

特约专栏

脂质体传递系统的研究进展及临床应用概况

姜倩¹, 岳冬¹, 顾忠伟^{1,2}

(1. 四川大学 国家生物医学材料工程技术研究中心, 四川 成都 610064)

(2. 南京工业大学材料科学与工程学院, 江苏 南京 211816)

摘要: 从1965年人类第一次发现脂质体开始, 这种双分子层闭合囊泡耗费了漫长的时间从用于生物物理研究到成为生物医药领域的重要传递系统。纳米尺度, 生物膜相似的结构, 优良的生物相容性等特点都是脂质体作为传递系统的优势, 特别是其易于进行表面改性的表面高密度功能基团对脂质体的优化极为有利。脂质体作为药物传递系统是通过利用脂质分子的双亲性将亲水性药物或者疏水性药物包载于囊泡的内部水相或者脂质膜中。此外, 阳离子脂质分子具有压缩基因或者吸附蛋白质的能力, 故其又可以作为生物大分子载体加以利用。而装载了MRI(核磁共振成像)分子探针、NIR(近红外光谱技术)分子探针或者其他诊断试剂的脂质体还可用于疾病诊断。脂质体共载体体系则是充分利用脂质体的荷载能力, 将多种治疗剂或者分子探针装载于同一传递系统中, 以达到协同治疗或诊疗一体的目的。系统地论述了脂质体的设计与优化、内容物的选择以及目前的临床应用现状。

关键词: 脂质体; 药物传递; 生物大分子传递; 分子探针; 共载体体系

中图分类号: R944.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-3962(2017)11-0813-14

Advance in Research and Clinical Application of Liposomal Delivery Systems

JIANG Qian¹, YUE Dong¹, GU Zhongwei^{1,2}

(1. National Engineering Research Center for Biomaterials, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(2. College of Materials Science and Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China)

Abstract: Since the pioneering observation of Alec Bangham that phospholipids in aqueous systems can form closed bilayered structures in 1965, liposomes have moved a long way from being just another exotic object of biophysical research to becoming a pharmaceutical carrier of choice for numerous practical applications. The speciality of liposome is beneficial as delivery systems, such as nanoscale, mimetic biomembrane structure, better biocompatibility and facile modification at surface. In light of amphipathicity, water-soluble drug and water-insoluble drug can be loaded into aqueous liposome interior and the liposomal membrane, respectively. Furthermore, liposome also can be used as gene delivery system because of its cationic surface charge. And molecular probes loaded liposome can be used for diagnosis. In addition, liposome can load with two or three therapeutic agents for synergistic treatment and/or molecular probes for theranostics. In this paper, the structural design, therapeutic agent and clinical application of liposomal delivery system were summarized and commented.

Key words: liposome; drug delivery; biomacromolecule delivery; molecular probe; co-delivery

1 前言

50多年前, 英国人 Alec Bangham^[1]发现了磷脂分子在水中自发形成闭合的双分子层囊泡。之后的研究者发

现通过利用囊泡不同部位的亲和性可以将亲水性或亲脂性药物包载于脂质体内部水相或者双分子膜相中, 将脂质体引入了药物或者基因治疗的领域。脂质体作为一种载体, 具有的类细胞膜结构、高生物相容性、低免疫原性、能保护药物或者活性基团、延长药物半衰期、增效减毒等一系列优势, 也使其在随后的50年发展中备受瞩目。为了获得更加优异的脂质体传递系统, 人们开始在经典脂质分子的基础上进行结构变化、表面修饰以获得具有不同生物效应的新型脂质体, 大大拓展了脂质体在

收稿日期: 2017-02-11

基金项目: 国家自然科学基金(51133004, 81361140343)

第一作者: 姜倩, 女, 1990年生, 博士研究生

通讯作者: 顾忠伟, 男, 1949年生, 教授, 博士生导师, Email: zwgu1006@hotmail.com

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.2017.11.02

些结构特定的脂质体, 仍然会出现一些特例, Tang 和 Hughes^[15]曾报道过, 具有单尾的 6-(2, 5-二氨基-戊酰氧基)己酯却有着比双尾的 DOTAP 更高的转染效率和更低的毒性。除了碳氢链数量会影响载体效能外, 尾部的长度和饱和度同样是重要的影响因素。Koynova 等^[16]合成了一系列具有不同长度和不同饱和度碳氢链尾部的脂质分子, 并对它们的生物学效应进行评价, 发现随着尾部长度和不饱和度的增加, 载体的转染效能也随之增加。Obata 等^[11]也发现了相似的现象。

Li 等^[10]通过比较 3 种胆固醇衍生物 (lysinylated cholesterol, histidinylated cholesterol 和 argininylated cholesterol) 的基因转染能力 (如图 2 所示), 发现以胆固醇为尾部的脂质体的转染效率高于 DOTAP 几十倍。但是大部分的胆固醇类衍生物脂质分子都是蛋白质激酶 C (protein kinase C, PKC) 的抑制剂, 而 PKC 是一种与细胞毒性相关的激酶。因此, 胆固醇类衍生物脂质分子一般都具有较大的细胞毒性。Kawakami 等^[17]所合成的半乳糖化的胆固醇衍生物 Gal-C4-Chol (cholesten-5-yl-oxyN-(4-((1-imino-c-β-D-thiogalactosyl-ethyl) amino) butyl) formamide) 则在人肝癌细胞 (HepG2) 实验中表现出较低的细胞毒性, 说明了通过独特的设计也能有效的降低胆固醇衍生物带来的细胞毒性。

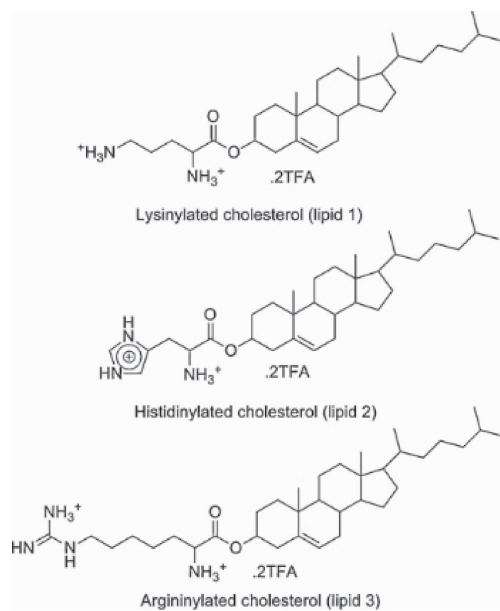


图 2 以氨基酸为头部的阳离子脂质体结构示意图^[10]

Fig. 2 Chemical structure of amino acid-based cationic lipids^[10]

2.3 脂质分子的连接键

通常连接脂质分子亲、疏水端的连接键都是酯键、醚键以及酰胺键。其中以醚键作为连接键的脂质分子具有较高的转染效率, 但由于醚键过于稳定, 不易降解的

特性却增加了脂质体的细胞毒性。相较而言, 以酯键及酰胺键作为连接键的阳离子脂质体 (如, DOTAP 等) 则具有更好的生物降解性和更低的细胞毒性^[18-20]。对比稳定的 PEI 载体, Xu 等^[12]所合成的以酰胺键连接的脂质分子所具有的不仅是更强的基因传递能力, 还有更高的细胞存活率 (大于 90%)。在体内循环时, 以此为链接键的脂质体存在被体内酰胺酶和酯酶降解的可能性, 这一点在科学及临床研究中也是不可忽视的^[21]。

为了在保证脂质体体内稳定性的同时, 进一步降低其细胞毒性, 在脂质分子的结构中加入环境响应型连接键。这类脂质体能在正常组织环境中保持稳定, 而在特定的环境下通过环境敏感键的响应完成治疗剂的定位释放以及生物降解。早在 1998 年, Tang 和 Hughes^[22]就尝试在阳离子脂质分子中加入二硫键。这种脂质分子所构成的脂质体可以在含有较高谷胱甘肽浓度的肿瘤细胞中进行定向的降解和释放基因, 其转染效率是 DOTAP/DOPE 组成的脂质体的 50 倍。这种结构在近些年来依然应用广泛, 例如 Wang 等^[23]设计的脂质体递药系统同样也是利用二硫键在细胞内的断裂来释放所荷载的药物。同时, 利用正常组织、肿瘤组织以及细胞内含/溶酶体之间的 pH 阶梯式变化, 设计出能够在低 pH 条件下降解的脂质体更是数不胜数, 常用的 pH 敏感型连接键有原酸酯键^[24]、氨基甲酸酯^[25]、胺键^[26]等。

