

专论与综述

单层脂质体与脂酶体的制备方法及应用

谢 静 平

(中国科学院生物物理研究所, 北京)

提 要

本文简要综述了各种单层脂质体制备及脂酶体重建的方法, 并对它们的优缺点和应用范围作了探讨。最后介绍它们在作为药物载体及膜蛋白分离纯化中的应用。

生命结构的基本单元是细胞, 而细胞是膜的结构。早在1925年 Gorter 和 Grendel 通过分析红细胞的表面积和从中抽提的膜脂所排列的面积, 推论出膜是由双分子层构成。1970年 Frye 和 Edidin 在来自人和小鼠的细胞膜上标上不同的荧光抗体, 然后通过病毒粘合使形成一杂交细胞, 他们发现: 无论是否加入 ATP 酶和蛋白合成酶等的抑制剂, 最后荧光在整个膜上均匀分布。由此说明膜是一种动态结构。后来 Singer 和 Nicolson 综合前人的实验结果, 提出了现已广泛接受的膜的流动镶嵌模型。但生物膜是含多种脂质、糖类和膜蛋白的超分子体系, 结构极为复杂。要从分子水平探讨生物膜的结构和功能, 研究各个组分及它们之间的相互关系, 就很有必要建立一种既理想又简单的研究模型。几十年来的实践表明, 人工脂质体及它与分离纯化的膜蛋白重建的脂酶体是研究生物膜结构和功能的一种最理想模型。本文先简要综述到目前为止文献报道的各种单层脂质体制备及脂酶体重建的方法, 同时探讨他们的优缺点和应用范围。然后介绍它们在分子生物学中两种新的重要应用。

单层脂质体的制备

超声法 Huang^[1] 在1969年提出。其程

序是先用探头式超声器或水浴超声器高温、长时间强超声脂质, 然后超速 (105, 000g) 除去未分散的磷脂, 再经孔径 0.1μ 的微孔膜过滤, 最后过分子筛层析柱 (Sephacrose 4B, $2.5 \times 50\text{cm}$) 而获得较均一的单层脂质体。此方法的优点是适用磷脂范围广, 无外来溶质干扰。不足之处是制备过程复杂, 产率较低, 且得到的脂质体半径较小 (约 100Å), 由此产生过高的结构应力导致的不稳定性而限制了它的应用。

去污剂去除法 这类方法的要点是在磷脂悬液中加入一定比例的去污剂, 借助于超声使混合形成微球体 (micells), 然后缓慢去除去污剂。在去污剂去除过程中, 磷脂分子重新排列, 自发形成脂质体。依去污剂的去除方法不同又可分透析法、层析法和吸收法^[2]等。具体选用的去除方法取决于所采用的去污剂。如对 Triton X-100, 它的临界微球浓度很低, 很难经透析去除, 故可采用 BioBeads SM-2 吸收法。这类方法得出的脂质体大小与去污剂/磷脂比例相关。同时也取决于分离去除去污剂所需的时间, 如透析时间的长短, 层析柱的高度及所加吸收剂量的多少等。它的优点是脂质体的大小可根据加去污剂量的比例来控制。而且产率高, 结果(单层性)也比较理想。缺点是大小分布不很

