫反应。(2)组成脂质体的磷脂都是天然的生理化合物，易被机体消化分解，不会象以前使用的合成微囊(如尼龙微囊)因机体难以排除而产生毒性。(3)药物包在脂质体中可以减低毒性，例如肿瘤的化疗药物一般毒性都比较大，用这样的载体优点就更为明显。(4)通过改变脂质体的大小、电荷以及磷脂组份等的研究，有可能使载有药物的脂质体选择地导向病变组织和细胞。这样就可以大大提高药物疗效。最近几年国外利用脂质体作为药物载体的研究比较活跃，但基本上还处于动物实验阶段，临床试验尚未大量进行。随着这方面研究的进一步深入，应用的前景很可能是比较广阔的。

## 二、脂质体的制备

脂质体的制备方法很多，一般常用的有下面几种：

### 1. 振摇法

将溶有磷脂的有机溶剂盛于旋转的玻璃烧

瓶中，在真空条件下进行蒸发。结果烧瓶的内壁形成一层磷脂薄膜。然后加入水溶液进行轻微振摇使磷脂溶下并自发膨胀形成脂质体。它是多层的，直径约为1微米左右。

### 2. 超声法

将振摇法制备的脂质体或比较均匀的磷脂悬浮液在充氮条件下进行超声处理可以得到单层脂质体。直径约为25毫微米，即1微克分子的磷脂可以制备约 $2 \times 10^{14}$ 个脂质体。

### 3. 微量注射法

将磷脂溶于乙醇中，然后用微量注射器将乙醇溶液慢慢注入缓冲溶液中。形成的脂质体用低压过滤进行浓缩。用微量注射法制备的脂质体与超声法无多大差异，直径也为25毫微米左右。优点在于形成过程迅速，容易重复而且可以大量制备。

要得到大小均匀的脂质体可以通过凝胶过滤(Sepharose 4B或2B)或离心等方法加以分离。

脂质体由类脂组成。它的性质、大小以及内含水相的容积都与类脂组份有密切的关系。凡能形成典型脂质体结构的类脂称为“结构”类脂。它们包括磷脂酰胆碱、神经鞘磷脂、心甾脂、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇以及磷脂酰酸。还有一些天然和合成的类脂与“结构”类脂混合后才能形成脂质体。如磷脂酰乙胺、双鲸蜡醇磷酸脂、硬脂酰胺以及胆固醇。脂质体因类脂组份不同可以带正的(如以硬脂酰胺等为组份)或负的(如以磷脂酰酸为组份)电荷，也可以是中性的(如以磷脂酰胆碱为组份)。由中性类脂组成脂质体的片层之间的空间很小，因而能容纳的水相容积也很小。如果引入带电的类脂可以使片层之间因静电相互排斥而增加水相容积。但如果带电类脂超过10克分子%，水相容积就不再继续增加。此外，水相的离子强度也能促使电荷淬灭而导致水相容积的缩小。因此在制备脂质体时最好是使带电的类脂控制在10克分子%左右，同时使水溶液的离子强度保持最低水平。

### 三、脂质体在生物膜研究中的应用

#### 1. 脂质体是研究膜蛋白与类脂相互作用的模型

膜蛋白一般不易分离,而且从膜上分离下来以后它们的性质又有很大的改变,不同于原来在膜上的情况。这给研究膜的结构与功能带来了许多困难。为此寻找一个比较理想而又简单的研究模型是很重要的。双分子类脂是生物膜结构的一个重要组成部分,所以近年来很多人利用脂质体作为一个研究模型,将分离的膜蛋白重新组装在脂质体上来研究生物膜的结构与功能。迄今为止已经有三十多种蛋白质(包括酶或酶复合体)在脂质体上组装成功。其中重要的有:线粒体的细胞色素氧化酶,腺三磷酸酶复合体, I, II, III 位偶联磷酸化酶系,肌质网钙泵,红细胞膜钠泵。此外,有人还将嗜盐菌的视紫质和牛心线粒体腺三磷酸酶复合体在脂质体上进行重组并能表现光化磷酸化的功能。当进行组装时各种蛋白质对类脂组份的要求也不完全相同。