3 脂质体的功能化修饰

由于机体炎症部位或者实体瘤的血管内皮细胞排列不如正常组织致密, 因此脂质体可以穿过血管壁对炎症部位或者实体瘤进行渗透, 即高通透性和滞留效应 (Enhanced Permeability and Retention Effect, EPR 效应)。但要利用该效应, 首先要保证脂质体能长久而稳定地参与体循环。但是阳离子脂质体在体内循环时会与血浆蛋白发生非特异性吸附, 且存在易降解、易被巨噬系统清除、靶向性不高等问题, 因此很多脂质体虽然在细胞实验中表现出不俗的效果, 但是却很难应对复杂的体内环境。近些年来人们为了获得在体内有效的脂质体, 开始对脂质体的功能进行进一步的优化。

3.1 PEG 化

由于进入体循环的阳离子脂质体与负电性的血浆蛋白相互作用, 导致其易被单核-巨噬细胞系统 (Mononuclear Phagocyte System, MPS) 摄取而使血药浓度快速下降, 最终蓄积于肝脏和脾脏等器官中。显然, 这一现象不仅减少了药物在靶组织 (非 MPS 相关组织) 的分布, 而且还会对蓄积器官造成一定损伤。为了解决这一问题, 人们首先尝试了预注射大量的空白脂质体的方法以封闭 MPS,

再注射载药脂质体的方式增加脂质体在体内的循环半衰期。Kao 等^[27]通过考察 Tc 标记的脂质体的体内分布情况,发现 MPS 封闭组的组织放射性强于未封闭组 1.5 倍之多,同时每克肿瘤的放射强度是其他组织的 2 倍。

但对于临床治疗来说,封闭法并非最佳的解决办法,因而改变脂质体性质以延长体内循环时间就成为了研究的重点。由于脂质体与体内蛋白产生的非特异性吸附作用是其被快速清除的潜在因素,因此首先考虑屏蔽脂质体的电荷。基于此思路,Blume 等^[28]和 Klibanov 等^[29]取得了里程碑式的进展。他们率先使用聚乙二醇(Polyethylene Glycol, PEG)修饰脂质体,PEG 分子可在脂质体表面形成空间立体组层,从而屏蔽了正电荷与蛋白质的相互作用,降低其被 MPS 识别摄取的概率,显著延长了脂质体在体内的循环时间,故被称为“长循环脂质体”。Nie 等^[30]也发现 PEG 化的阳离子脂质体(CL)和阴离子脂质体(AL)的体内循环时间和稳定性均高于中性脂质体(NL),且 CL 和 AL 荷载了阿霉素(DOX)产生的抑瘤效果同样优于 NL(70% vs 45%, $p < 0.05$, 如图 3 所示),说明 PEG 化的脂质体更适应体内环境,而延长体内循环时间的脂质体更易通过 EPR 效应在肿瘤部位富集。另外,其他类似的聚合物如聚乙烯吡咯烷酮、聚丙烯吗啉、聚丙烯酰胺、聚(2-乙基-2-噁唑啉)、聚(2-甲基-2-噁唑啉)等也可制备长循环脂质体。

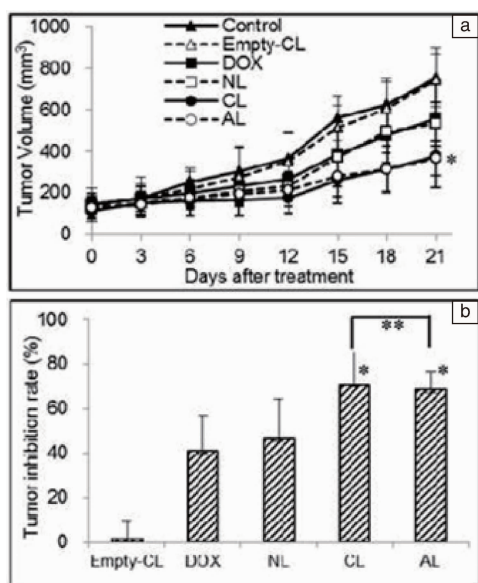


图 3 静脉注射荷载 DOX 的 PEG 化脂质体后,小鼠的肿瘤体积变化(a)和抑瘤率(b)^[30]

Fig. 3 *In vivo* anti-tumor activity of liposomes after *i. v.* injection of different DOX-loaded PEGylated liposomes with DOX.

The tumor volume in different treatment groups.

(* $p < 0.05$ vs control group) (a). Tumor inhibition rates of various formulations (b)^[30]

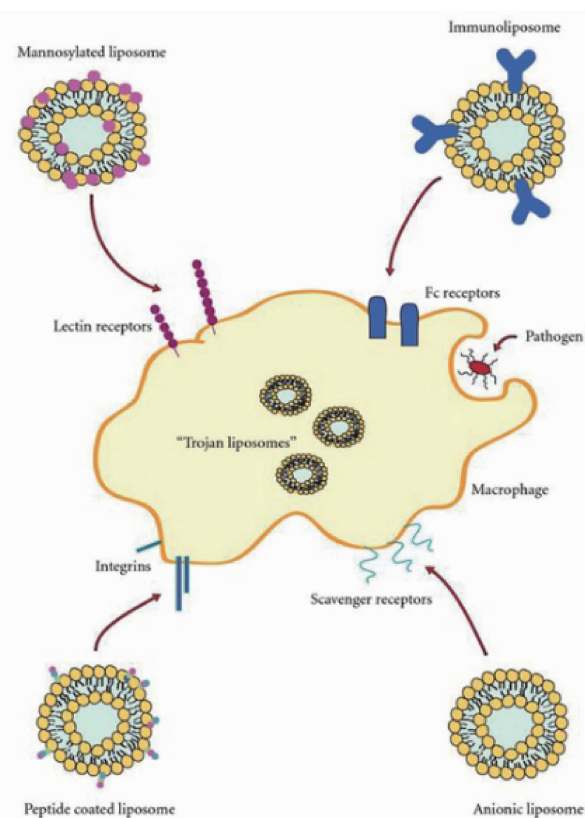
PEG 化脂质体不仅解决了脂质体易被 MPS 系统清除的问题,还避免了或者极大程度上减轻了脂质体的免疫原性。但是 PEG 化脂质体也有不可否认的缺陷,比如 PEG 外壳如果无法及时在肿瘤组织脱去,会严重影响细胞吞噬效率低或导致溶酶体逃逸失败^[31]。除此之外,Dams 等^[32]还发现 PEG 化脂质体具有“加速血液清除”(ABC)现象,这种现象发生于大鼠首次静脉注射 PEG 化脂质体后,间隔一定时间再次注射该脂质体时,其药代动力学行为会发生异常的改变。Zhao 等^[33]的研究表明,ABC 现象在首次皮下注射 PEG 化脂质体后,间隔 7 d 进行二次静脉注射也会被诱发,并且皮下注射诱导产生的 ABC 现象比静脉注射的更为强烈。该现象的产生不仅会极大减弱 PEG 化制剂的长循环优势,而且还会由于其药动学行为的改变使得包封药物、基因等在体内产生严重毒副作用,因此采取一定措施减弱或消除 ABC 现象对 PEG 化载体来说迫在眉睫。

3.2 特异性主动靶向

鉴于脂质体本身的特性(如,粒径,表面电位以及形状等),可利用脂质体易被单核-巨噬细胞系统摄取使得脂质体靶向 MPS 相关器官(如肝脏或者肾脏),或者利用毛细淋巴管的基底膜不完整或缺失造成的上皮细胞间隙通透性富集脂质体于淋巴组织。但对于实体瘤来说,仅仅只靠 EPR 效应是无法保证药物在肿瘤组织的蓄积量^[34, 35]。因此在脂质体上修饰与靶细胞特异性或非特异性结合的分子(如抗体、多肽等),利用抗原-抗体、受体-配体作用机制完成主动识别靶组织和/或靶细胞。下面分别介绍抗体、叶酸、多糖、蛋白和多肽以及寡核苷酸适配子等常用靶向分子(如图 4 所示)。