均匀且无法消除残留的微量去污剂。

有机溶剂挥发法 此类方法是目前最为广泛采用的方法。其中又以反相挥发法 (REV)^[3] 与注射法^[4] 较佳。这类方法的原理是先将磷脂用低挥发点的有机溶剂溶解。然后通过水相使有机溶剂挥发掉,在此过程中,磷脂与水相接触通过疏水相互作用单层脂质体自然形成。在 Szoka 和 Papahadjopoulos 提出的 REV 过程中,一般用 1ml 乙醚溶解 7.5mg 磷脂(对难溶于乙醚的磷脂可加少量氯仿或甲醇助溶),然后加入 0.33ml 所需的缓冲液(水相)。在水浴超声器中短暂超声使之形成一清彻的单相悬浮液或一均匀的乳白状扩散液。超声强度和时间长短以形成的单相体系在静置半小时内不重新分相为准。样品然后在减压下(20—25℃)用旋转蒸发器去除有机溶剂。此过程中样品先形成发泡的粘状凝胶然后逐渐透明,此后,宜继续旋转蒸发一段时间(15 分钟左右)。这步得出的样品可经透析、抽高真空或凝胶过柱等手段除去残留的有机溶剂。对注射法,同样也用乙醚溶解磷脂,然后均速注射到一预恒温在有机溶剂挥发点以上的缓冲液中。该方法得出脂质体的大小、均匀性及层数与多种因素有关。详细可参见文献 [5]。此类方法的优点是重复性好,得出的单层脂质体相对较大。唯一的缺陷是残留的有机溶剂可能对脂双层结构和性质带来影响。不过,有人从多方面比较了以注射法和以超声法制备的脂质体的性质,结果表明有机溶剂的影响是可忽略的。

微孔抽提法 此类方法最早由 Olson 等人^[6] 提出。当把机械振动形成大小不一的多层脂质体连续通过不同孔径(0.4—0.1 μm)的聚碳酸(Polycarbonate)纤维膜后,他们发现不但脂质体的大小分布趋于均一,而且圈套体积大大增加,说明单层脂质体的成份增多。Hope 等^[7] 改用同一孔径(0.1 μm)的碳酸酯纤维膜在加压下抽提,并将抽滤后的脂质体冰冻、解冻,然后再微孔过滤,如此反复进行几次可得到十分理想的结果。据我们经验,用于一般细菌过滤的微孔膜用注射器加压便可代替文献报道

中使用的抽滤装置。这不但可用于少量样品而且损失极微。只是微孔膜一旦浸湿很容易阻塞,故不宜反复使用。此外,这类方法对那些相变点较高的磷脂是不大适宜的。

其它特异法 对磷脂酸或含磷脂酸的混合磷脂,可通过来回滴定 pH 值来形成单层脂质体。其具体形成过程及原理尚不清楚。此外,因平面磷脂膜在溶胀时,如控制好条件便可形成单层脂质体。Lasič 等^[8] 利用这一原理,在带电荷磷脂和少量去污剂存在下,以微晶为支持面获得了较理想的单层脂质体。它的大小及大小分布取决于所用微晶的大小和均匀性。这类特异法对满足其前提条件的磷脂是成功的。

至今每年都有不少文献报道脂质体的制备方法,但大多不过是上述几类方法的综合或某些改良。值得指出的是所谓均匀的单层脂质体不过是相对而言的。就单层性来说,如果单层脂质体能占总脂质体数目的百分之七十,则结果就相当理想了。目前总的趋势是结合不同的制备方法来提高制备效果。如用 REV 制备的单层脂质体再经微孔膜抽提便可得到很好的结果。

脂酶体的重建

保温嵌入法 在预先制备好的脂质体中加入分离纯化的蛋白,在一定条件下,经一段时间蛋白可自发嵌入脂双层内。这一般需在脂双层相变点以上,且形成脂质体的磷脂组份应含有酸性磷脂(这对不同蛋白有一最佳比例)。此外,体系中是否加入一些二价金属离子对嵌入的快慢有很大的影响。这种方法快速简便,不过需引入一些人为因素,从而使它的应用范围得到限制。并且对一些内膜蛋白如 Na⁺/K⁺ 泵及嗜紫红质等方法不能成功重组。

超声法 将用缓冲液悬浮的磷脂和分离纯化的蛋白充分混合,再经超声便可形成脂酶体。此方法避免了去污剂和外来溶剂的干扰,并证明是重组嗜紫红质唯一成功的方法。为了有效重建脂酶体,超声法需在磷脂相变点以上较长时间(约10分钟)超声脂质和蛋白。这多少会损