膜蛋白或其它蛋白质在脂质体上进行组装主要采用下列几种途径:

(1) 直接超声法 将磷脂均匀悬浮于一定 pH 和离子强度的水溶液中,加入所要包入的蛋白质或酶,然后在 0℃ 左右进行超声处理。在此过程中脂质体裂成小的片段,同时又重新组合。这样,溶液中的蛋白质就被包入脂质体的内部。

(2) 透析法 将去垢剂(如胆酸钠,最终浓度为 2%)和蛋白质一起加入磷脂悬浮液中,均匀混合后在 0—4℃ 进行慢透析。在透析过程中由于胆酸盐的浓度逐渐降低,脂质体又重新形成,与此同时蛋白质也就包入内部。

(3) 胆酸盐稀释法 用超声法制备脂质体,然后加入蛋白质和较低浓度的胆酸盐(最终浓度为 0.25—1%) 在 0℃ 进行均匀混合并放置半小时左右。之后再将混合液稀释 20—25 倍。

上述三种方法各有优缺点。直接超声法比

较简便、快速。但实验重复性不够好。对易受超声影响的蛋白质或酶(如细胞色素氧化酶)就不宜用这个方法制备。透析法重复性较好,但费时较长,而且由于胆酸钠的浓度较高,对某些蛋白质或酶也有一定影响。胆酸盐稀释法可以使包入的蛋白质或酶免受超声的影响,而且加入的胆酸盐的浓度也比较低。此外,这个方法还具有快速、重复性较强的优点。但是有些蛋白质(如细菌视紫质)却不能利用这个方法进行组装。我们实验室曾用大豆磷脂为实验材料,采用上述三种方法分别将细胞色素 C 包入脂质体加以比较。实验结果表明,直接超声法纳入脂质体的比例较高。此外我们也比较了直接超声法和胆酸盐稀释法组装猪心线粒体腺三磷酸酶复合体。初步结果表明,胆酸盐稀释法比较成功。

膜蛋白或其它蛋白质在脂质体中可能以三种方式存在:(1)蛋白质与脂质体的双层类脂相结合。嵌合后的蛋白质分子可能位于脂质体的外侧(如线粒体的腺三磷酸酶复合体)或内侧(即与水相接触的一侧)也可能跨越类脂片层(如细胞色素氧化酶)。(2)可溶性蛋白质位于脂质体内含的水相中,同时又通过静电作用与带电荷的类脂片层相结合(如细胞色素 C)。(3)可溶性蛋白质包入脂质体的水相中,它们本身不带电荷,因此不以静电作用等方式与类脂分子相结合。

总之,通过膜蛋白或其它蛋白质在脂质体的组装工作,对阐明生物膜的蛋白和类脂的作用机理及其相互关系是很有帮助的。因此近年来,国外这方面的研究发展较快。

#### 2. 脂质体用于通透性的研究

脂质体的通透性与其类脂的组份、电荷等都有密切关系。通过这些研究可以为阐明生物膜通透性的机理提供有力的实验证据。一般讲,增加脂质体磷脂组份脂酰基的链长或降低其不饱和度都能导致双层类脂分子流动性的降低,相变温度( $T_m$ )的增加,因而降低溶质分子的通透性。离子通透性与脂质体带电荷的性质密切相关。阳离子不易通过带正电荷的脂质体

(如由磷脂酰胆碱与硬脂酰胺组成的脂质体),但能通过带负电荷的脂质体(如以磷脂酰酸组成的脂质体)。然而,所有脂质体对质子的通透性都很低。至于阴离子则不论带正电荷还是负电荷的脂质体都比较容易通过。