抗体是最早被应用于主动靶向脂质体设计中的。在 1975 年就有报道 IgM 修饰的脂质体的入胞效率高出于无修饰组的 100 倍^[37]。这种修饰了单克隆抗体或其片段的脂质体又称为“免疫脂质体”,其通过利用抗体与抗原的特异性结合将脂质体靶向目的组织,并识别表面过度表达抗原的靶细胞。常用于修饰的抗体可分为 3 类:完整抗体、抗体片段和单链抗体(scFv)。三者之中,由于抗体片段在具有免疫原性低,性质易控等优点的同时,依然能特异性结合细胞表面抗原,而更为常用^[35]。还有报道表明由于抗体片段修饰的脂质体具有良好的药物代谢分布和较长的血液循环时间,使得脂质体更易渗透入实体肿瘤组织^[38]。

鉴于叶酸分子与细胞膜上表达的叶酸受体或叶酸结合蛋白之间具有极高的亲和力($KD \sim 10^{-9}$),使之成为了在靶向传递中应用最为广泛的配体之一^[35]。加上叶酸受体过量表达于卵巢癌、子宫癌、骨肉瘤、脑膜瘤等各

图 4 主动靶向脂质体的入胞示意图^[36]Fig. 4 Schematic of liposomal targeting strategies to macrophages^[36]

种癌细胞上而正常组织表达较少，所以 Patil 等^[39]制备了修饰有叶酸分子的丝裂霉素 C 脂质体，并应用于过表达叶酸受体的 KB HiFR 细胞系，结果表明加入靶向分子的脂质体所表现的细胞杀伤力强于未修饰脂质体。

由于人体某些组织细胞膜上还大量表达能与糖基特异性结合的受体，所以可在脂质体双分子层中掺入多糖制备出的糖基脂质体。可掺入的多糖包括半乳糖、透明质酸、甘露(聚)糖衍生物、支链淀粉、右旋糖苷等。其中一个例子就是 Ravar 等^[40]利用覆盖了透明质酸的脂质体成功增强了细胞对紫杉醇脂质体的内吞作用，并在小鼠的体内试验中发现靶向脂质体在肿瘤组织处的蓄积量高于单纯药物或者无靶向组。

蛋白类靶向分子中最具代表性的是转铁蛋白 (Transferrin Receptor, TfR)，它是一种大量表达于代谢旺盛且需要大量铁的组织如肿瘤细胞、血脑屏障的细胞膜糖蛋白^[41]。Leto 和同事^[42]将亲水的转铁蛋白和亲脂的青蒿素共价连接形成双亲性脂质分子，其构成的脂质体在回盲肠癌细胞 HCT-8 中表现出的内吞效率和细胞毒性均高于无转铁蛋白修饰的脂质体，说明 TfR 确实能显著增加脂质体对癌细胞的靶向性。而多肽作为配体分子，相比于大分子量的蛋白质具有易制备、免疫原性低及稳定性高

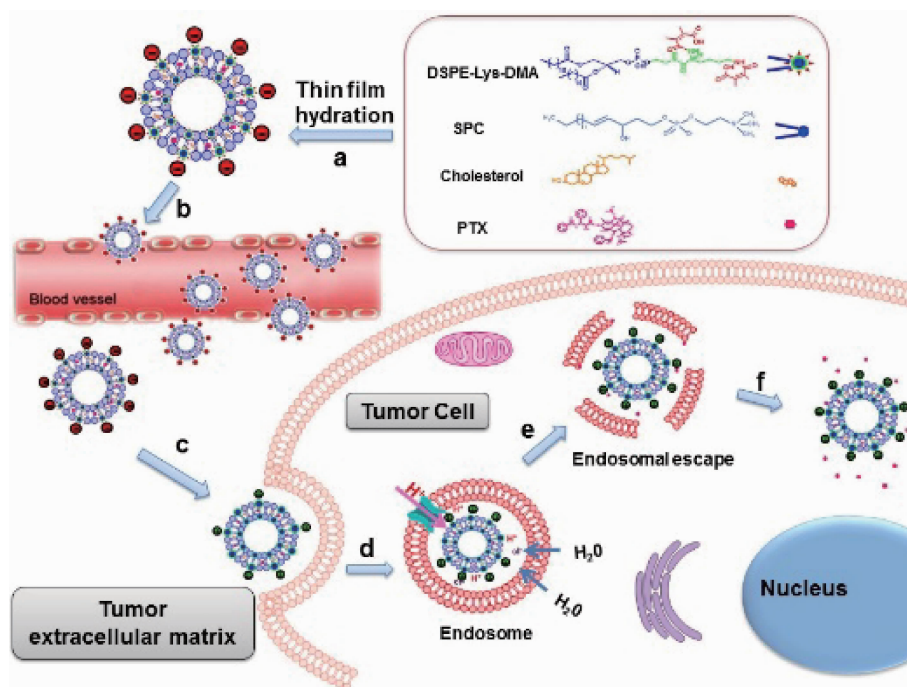
的特点^[2]。 $\alpha_v\beta_3$ 整合素是一种高表达于肿瘤细胞并参与血管再生的常用受体^[43]。而与之对应的是精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)多肽。Sonali 等^[44]制备了 RGD 多肽修饰的药物-分子探针双载脂质体(RGD-TPGS)，评价其在小鼠体内的脑靶向效果。结果显示注射 RGD-TPGS 2 和 4 h 后的脑组织荧光强度分别是无靶向组的 6.47 和 6.98 倍，说明修饰 RGD 会明显增强脂质体的靶向效果。

使用寡核苷酸适配子作为靶向配基是一种革新的技术。寡核苷酸适配子是一种来源于 RNA 或者 DNA 的寡核苷酸短链(~15kD)。由于寡核苷酸适配子具有分子量小、缺乏免疫原性、更易进行肿瘤渗透和靶向以及不会被化学修饰改变亲和力等优势，使其在靶向脂质体的设计中具有极高的潜力^[35]。

3.3 环境敏感

在脂质体传递治疗剂的过程中，所处的微环境会出现动态变化，因而很多新型脂质体依据这些微环境变化(如机体自身的 pH、酶、温度等)而使其在特定病灶组织释放荷载物，这被称为“触发释放”。从脂质体进入机体血液循环开始，到将荷载物传递入细胞质或细胞核为止，微环境会出现如下变化：①两次 pH 梯度式降低，包括从周围正常组织进入肿瘤组织的 pH 变化(肿瘤组织 pH < 6.5，正常组织 pH ~ 7.4)和载体进入细胞内含体/溶酶体后 pH 再次下降(pH < 5.5)^[45]；②血浆(2.8 μ M)与细胞质(1 ~ 10 mM)之间还原型谷胱甘肽(GSH)浓度的差异^[46]；③肿瘤组织高表达磷脂酶 A2、组织蛋白酶或基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP)等^[47-49]。

pH 敏感型脂质体是应用较广泛的一种环境敏感型脂质体。因为 pH 敏感型脂质体可以通过结构设计改变响应方式从而实现不同的功能。①在脂质体中加入最经典的 pH 敏感脂质——DOPE 及其衍生物，这种脂质体能够在内含体环境下发生层状至六角状的相变($L\alpha \rightarrow H_{II}$)，继而破坏内含体膜，增加脂质体逃出溶酶体的概率^[50, 51]。②在脂质体中加入或者修饰能够具有“质子海绵效应”的基团或分子。例如 Shigeta 等^[52]设计了一种用组氨酸修饰的阳离子脂质体，由于组氨酸的咪唑环在 pH 6.0 左右会质子化，继而胀破内含体膜，避免了 DNA 在内含体中的降解，增强了 DNA 的转染效率。③pH 响应型电荷翻转脂质体。如图 5 所示，Jiang 等^[53]使用二甲基马来酸酐(DMA)修饰的 DSPE 制备成荷载紫杉醇的脂质体(DSPE-Lys-DMA, DLD)。负电性的 DMA 在微酸环境中可以与阳离子氨基脱离，使得脂质体在肿瘤组织处发生负电荷到正电荷的电荷翻转，因而利于 DLD 在 pH 6.8 时与负电性细胞膜吸附以增加入胞量。④pH 降解脂质体，在“脂质体的结构设计”一节已有具体论述。

图 5 pH 敏感型脂质体的递药示意图^[53]Fig. 5 Schematic design of pH-sensitive Trojan horse liposomes for tumor drug delivery^[53]

对于还原敏感型脂质体的报道虽然也相当多,但是主要为加入二硫键的还原降解脂质体,在“脂质体的结构设计”一节已有具体论述。然而, Yue 等^[54]对以二硫键(OEI-SSx)和二硒键(OEI-SeSex)为连接键的 OEI 进行对比,结果表明经过 10 mM GSH 的处理后, OEI-SeSex/DNA 复合物的粒径、电位以及形态均发生明显改变,而 OEI-SSx/DNA 复合物经过 10 μ M GSH 处理后就有相似改变,说明二硒键同样具有还原响应能力,但是其响应能力弱于二硫键。因此,可以考虑设计出含有二硒键的还原敏感型脂质体。