失蛋白活力故不能用于那些对超声敏感的蛋白如细胞色素氧化酶等的重组。为此 Kasahara 和 Hinkle^[9] 提出于冰冻-解冻超声法,并首次成功地用于从红细胞膜上分离的葡萄糖载体蛋白的重组。此方法的程序是在混合已超声制备好的脂质体和分离纯化的蛋白后,投入干冰-丙酮或液氮罐中迅速冷冻,经室温下缓慢解冻后再短暂超声,最佳超声时间取决于要重组的蛋白,但一般都不超过 2 分钟。该方法证明能成功地用于多种蛋白的重组。主要问题是得对解冻后的超声时间进行摸索。对平行实验每次要控制等同的超声强度也是很困难的。

去污剂去除重组 Kagawa 和 Racker^[10] 首次用于重组氧化磷酸化酶。至今已有效地用于各种类型的内膜蛋白的重建。其过程大致为:在去污剂存在下先超声磷脂使形成微球体,然后加入蛋白再经透析缓慢去除去污剂。应用最多的去污剂为胆酸(盐)。但它对不同蛋白并不都是十分有效的。如在重组肌质网 Ca^{2+} 泵时发现,采用胆酸和脱氧胆酸混合去污剂得到的结果比用单一种去污剂要好。最近 Laird 等人^[11]用非离子去污剂——辛基葡萄糖苷重组线粒体 F_0-F_1 蛋白获得了很好的结果。去污剂透析法的不足之处是所用时间较长。而且膜蛋白长时间暴露于去污剂将使蛋白的活力和性质发生改变。为此,不同实验室的研究者摸索出了不同去污剂的去除法。如去污剂稀释法及最近 Kramer 和 Heberger^[12] 提出的用疏水离子交换柱法和用 Bio-Beads SM-2 吸收去除法等。去污剂去除重组的一大独特优点是可通过增大去污剂/磷脂比例,用于高密度酶蛋白的脂酶体重组。

融合重组 对含磷脂酰乙醇胺和 30% 的磷脂酰丝氨酸或心磷脂的脂质体,加入 Ca^{2+} 和所需重组的蛋白后,脂质体之间的融合可使蛋白重组到脂质体上。这方法可得到比其它方法大得多的脂酶体。此外,借助于渗透梯度还可使形成的脂酶体和平面黑脂膜融合使蛋白转移到平面磷脂膜上。而平面黑脂膜对研究一些离子通道和转运蛋白是相当有利的。此方法不足

之处是要求脂酶体有特定的磷脂组成和 Ca^{2+} 存在。这不能用于研究磷脂和蛋白的相互作用和金属离子的影响。不久前,Scotto 和 Zakim^[13] 提出了一种新的融合重组方法。他们的方法在于在预先制备的单层脂质体中加入少量 Myristate 作为融原 (fusogen),蛋白加入后,首先迅速嵌入部分脂质体的脂双层中,然后相互融合使蛋白均匀地重组到脂质体上。若能排除融原的干扰,这方法还不失为是个独特和有效的重组方法。

盐析重组 此方法 1983 年由日本学者 Taguchi 和 Kasai 提出,并用于肌质网上蛋白的重组^[14]。其基本原理在于阴离子表面活性剂(如 Triton X-114 和磷脂等)在不同离子浓度的溶液中有不同的云点 (cloud point)。这方法的优点是对用于重组的膜蛋白的纯度要求不高。如对肌质网囊泡,用 Triton X-100 溶膜得到的蛋白便可直接用于重组。

值得说明的是,上述各类重组方法并非对任何蛋白都是行之有效的。即使对某一膜蛋白,几种重建过程都同等有效。但对不同的研究目的或某一特定的指标是有区别的。因此,应根据所研究侧面挑选最有效的重组方法。此外,上述总结的所有重组方法得出的脂酶体,膜蛋白在脂双层中一般都是均匀、近对称分布的。而且脂酶体不可能都是单层结构。这些在研究离子转运和载体蛋白时是必须考虑的因素。为更接近真实膜体系,最好能使蛋白不对称重组。一些学者在这方面作了大量尝试。据文献报道,肌质网 Ca^{2+} 转运蛋白^[15] 和葡萄糖载体已成功地对不对称重组。