某些蛋白质与脂质体双层类脂分子的相互作用也会增加其通透性,这可能是蛋白质嵌入后引起的结果。

综上所述,通过脂质体通透性的研究对于了解生物膜的各种类脂和蛋白质组份在离子和物质运转过程中的作用方面显然是很重要的。

除上述两方面研究外,人们还利用脂质体来研究膜表面抗原、抗体相互作用的分子机理,促进细胞融合以及通过与离体培养细胞的融合来修饰细胞膜的类型组份等等。

## 四、脂质体在药理学方面的应用

### 1. 脂质体作为药物载体的尝试

在脂质体理论研究的基础上,1971年英国莱门(Ryman)等人开始将脂质体用作药物载体来加以研究。在这之前加拿大籍中国科学家张铭书曾研究过类似的药物载体。他将药物(如门冬酰氨酶)包在一种多孔的尼龙或其它合成高分子的微囊内,以免药物进入机体后产生由免疫作用引起的过敏反应。由于这种人工膜在体内不能被分解排除,慢慢就积累在肝脏内产生毒性。脂质体的磷脂组份是生理化合物,机体容易分解消化,这样就不会产生类似尼罗微囊的有害后果。莱门首先将黑曲霉(*Aspergillus niger*)中提取的葡糖型淀粉酶包于脂质体中来处理糖元沉积病<sup>1)</sup>(glycogen storage disease)。近年来这一尝试已经推广到其它药物的治疗方面。例如,抗肿瘤药物,胰岛素以及用螯合剂来清除体内有毒的金属元素等等。作为药物的各种化合物可以根据其溶解度分别纳入脂质体水相或脂相中。

### 2. 脂质体进入体内的途径和分布

包有药物的脂质体一般采用静脉注射、腹膜注射、肌肉注射等方法输入体内。最近还有用口服的办法将包有胰岛素的脂质体引入机体

来进行试验的,结果亦有降低血糖的效果。

根据动物实验的结果,脂质体进入体内的途径和分布可归纳为如下几点:

(1) 通过静脉注入体内,在循环系统中脂质体仍保持完整。它们很快地从循环系统消除并进入组织。在循环系统“逗留”的时间与脂质体的结构、大小、带电荷的性质等都有关系。单层脂质体较多层的“逗留”时间要长,带负电荷的脂质体清除速度要快些。不带电荷与带正电荷的脂质体没有明显差别。

(2) 放射自显影和免疫反应的研究结果表明,脂质体进入机体后主要分布在肝脏和脾脏组织内,其它组织内的含量很少。肝脏主要系由实质细胞组成,并有少量Kupffer氏细胞。脂质体在这两种细胞内的动态分布还有待进一步研究。

(3) 脂质体进入肝脏细胞可能通过胞饮方式,然后与溶酶体融合。后者的脂肪酶作用于脂质体的双层类脂使其内含的药物释放出来而起作用。

(4) 脂质体内包的酶进入体内后的“寿命”可以有很大的差异。例如, $\alpha$ -甘露糖甙酶活力在脂质体注射后三天还可以检测到,而淀粉糖甙酶则很快被破坏。

### 3. 使用效果

利用脂质体作为药物载体近年来虽然进行了不少研究,但除个别已进行临床试验外,基本上还停留在动物实验阶段。现略举几例加以说明:

(1) 注射包有淀粉糖甙酶的脂质体治疗糖元沉积病患者,结果肝糖元的含量显然降低,肝大症状明显减轻。

(2) 通过腹膜注射含有放线菌素D的脂质体使患有艾氏腹水癌的小鼠延长存活期。而且包在脂质体内的放线菌素D与其自由状态相比,对机体的毒性要小得多。除放线菌素D外,5-氟尿嘧啶,2,4-二氨基,10-甲基蝶酰谷氨酸(Methotrexate)门冬酰氨酶等抗癌药物也曾分别