由于 MMP 在肿瘤组织中特异的高表达,且 MMP-2 和 MMP-9 与人体肿瘤的生长都有着密切关系^[55]。因此利用 MMPs 进行酶触发释放药物可提高抗肿瘤效率。Ji 等^[56]合成了用 β -环糊精修饰的 MMP-2 敏感型脂质体,其进入肿瘤组织后被 MMP-2 酶分为两个功能基团,一为可以释放抗纤维化药物的 β -环糊精,一为可以释放化疗药物的 RGD 修饰的脂质体。这种脂质体在星状胰腺细胞中能够明显增强药物入胞的功能。

除了借助肿瘤组织与正常组织之间的环境差异来增加脂质体的靶向效率外,利用肿瘤治疗过程中产生的环境变化也是一种设计思路。例如,通过局部加热肿瘤组织至 41 ~ 45 $^{\circ}$ C 并维持数十分钟以上,可以有效杀死肿瘤细胞^[49]。而温敏脂质是一种在相变温度(Phase Transition Temperature, θ_m)时,其脂膜可由“胶晶”态转变到

“液晶”态,而脂质的脂酰链紊乱度及活动度增加,增大了膜流动性,从而加快了药物的释放。二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)就是一种典型的温敏脂质($\theta_m = 42^{\circ}$ C)。Pradhan 等^[57]按 80:20:4.5:0.5 的摩尔比混合 DPPC:胆固醇:DSPE-PEG2000:DSPE-PEG2000-Folate,所得到的脂质体可以在荷载的磁性材料产生磁热疗时释放其荷载的药物,从而进一步增加对肿瘤细胞的杀伤力。

3.4 多功能化脂质体

虽然以上所介绍的单一功能化脂质体均表现出较好的传递效率,但是由于机体内环境的变化是复杂多变的,单一功能化并不能完全应对传递过程中的障碍。因而越来越多的研究者将不同功能化方法进行合理的叠加,使得脂质体能够更加智能地应对复杂的机体环境,从而达到更佳的治疗效果。

比如上文所介绍的 PEG 化导致入胞率降低或者溶酶体逃逸的问题,就可以联合其他的环境敏感键来解决。Nie 等^[58]使用脲键将 PEG 和胆固醇类脂质体连接合成出 OPSS-PEG-HZN-Chol,这种脂质体在低 pH 的内含体/溶酶体中处发生脲键断裂而去 PEG 化。根据实验结果可知 OPSS-PEG-HZN-Chol 与 PEI/DNA 复合物组成的纳米粒在 pH 5.5 时仅 30 min 就可以完成去 PEG 化,并利用暴露氨基的“质子海绵效应”逃出溶酶体,其转染效率高于是非敏感纳米粒 40 倍的。这种环境敏感型 PEG 化不仅延长了脂质体的体内循环时间,还避免了 PEG 化导致的入胞率

降低或者溶酶体逃逸。而 Xu 等^[59]和 Chen 等^[60]也发现了设计为环境敏感型的 PEG 化脂质体可以有效减弱重复注射导致的 ABC 现象,甚至不会诱导产生该现象。

除此之外, Zhang 等^[61]合成了两种由不同功能的脂质分子组成的仿病毒载体: DMA 修饰氨基的电荷翻转脂质分子和生物素化的靶向脂质分子(如图 6)。通过测试 DMA 修饰脂质分子在不同 pH 环境下的粒径、电位以及分子层面上的变化,证明了其确实具有 pH 响应型电荷翻转能力。两者混合制备成的荷载阿霉素双功能脂质体(D-CTVMs)在生理环境下稳定存在,且负电荷外围避免了蛋白非特异性吸附。当环境 pH 降低后, D-CTVMs 发生电荷翻转,从而增加入胞量,加之利用生物素与细胞受体结合进一步增加了载体的肿瘤靶向、滞留以及内化能力。D-CTVMs 在小鼠乳腺癌 4T1 细胞中表现出优于单一功能化脂质体的入胞效率和细胞毒性,并在小鼠体内抑瘤实验中表现出更高的肿瘤靶向性和更强的抑瘤率。

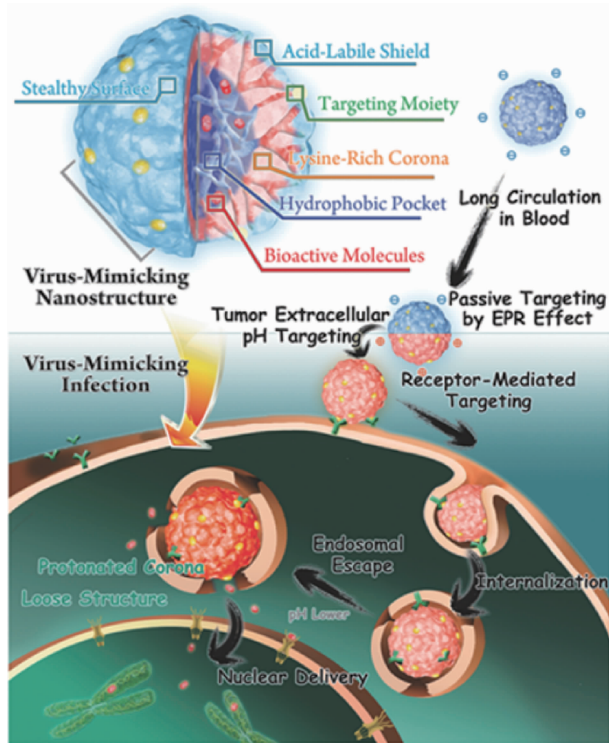


图 6 脂肽组成的仿病毒纳米粒的作用机理^[61]

Fig. 6 Schematic illustrations for virus-mimicking nanostructures assembled from specially made dendritic lipopeptides^[61]

在肿瘤化疗过程中,多药耐药性(Multidrug Resistance, MDR)的存在会阻碍药物产生治疗效果。MDR 按照产生机理可以分为获得性 MDR 与固有性 MDR,其中获得性 MDR 主要是由于细胞过表达药物外排泵,而固有性 MDR 则与线粒体相关。因而, Jiang 等^[62]将 DMA 修饰的促凋亡多肽 D[KLAKLAK]₂(KLA)与 DSPE 共价连接合

成一种具有 pH 响应和线粒体靶向双功能的脂质体 DSPE-KLA-DMA。在肿瘤组织环境(pH 6.8)中,荷载紫杉醇(PTX)的 DSPE-KLA-DMA 不仅可以通过电荷翻转大幅增加人肺癌细胞耐药株(A549/Taxol)对 PTX 的摄入量,而且被激活的 KLA 多肽促进脂质体选择性聚集于线粒体并定向释放 PTX。在体内试验中, DSPE-KLA-DMA 对耐药肿瘤的抑瘤率可以达到 86.7% 之高。

以上的实验结果都说明将多种功能赋予脂质体后,确实有助于解决脂质体在传递过程中所遇到的各种阻碍,表现出更好的生物医学应用潜力。

4 脂质体的生物医学应用

4.1 脂质体作为药物载体

脂质体一般在水中所形成的囊泡,其直径一般在 25 ~ 500 nm 之间,膜壁厚度在 5 nm 左右。而利用药物的亲/疏水性,或将亲水性药物包载入脂质体内部的水相,或将疏水性药物插入脂质分子构成的双分子层中。而且通过调节脂质分子亲/疏水部分的比例,可以改变囊泡的形态,从而增加对不同药物的荷载量^[63]。脂质体作为药物载体,①增加疏水性药物的溶解性;②增加药物在体内的稳定性;③延长治疗剂的释放时间;④降低了正常组织对药物的摄取,一定程度上减少了治疗剂的副作用;⑤通过对脂质体进行功能化修饰,从而增加患病部位对药物敏感性、定点释放药物以及增加细胞对药物的吞噬量^[64]。