应 用

几十年来,以单层脂质体和重建的脂酶体为模型,通过运用各种物理手段和生化分析方法,对膜的电学性质、非脂双层结构、相变性质、脂质构象、膜的融合、离子运输、膜蛋白的运动状态和构象变化同功能发挥的相互关系,膜脂和蛋白的相互作用及药物对生物膜结构和功能的影响等等各方面作了深入而广泛的研究。本

文仅就两种新的应用作较详细的介绍。对上述各种应用有兴趣的读者可查阅有关分门别类的综述。

脂质体作为药物载体 脂双层由于其组成分子的亲脂、水这一特殊性质,构成了一隔绝外界和脂质体内环境的屏障。它对大部分水溶性物质及非极性的疏水分子基本上是不通透的。当脂质体作为水溶性药物载体时,先在制备脂质体的水溶液或缓冲液中加入一定量的药物,然后分离除去未圈套的脂质体外药物,并在脂双层中嵌入或在脂质体表面上结合能特异地识别某类细胞的抗体。当把载药“免疫性脂质体”(immunoliposome)注射到血液中后,由于脂质体大小的可变性及脂双层的柔软性,借助血液循环,它可顺畅地通过各种血管把药物定向地运送到靶目标。这不但消除了药物对其它组织或细胞带来的副作用,而且大大提高了药效。此外,大部分膜脂都不具有抗原性,在包裹那些抗原性药物后,可保护它免受机体免疫系统产生抗体的破坏。临床应用中,一急待攻克的难题是在体内当免疫性脂质体与靶细胞特异地结合后,如何使两者融合而有效地释放出药物。体外实验中常采用的方法是在免疫脂质体脂双层中加入一定的融原如聚乙二醇,仙台病毒等,或运用pH及热敏感性的免疫脂质体。此外也可外加脉冲电场诱发融合。最近有报道指出,若在免疫性脂质体中加入少量Palmitoyl IgG,同时注意选择脂质体的磷脂组成,则可使靶细胞去稳定,在特异性结合部分融合而有效地释放出药物^[16]。至今,脂质体已被成功地用于多种具有药理活性物质的载体。在实验系统中它证明能十分有效地运输抗原、抗体、酶、离子及抗癌药物等。并且已开始生物体内试用(见Connor等人最近的综述^[17])。可以预期,被誉为生物体内“导弹”的载药脂质体,将为攻克当今人类面临着的一些难治之症(如肿瘤等)提供一十分强有力的手段。

膜蛋白的分离纯化 要从分子水平研究功能膜蛋白的结构及功能发挥,将蛋白分离纯化是最关键的重要前提。目前,对许多膜上含量

较低且功能性质还不完全了解的蛋白酶,尚无十分有效地分离纯化方法。近几年来发展的用特异性免疫抗体亲和层析法虽从理论上为分离纯化各种蛋白提供了一种有效可行的手段,但过程极为复杂,而且也应先得到较纯的样品作为抗原才能有效地进行大批量分离纯化,1978年Goldin和Rhoden^[18]提出了一种分级分离(fractionation)方法。并用于人血红细胞膜上葡萄糖转运系统的分离重组。此方法的步骤是:将组织匀浆、破膜,离心除去污染的细胞器和杂膜体系。然后加去污剂溶解膜蛋白,并加大量的外界磷脂。充分混合后经透析或凝胶过柱除去去污剂,此过程中蛋白重组到磷脂膜上。重建的脂酶体经不连续蔗糖梯度离心后,不同大小且重建有不同膜蛋白的脂酶体形成不同的混浊性区带。分级分析脂酶体上膜蛋白的特定指标如转运比活,便可确定含所需脂酶体的区带。这方法关键要求外加磷脂必须大大过量,使得重组到每个脂质体上的蛋白分子仅一到二个。这方法虽然得率较低,但简易可行。且破膜后的膜蛋白被立即重建到脂质体上,这可使蛋白的功能活性得到很好的保护。如要制备纯一的膜蛋白体系,可再次用去污剂破碎脂酶体、离心除去膜脂分子而获得膜蛋白。近年来,用这一方法已将神经膜上含量极低,功能十分重要但机理尚不清楚的 Na^+ 通道, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换通道及 Mg^{2+} 激活的 Ca^{2+} -ATP酶得以分离纯化^[19]。以该方法部分纯化的 Ca^{2+} 泵为抗原,经免疫亲和层析已获得了高纯度的制品,发现它虽同其它组织来源的 Ca^{2+} 泵有免疫交叉反应,但在离子转运动力学性质及抑制行为等方面有差异。此外还发现它有三种不同的分子形式。其中两个不受钙调蛋白激活但具有 Ca^{2+} 转运功能^[20]。同样对 Na^+ 通道及 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换通道的研究也取得了一系列重要结果。有充足的理由可以预期,将来还会有许多重要的功能膜蛋白被这一方法得以分离纯化。