1) 这是一种分子遗传病,患者的肝脏溶酶体先天性缺少淀粉酶,因而引起糖元沉积。

包在脂质体中进行了动物试验。

(3) 给患实验性糖尿病的大鼠饲喂内含胰岛素的脂质体能明显降低血糖, 而口服自由状态的胰岛素则没有效果。这个方法如能应用于临床, 则对不宜进行注射治疗的病人将是很有价值的。

(4) EDTA 一类金属螯合剂一般不能透过细胞膜, 但如将它们纳入脂质体后再注射至小白鼠就能被肝脏摄取。它们能与细胞内镉、铅、汞等有毒金属相螯合然后排出体外。这可能应用于治疗金属中毒或遭受放射性事故的病人以从速将他们体内有毒的或放射性金属元素排出体外。

#### 4. 存在问题和展望

(1) 如果包入脂质体是小分子一类的药物, 它们就很容易渗出脂质体。为了防止这种现象发生, 可以采取以下的一些措施: 如采用象棕榈酰磷脂酰胆碱一类的磷脂来形成脂质体, 由于这种磷脂的碳链没有不饱和键, 因此由它形成的双分子层的流动性很低, 对低分子量化合物的通透性就很小。或将胆固醇引入脂质体的双分子磷脂片层, 能使其中每个磷脂分子只以垂直方向运动, 减少了酰基链运动的自由度。这样也能降低通透性, 减少小分子化合物的渗出。除这两种措施外, 还可以用与包入溶质分子带有相同电荷的磷脂来组成脂质体。由于静电斥力作用也能减少溶质分子的向外扩散。但是对某些药物(如 5-氟尿嘧啶)包入脂质体后的渗出问题仍未找到一个比较理想的措施。

(2) 作为药物载体的脂质体进入机体后如果能选择地导向病变组织细胞, 则药物的效果就能大大提高并减少药物用量, 降低对机体的毒性。但是要做到这一点是比较困难的。大量的实验结果表明, 脂质体进入体内绝大部分都积储在肝脏和脾脏组织内。显然很少有只影响于这两种组织的疾病。因此必须探索各种措施

使脂质体与一定的组织细胞的结合具有选择性。通过改变脂质体的电荷, 大小以及类脂组份等方法已经进行了不少工作。最近有人将某一组织或细胞的特异抗体附加在脂质体表面, 以便使它们特异地与产生抗体的相应组织或细胞相结合。这种方法对离体培养细胞有一定效果, 整体试验正在进行中。关于脂质体与肿瘤细胞结合问题, 有些报道认为肿瘤细胞吞噬力较强, 脂质体进入机体后在肿瘤细胞的分布比正常细胞要多。但也有相反的结果: 肝癌细胞较正常肝细胞摄取脂质体的能力还要小。总之, 脂质体能否有选择地与特定的组织细胞相结合, 这是它能否作为比较理想的药物载体的一个很重要条件。目前这方面的研究还处于很不成熟的阶段。

(3) 在实验室制备脂质体并不困难, 但脂质体在 0°C 左右只能保存一周左右, 因此如果要作为药物载体进行大量生产与应用还有不少技术问题有待解决。

综上所述, 近年来对脂质体在药理学应用方面已经进行了不少研究, 但还存在一些问题。如果要使这种药物载体在临床上广泛应用, 关键的问题在于包有药物的脂质体进入体内后与组织、细胞的结合要有选择性。随着脂质体研究的进一步深入, 上述问题相信会逐步得到解决, 因此脂质体在药物方面的应用还是很有前途的。

#### 主要参考资料

- [1] Bangham, A. D.: in *Methods in Membrane Biology*, vol. 1, p. 1, 1974.
- [2] Tyrrell, D. A., et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 457, 259, 1976.
- [3] Ryman, B. E.: in *Proc. 6th Intern. Congress of Pharmacology*, vol. 5, Clinical Pharmacology, p. 91, 1975.
- [4] 中国科学院生物物理所三室生物膜组(待发表资料)。

[本文于 1977 年 8 月 1 日收到]