一般来说,因为水溶性小分子药物本身的性质,较少采用脂质体包载。但对于疏水性小分子药物来说,利用脂质体的协助更有利于溶解、缓释以及定位释放。一般脂质体所荷载的亲脂性药物分为抗感染药物和抗肿瘤药物两大类,尤其抗肿瘤药物脂质体是近年来研究一大热点。早在 20 世纪 70 年代开始,就已经有关于制备荷载阿霉素(Doxorubicin, DOX)脂质体的报道^[65]。除此之外,紫杉醇、喜树碱、多西他赛等抗肿瘤药物均可作为脂质体的内容物。但是由于这些第一代脂质体,或者说经典脂质体都有着体内非特异性吸附、易被 MPS 系统清除等问题,现在研究的重点都放在多功能化的载药脂质体上。Shi 等^[66]就设计了一种多功能脂质体荷载紫杉醇(PTX)治疗黑色素瘤。他们将 pH 敏感型穿膜肽(TH)和 RGD 肽串联后修饰于 PEG-DSPA 制备了能够靶向过表达 $\alpha_v\beta_3$ 黑色素瘤细胞(B16F10)并在肿瘤组织环境下启动穿膜功能的脂质体(TR-Lip)。TR-Lip 在 pH 6.5 时的入胞效率分别是 PEG-、RGD-和 TH 修饰脂质体的 41.67、30.67 和 11.90 倍,充分说明了在 TH 和 RGD 协作下的脂质体入胞效率远高于单一多肽修饰的脂质体,同时也将 PTX

对黑色素瘤细胞的杀伤力提高了近两倍。对建立 B16F10 黑色素瘤模型的小鼠进行抑瘤实验,结果显示荷载 PTX 的 TR-Lip 的抑瘤率为 85% 且小鼠的生存率明显高于其他实验组。以上的体外及体内实验都说明 TR-Lip 这类多功能化的脂质体都有潜力成为高效的药物传递体系。

通过对脂质体进行功能化修饰,可以在一定程度上解决传递过程中所遇到的生理障碍,但是提高药物的包封率、减小体内传递过程中的渗漏却同样是阻碍脂质体实际应用的关键问题。传统上,人们多采用的是被动载药法(Passive Loading),即先将药物和载体材料溶于有机相中,然后按一定的方法制备载药脂质体。由于这种载药方法受油水分分配系数,介质 pH 和离子强度等影响较大,因而对于弱酸弱碱类的两亲性药物来说,所得脂质体的载药量较低。并且被动载药法还有可能造成不同批次的载药量不一致。因此, Nichols 等^[67]在前人跨膜浓度梯度测量细胞和细胞器 Δ pH 的启发下,发明了 pH 梯度法以制备出了高载药量的儿茶酚胺脂质体。利用脂质体内外水相的离子或化合物梯度进行的主动载药法(Active Loading)能提高脂质体对两亲性药物的包封率,减少药物渗漏,同时克服了被动载药早期突释的不良因素。目前常用的主动载药方法包括 pH 梯度(pH Gradient)法、胺(铵)离子梯度(Ammonium ion Gradient)法、醋酸钙梯度(Calcium Acetate Gradient)法和细胞离子载体(Ionophore Drug Loading)法。但是以上的主动载药法均需要改变制备介质的 pH 值或者离子强度,反而限制了在某些功能化的脂质体中的应用,例如 pH 敏感型脂质体等。因而,有些研究者将疏水性药物作为脂质体的尾部合成了一种新型脂质体——药质体(Pharmacosomes, PS)。比起普通脂质体,药质体可以大幅提高载药量,防止药物在传递过程中渗漏,无需除去游离药物,生产制备方便,同时还可以利用这种脂质前药达到缓控释药物的目的。Ai 和同事^[68]合成了地达诺新的药质体,利用透射电镜和原子力显微镜观察其形态和粒径,并通过大鼠体内分布实验证明该药质体可以进行肝靶向且在靶组织处的半衰期为 10 d。

4.2 脂质体作为生物大分子载体

随着越来越多与疾病相关的基因被发现,能够从分子水平上修复、置换或者纠正异常基因的基因治疗也逐渐被人给予厚望,但是鉴于病毒载体的高免疫原性和病毒复制不可控等风险,这就为非病毒载体的发展开辟了道路。据此,阳离子脂质体作为极有潜力的非病毒基因载体而逐渐被人所重视。

4.2.1 脂质体作为 DNA 载体

最初,基因治疗的研究对象是 DNA,而常用的基因

载体就是传统阳离子脂质体。传统的阳离子脂质体是由脂肪酸或胆固醇类衍生而来,包括上文所述的 DOTAP、DSPE、DOTMA 等。除了这些供正电荷的脂质外,作为转染的阳离子脂质体还会加入中性脂质 DOPE、磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)、中性磷脂酰胆碱 PC 或胆固醇等辅助脂质。辅助脂质的加入可以帮助稳定阳离子脂质膜结构,对抗血清中蛋白质对膜的破坏,一定程度上减小电荷比率而降低毒性。特别是 DOPE 的相变有利于基因在转染过程中逃出溶酶体,增加转染成功率。Lipofectamine 2000 就是一种用于基因转染的典型的商品化阳离子脂质体。鉴于传统脂质体的细胞毒性、体内易清除等问题,各种生物启发型或者仿病毒脂质体被设计出来。有研究表明含有大量精氨酸的穿膜肽是病毒表现出高转染性的原因之一,而 Xu 等^[12]就在此启发下,设计了一种以富含精氨酸的树状大分子为头部的新型脂质组装体(AVN)。载体所荷载的基因可以在精氨酸的保护下避开体内 DNA 酶的降解,利用精氨酸的胍基与膜磷脂成氢键加强载体的穿膜能力完成溶酶体逃逸(如图 7 所示),最后酰胺键在细胞质中降解并释放 DNA,完成整个转染过程。这种 DNA 载体在体外细胞转染实验中表现出优良的转染效率以及良好的生物相容性。之后, Jiang 等^[13]使用相同的载体进行瘤内注射,发现体内转染结果依然高于对照阳离子基因载体。就像药物载体的发展历程一样,单纯阳离子载体在转染过程中会受到各种生理

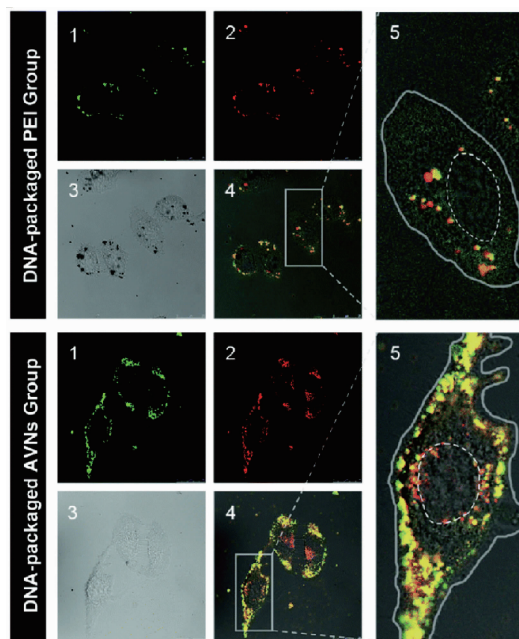


图 7 荷载荧光标记 DNA 的 PEI 与 AVN 的溶酶体逃逸实验^[12]

Fig. 7 CLSM images for intracellular delivery of the fluorescence-labelled DNA-packaged PEI and DNA-packaged AVNs in HepG2 cells for 5.0 h^[12]

屏障阻碍传递,因而为了模仿病毒的应对方法,长循环脂质体、环境敏感型脂质体、生物靶向型脂质体以及仿病毒式多功能化载体被设计出来,且均不同程度的优化了脂质体的基因转染效率。