参 考 文 献

- [1] Huang, C. H.: *Biochemistry*, 1969, 8, 341.

EB病毒受体研究进展

程冠生

(湖南医科大学生物物理教研室,长沙)

提 要

EB病毒与人类多种恶性肿瘤有关,此病毒识别、结合并进入靶细胞与细胞膜上的EB病毒受体有密切关系。近年来发现此受体即补体受体CR2。本文介绍了研究EB病毒受体的方法、受体的分布、与补体受体CR2的关系、受体的功能以及EB病毒进入细胞的途径。

1964年 Epstein 用电子显微镜直接观察到一种非洲淋巴瘤(Burkitt lymphoma)的淋巴母细胞EB-1株中有一种新型疱疹病毒,即EB病毒(*Epstein-Barr Virus*, EBV)。这种病毒是一种淋巴增殖性疾病——传染性单核细胞增多症的诱因,与人类恶性肿瘤: Burkitt淋巴瘤、鼻咽癌、唾液腺和胸腺淋巴上皮癌有关,能在体外转化B淋巴细胞以及各种起源于B细胞的淋巴母细胞株。

EBV感染靶细胞涉及一系列过程,其中病毒与细胞的识别、结合以及跨越细胞膜进入细胞的过程是两个重要的早期事件。关于这些早期事件是否与受体有关,曾有几种不同观点。对

于B淋巴细胞,已经肯定在细胞膜上有EBV受体^[1],但对于上皮细胞,一种观点认为EBV不能直接感染上皮细胞,而是通过感染了EBV的淋巴细胞与上皮细胞融合,使EBV基因进入上皮细胞^[2]。但有人不同意这种观点,因为如果发生这种融合就应出现四倍体细胞,但还未发现过这种细胞。第二种观点是通过假粒子(pseudotype particle)进入上皮细胞,认为上皮细胞缺乏EBV受体,EBV不能直接进入;但当两种病毒混合感染时,形成一种假粒子,即由EBV核壳体和第二种病毒的包膜组成新的病毒颗粒,上皮细胞若有这第二种病毒的受体,则EBV基因能借助此受体进入上皮细胞^[3]。第

- [2] Rosenberg, R. L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 1239.
- [3] Szoka, Jr. F. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, **75**, 4194.
- [4] Deamer, D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **443**, 629.
- [5] 谢静平等:《生物化学与生物物理进展》1987, 4, 66.
- [6] Olson, F. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **557**, 9.
- [7] Hope, M. J. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, **812**, 55.
- [8] Lasie, D. D. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, **896**, 117.
- [9] Kasahara, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1977, **252**, 7384.
- [10] Kagawa, Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1971, **246**, 5477.
- [11] Laird, D. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1986, **261**, 14844.
- [12] Kramer, R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, **863**, 289.
- [13] Scotto, A. W. et al.: *Biochemistry*, 1985, **24**, 4066.
- [14] Taguchi, T. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, **729**, 229.
- [15] Brethes, D.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 1981, **210**, 149.
- [16] Rodney, J. Y. Ho, et al.: *Biochemistry*, 1986, **25**, 5500.
- [17] Connor, J. et al.: *Pharmacol. Ther.*, 1985, **28**, 341.
- [18] Goldin, S. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, 2575.
- [19] Brazilai, A. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 6521.
- [20] Chan, S. Y. et al.: *J. Neurosci.*, 1984, **4**, 1468.

[本文于1987年4月27日收到]