4.2.2 脂质体作为 RNA 载体

DNA 作为治疗剂有着分子量大,不易荷载,必须入核进行转录等不利因素, RNA 干扰 (RNAi) 治疗法作为基因治疗的另一种选择逐渐为人所瞩目^[69]。RNAi 是一种通过使用包括 small interfering RNA (siRNA), short hairpin RNA (shRNA), mRNA 以及 micro RNA (miRNA) 等双链 RNA 对机体中序列特异的的目的基因进行下调或者沉默,迅速阻断基因活性从而治疗疾病的方法。

siRNA 通常由 19 ~ 23 个碱基对构成,其 3' 端有两个核苷酸组成悬臂^[70]。与 DNA 不同的是, siRNA 只需进入细胞质后可以沉默疾病相关基因达到治疗目的。即便如此,由于 siRNA 比 DNA 更易降解,直接应用会引起免疫刺激且治疗效果低,因此寻找一种高效低毒的 siRNA 载体就变得十分关键。第一篇报道利用阳离子脂质体作为 siRNA 载体的文章在 2003 年才被发表,但对成年大鼠腹腔注射和静脉注射这种荷载 siRNA 的 DOTAP 脂质体后,切片结果显示了 siRNA 能够成功被传递入各种细胞,并介导了 TNF- α 和 IL-6 的生成^[71]。自此以后,已经有 2 万多篇关于用于传递 siRNA 的阳离子脂质体的报道,暗示了阳离子脂质体已经是 siRNA 传递中的一种重要载体。

miRNA 是通常由 18 ~ 25 个核苷酸构成,它能够在体内合成并加快 mRNA 的降解,从而阻碍转录的进行^[69]。miRNA 与 siRNA 最大的不同在于,某些 miRNA 能够调控不止一种 mRNA^[72]。这使得 miRNA 比起 siRNA 更适合作为治疗剂。Takahashi 和同事^[73]使用 PEG 修饰的气泡脂质体来荷载 miR-126,这是一种能够下调血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 以促进血管生成的 miRNA。为建立下肢缺血模型的 ICR 小鼠静脉注射此脂质体并在下肢处施加诊断用超声波,由于脂质体中含有气体,当其循环至靶部位后在超声的作用下破裂并释放 miR-126。运用此方法传递 miR-126 成功诱导了缺血下肢完成血管再生以及增加了血流量。

4.2.3 脂质体作为蛋白质载体

经过 20 多年的研究,来源于蛋白质或者多肽的生物活性成分也开始作为治疗疾病的可选药物,例如酶、肽类激素以及细胞因子等。基于临床考虑,对于某些由体内酶的功能异常导致的遗传病和癌症来说,利用脂质体将酶传递到细胞质或者溶酶体中是一种重要的治疗方法^[74]。将用脂质体包载的天冬酰胺酶注射入患有天冬酰胺酶依赖型 P1543 肿瘤的小鼠体内,最终此组小鼠的生

存率比注射单纯天冬酰胺酶的实验组更高^[75]。除了蛋白质外,许多多肽也可以作为脂质体的内容物进行高效传递。Kazunori 等^[76]在荷载了胰岛素的脂质体外包裹 PEG 层,其在口服后可以利用聚合物与胃部或者肠道中粘液层的吸附而长时间停留于胃肠道,既增加了药物与胃肠道的接触时间,又通过脂质体防止多肽被酶降解。

4.3 脂质体在医学诊断中的应用

诊断用分子探针一般通过 3 种方式进行荷载与脂质体:①通过“相似相溶”原理将分子探针荷载于脂质体的水相或者有机相中;②通过“静电吸附”原理将分子探针吸附在脂质体表面;③将分子探针共价连接于脂质体上^[77]。利用经典脂质体本身性质或者功能化脂质体可以将分子探针高效定向地传递到肝、肾、脾、心血管、肿瘤以及炎症部位,并保证蓄积浓度^[78]。

核磁共振成像 (MRI) 是一种应用广泛且诊断精确的诊断成像方法。但对于某些疾病来说,单纯分子探针的使用会被生理屏障所限制。比如血脑屏障的存在阻碍了分子探针进入脑部,使得脑胶质瘤的诊断有所受限。Liu 等^[79]使用修饰了白介素 13 (IL-13) 的脂质体荷载 Gd-DTPA 制备出了 IL-13-liposome-Gd-DTPA。如图 8 所示,该脂质体在体内试验中并未显示出明显的毒性,且通过 IL-13 与脑胶质瘤细胞过表达的 IL-13 受体 $\alpha 2$ (IL-13R $\alpha 2$) 的结合,使得患病小鼠脑部 MRI 信号强度是正常小鼠脑组织的 1.15 倍,说明 IL-13-liposome-Gd-DTPA 可以穿过血脑屏障聚集于患病脑组织,并且比传统增强型 MRI 更易发现初期阶段的脑胶质瘤。

近红外成像技术不仅是可以用于诊断疾病,并且有很多研究将其作为一种外源性刺激来控制脂质体的药物释放。Yuan 等^[80]合成了一种分子结构类似 DSPE-PEG 的光热分子探针 PEG-IR780-C13 (PIC),其能够像 DSPE-PEG 一样形成具有双分子层的囊泡并包载 DOX (DOX@PIC-Lipo)。这种光敏感的载药脂质体在近红外光的照射下会产生高热并释放所荷载的 DOX,这将有利于协同治疗肿瘤以及达到诊疗一体化的目的。

4.4 脂质体作为疫苗载体

鉴于抗原或者疫苗佐剂可以通过吸附或者共价连接在脂质体,所以脂质体逐渐成为一种重要的疫苗载体。一般来说,通过肌肉注射或者皮下注射进入人体的脂质体中所包载的抗原产生免疫反应的基本过程如下:首先利用脂质体的功能渗透组织并到达淋巴系统,接着脂质体保持了抗原构像的完整性的同时,也缓慢释放抗原,释放出来的抗原与 B 细胞受体结合,从而激活了机体的免疫反应 (如图 9 所示)。除了以上过程外,还有可能通过交叉递呈,使得抗原被主要组织相容性 I 型复合体递

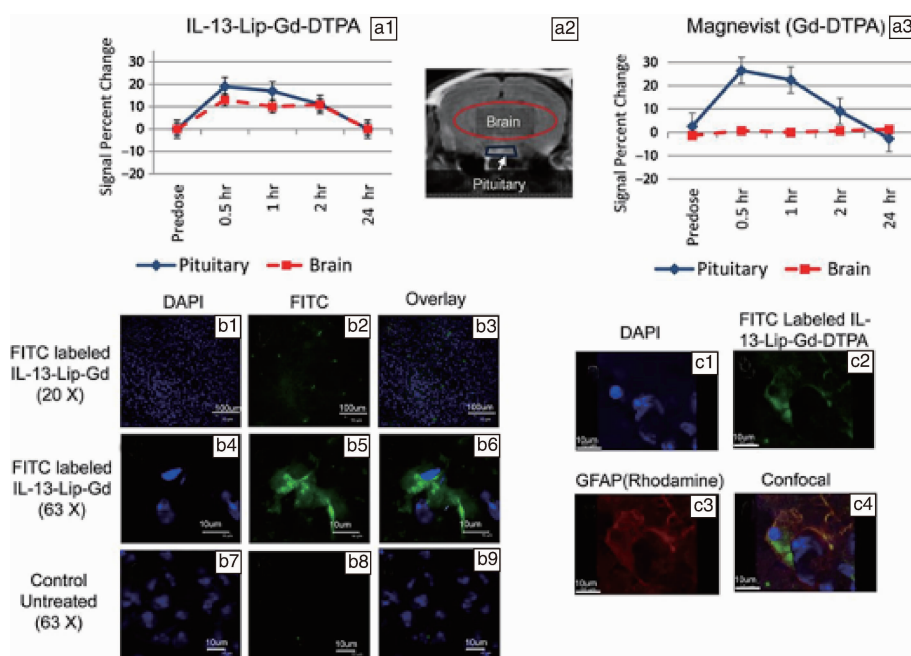


图 8 注射 IL-13-liposome-Gd-DTPA 与 Gd-DTPA 后, 小鼠脑部的 T1 信号强度(a)与脑部切片照片(b)^[79]

Fig. 8 The plots of an average signal intensity time-course measured in T1-weighted images post injections of IL-13-Lip-Gd-DTPA (a-a₁) or Magnevist (a-a₃) into the brain parenchyma and pituitary gland. Confocal microscopy images of brain slides (b)^[79]

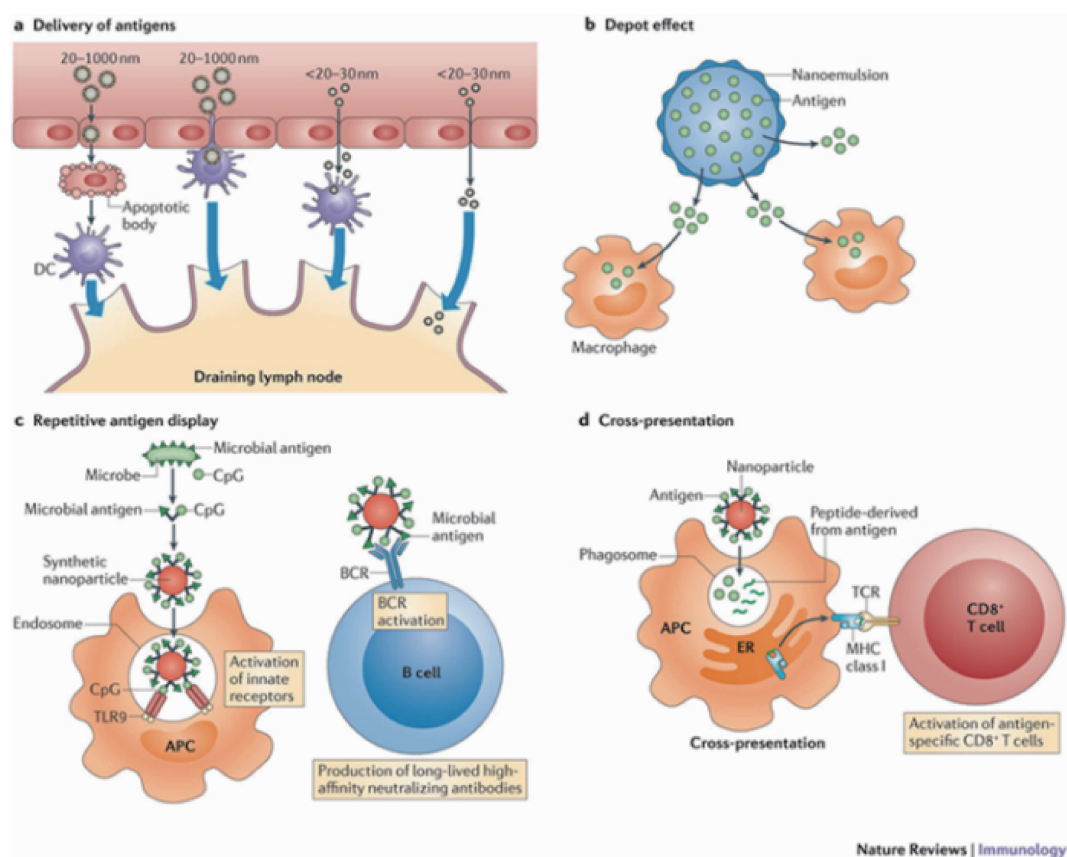
呈给 CD8⁺ T 细胞(如图 9 所示)^[81]。可作为抗原的分子多种多样, 包括多肽、蛋白质、DNA、RNA 以及糖蛋白。Yanasarn 和同事^[82]利用卵清蛋白(OVA)、阳离子化的卵清蛋白(cOVA)以及炭疽菌抗原测试了中性、正电性以及负电性三种脂质体的佐剂活性, 实验结果显示 OVA 与不同脂质体混合产生不同的抗体反应, 而 OVA 与负电性脂质体混合产生的免疫性与 OVA/正电性脂质体混合物相似。综合考虑发现负电性脂质体的佐剂活性较好, 且仅需与抗原简单混合就直接应用。

免疫佐剂是某种能够增强疫苗免疫反应的成分, 通常在与抗原一起注射或者预先注射后, 有效延长抗原的释放时间, 增加抗原与抗原呈递细胞的接触机会。免疫佐剂被分为免疫刺激剂和传递系统两大类, 而脂质体本身就是一种免疫刺激。而某些阳离子脂质体不仅可以作为传递系统, 同时还可以加强抗原的免疫反应。CAF01 就是这样一种特殊的免疫佐剂, 它是由人工合成的结核分枝杆菌索状因子糖脂 TDB 和阳离子膜脂质 DDA 组成。其中, TDB 能够通过 C 型凝集素 Mincle 结合来激活抗原呈递细胞, 从而产生强烈的 MyD88 依赖型 TH1 和 TH17 免疫反应^[83, 84]。

4.5 脂质体作为共载体系

基于治疗剂所具有的不同化学特性, 通过混合、吸附以及共价连接等手段就可以将药物、基因、分子探针或者蛋白质等荷载于脂质体的不同部位。这一特性使得脂质体十分易于制备成共载体系, 通过不同治疗剂的协同作用获得更佳的治疗作用或者达到“诊疗一体化”。通常脂质体共载体系可以分为两种: 一种是将不同的治疗剂荷载于不同的脂质体中顺序或者混合使用; 另一种是将不同的治疗剂荷载于同一脂质体中直接使用。鉴于不同脂质体在体内的最佳给药途径、作用时间以及毒性都有所差异而不利于控制其治疗效果, 更多的研究者将注意力集中在设计能够同时荷载不同治疗剂的脂质体共载体系^[70]。

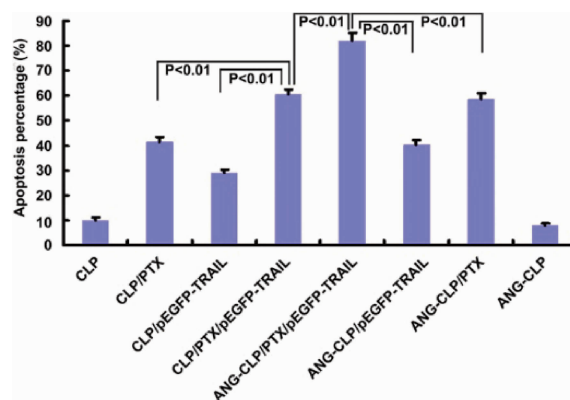
为了克服由过表达药物外排泵(例如 P 糖蛋白, P-gp)导致的获得性 MDR, Torchilin 课题组^[85]在由 EPC, CHOL, DOTAP 和 PEG2kPE 组成的长循环脂质体中同时装载了 PTX 和 P-gp 抑制剂(Tariquidar)。对用单纯 Tariquidar 和脂质体装载的 Tariquidar 处理卵巢癌细胞耐药株 SKOV-3TR 后, 后者可以有效提高细胞内染料的浓度, 说明 Tariquidar 被脂质体传递入细胞内更有利于最大程度

图 9 纳米粒介导免疫效应的机理示意图^[81]Fig. 9 Mechanisms by which nanoparticles alter the induction of immune responses^[81]

地抑制 P-gp 作用。利用脂质体将 PTX 和 Tariquidar 共同传递到 SKOV-3TR 后, Tariquidar 对肿瘤细胞 P-gp 的抑制增加了细胞内 PTX 的浓度, 最终使得 PTX 对 SKOV-3TR 的半数致死量(IC_{50})从 2743 nM(游离 PTX)降至 27.11 nM。

肿瘤治疗基因一般是在遗传物质层面上通过阻碍血管生成、抑制肿瘤生长、防止肿瘤细胞转移等方法治疗癌症。虽然基因治疗从根源上针对肿瘤, 基本上不产生多耐药性等问题, 但是起效慢、转染效率低等问题严重限制了基因治疗的应用。使用基因-药物共载体体系可以利用两者不同的治疗机理相互弥补缺陷, 达到协同治疗的目的^[86]。为了达到基因和药物共载以及智能传递释放之目的, 常用功能化的阳离子脂质体作为共载体体系。举例来说, Sun 和同事^[87]设计了一种修饰了多肽 angioprep-2 的阳离子脂质体能够同时荷载编码人类肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体基因 pEGFP-hTRAIL 和 PTX (CLP/PTX/pEGFP-hTRAIL) 用于脑胶质瘤的治疗。利用脑胶质瘤细胞 U87 MG 与正常的牛肉瘤上皮细胞 BCEC 共培养模型考察不同样品的诱导凋亡能力, 实验结果显示 CLP/PTX/pEGFP-hTRAIL 不仅能够区分 U87 MG 和 BCEC, 并且能够穿过单层 BCEC 模仿的血脑屏障后诱导 $81.99 \pm 3.28\%$ 的 U87 MG

发生凋亡(如图 10 所示)。共载脂质体比单载 pEGFP-hTRAIL 或者 PTX 的脂质体造成的细胞凋亡率分别高出 2.8 倍或者 1.98 倍。可是, 有研究表明共载体体系释放不同治疗剂的顺序和时机是影响治疗效果的一大因素, 例如化疗药物的提前释放对细胞造成杀伤会严重阻碍基因的转染^[88]。但是目前对于如何解决该问题的研究还十分有限。

图 10 在体外血脑屏障模型中, 不同样品对 U87 MG 细胞造成的凋亡率^[87]Fig. 10 Advanced apoptosis (%) of different nanoparticles against U87 MG cells in *in vitro* BBB models^[87]

除了上述的药物共载脂质体、基因-药物共载脂质体外, 还有将分子探针和药物共载以达到“诊疗一体化”的目的。Tagami 等^[89]就将 MRI 分子探针 Gd-DTPA 和化疗药物 DOX 共同包载于热敏脂质体中, 以便在治疗过程中获得示踪药物分布、监控治疗之效果。

5 脂质体的临床医用现状

脂质体作为药物载体系统的优异之处在种种研究中均体现, 但从 1995 年第一个被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的脂质体制剂 Doxil[®] (Ben Venue Laboratories, Inc Bedford, OH) 开始^[90], 目前只有 13 种脂质体类药物被批准上市, 更多的依然处于不同的临床研究阶段 (见表 1)。这些上市的脂质体制剂在临床治疗中已占

据了举足轻重的地位, 尤其 AmBisome[®] 和 Doxil[®] 每年有着数亿的销售额。虽然脂质体可以通过不同的给药途径进入人体, 但在临床应用中一般都是通过静脉注射给药。除此之外, 荷载甲肝抗原的 Epaxal[®] (Berna Biotech Ltd, Berne Switzerland) 和荷载流感病毒抗原的 Inflexal[®] V (Berna Biotech España SA, Madrid, Spain) 脂质体疫苗是通过肌肉注射给药^[91, 92], 以及荷载治疗年龄相关性黄斑变性的维替泊芬的 Visudyne[®] 则是通过眼部给药^[93]。虽然研究口服给药的脂质体制剂的报道很多, 但脂质体易被胆汁崩解的问题一直没有得到解决^[94]。最新上市的脂质体制剂是在 2015 年 10 月 22 日批准的 Onivyde[®], 这是一种荷载伊立替康以治疗胰腺癌的长循环脂质体制剂^[95]。

表 1 已上市的脂质体以及脂质产品
Table 1 Marketed liposomal and lipid-based products

Product name	Drug	Approved indication	Year approved	Ref.
Ambisome	Amphotericin B	Sever fungal infections	1997	[96]
Abelcet	Amphotericin B	Sever fungal infections	1995	[97]
Amphotec	Amphotericin B	Sever fungal infections	1996	[98]
Exparel	Bupivacaine	Analgesia	2011	[99]
Depocyt	Cytarabine	Neoplastic meningitis, lymphomatous meningitis	1999	[100]
Doxil	Doxorubicin	Kaposi's sarcoma, ovarian cancer, breast cancer	1995	[90]
Myocet	Doxorubicin	Breast cancer	2000	[101]
Onivyde	Irinotecan	Pancreatic cancer	2015	[95]
Marqibo	Vincristine	Acute lymphoblastic leukemia	2012	[102]
DaunoXome	Daunorubicin	Kaposi's sarcoma	1996	[103]
DepoDur	Morphine	Pain following surgery	2004	[104]
Visudyne	Verteporphin	Wet macular degeneration	2000	[93]
Estrasorb	Estrogen	Estrogen	2003	[105]

6 结 语

经过 50 年的研究, 脂质体已经从一个概念发展到现在公认的主流载体系统。脂质体从最初的经典构成开始, 先后发展出长循环脂质体、环境敏感脂质体以及主动靶向脂质体等, 并由研究者进行有机的组合获得了更适应临床应用潜力的多功能化脂质体。虽然脂质体的设计和应用潜力逐渐走向成熟, 但是不能忽视脂质体传递系统的某些短板: ①PEG 化脂质体重复给药后出现的 ABC 现象; ②脂质体的基因传递效率仍远低于病毒载体; ③如何将脂质体设计成靶向效率更高、治疗剂缓控释更加智能的载体系统; ④如何利用功能化修饰达到顺序释放治疗剂的目的。坚信随着科研技术的日渐进步, 以上短板

对脂质体传递系统的影响会不断趋于减弱, 甚至消除, 而更高效的脂质体将越来越广泛地应用于临床, 在多种疾病的治疗中发挥重要作用领域。

参考文献 References

[1] Bangham A, Standish M, Watkins J. *Journal of Molecular Biology* [J], 1965, 13(1): 238–IN227.
[2] Steichen S, Caldorera–Moore M, Peppas N. *Eur J Pharm Sci* [J], 2013, 48(3): 416–427.
[3] Morgan J, Williams L, Howard C. *The British Journal of Radiology* [J], 1985, 58(685): 35–39.
[4] Felgner P, Gadek T, Holm M, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [J], 1987, 84(21): 7413–7417.
[5] Kim B, Bae Y, Doh K, et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Let-*

- ters[J], 2011, 21(12): 3734–3737.
- [6] Mintzer M, Simanek E. *Chemical Reviews*[J], 2009, 109(2): 259–302.
- [7] Niculescu-Duvaz D, Heyes J, Springer C. *Current Medicinal Chemistry*[J], 2003, 10(14): 1233–1261.
- [8] Wolff J, Malone R, Williams P, et al. *Science*[J], 1990, 247(4949): 1465–1468.
- [9] Wheeler C, Felgner P, Tsai Y, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*[J], 1996, 93(21): 11454–11459.
- [10] Li L, Song H, Luo K, et al. *Int J Pharm*[J], 2011, 408(1–2): 183–190.
- [11] Obata Y, Suzuki D, Takeoka S. *Bioconjugate Chemistry*[J], 2008, 19(5): 1055–1063.
- [12] Xu X, Jiang Q, Zhang X, et al. *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2015, 3(35): 7006–7010.
- [13] Jiang Q, Yue D, Nie Y, et al. *Molecular Pharmaceutics*[J], 2016, 13(6): 1809–1821.
- [14] Pinnaduwa P, Schmitt L, Huang L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*[J], 1989, 985(1): 33–37.
- [15] Tang F, Hughes J A. *Journal of Controlled Release*[J], 1999, 62(3): 345–358.
- [16] Koyanova R, Tenchov B, Wang L, et al. *Molecular Pharmaceutics*[J], 2009, 6(3): 951–958.
- [17] Kawakami S, Yamashita F, Nishikawa M, et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 1998, 252(1): 78–83.
- [18] Choi J, Lee E, Jang H, et al. *Bioconjugate Chemistry*[J], 2001, 12(1): 108–113.
- [19] Freedland S, Malone R, Borchers H, et al. *Biochemical and Molecular Medicine*[J], 1996, 59(2): 144–153.
- [20] Leventis R, Silvius J. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*[J], 1990, 1023(1): 124–132.
- [21] Lv H, Zhang S, Wang B, et al. *Journal of Control Release*[J], 2006, 114(1): 100–109.
- [22] Tang F, Hughes J A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 1998, 242(1): 141–145.
- [23] Wang S, Zhang S, Liu J, et al. *ACS Applied Materials & Interfaces*[J], 2014, 6(13): 10706–10713.
- [24] Oumzil K, Benizri S, Tonelli G, et al. *ChemMedChem*[J], 2015, 10(11): 1797–1801.
- [25] Liu D, Hu i, Qiao W, et al. *Lipids*[J], 2005, 40(8): 839–848.
- [26] Aissaoui A, Martin B, Kan E, et al. *Journal of Medicinal Chemistry*[J], 2004, 47(21): 5210–5223.
- [27] Kao Y J, Juliano R L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*[J], 1981, 677(3): 453–461.
- [28] Blume G, Cevc G. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*[J], 1990, 1029(1): 91–97.
- [29] Klibanov A, Maruyama K, Torchilin V, et al. *FEBS Letters*[J], 1990, 268(1): 235–237.
- [30] Nie Y, Ji L, Ding H, et al. *Theranostics*[J], 2012, 2(11): 1092–1103.
- [31] Mishra S, Webster P, Davis M E. *European Journal of Cell Biology*[J], 2004, 83(3): 97–111.
- [32] Dams E, Laverman P, Oyen W, et al. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*[J], 2000, 292(3): 1071–1079.
- [33] Zhao Y, Wang C, Wang L, et al. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*[J], 2012, 81(3): 506–513.
- [34] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. *Advanced Drug Delivery Reviews*[J], 2002, 54(5): 631–651.
- [35] Gu F, Karnik R, Wang A, et al. *Nano Today*[J], 2007, 2(3): 14–21.
- [36] Kelly C, Jefferies C, Cryan S A. *Journal of Drug Delivery*[J], 2011, 2011(1): 727241–727241.
- [37] Weissmann G, Bloomgarden D, Kaplan R, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*[J], 1975, 72(1): 88–92.
- [38] Carter P. *Nature Review Cancer*[J], 2001, 1(2): 118–129.
- [39] Patil Y, Amitay Y, Ohana P, et al. *Journal of Controlled Release*[J], 2016, 225(2): 87–95.
- [40] Ravar F, Saadat E, Gholami M, et al. *Journal of Controlled Release*[J], 2016, 229(3): 10–22.
- [41] Yoo H, Park T. *Journal of Controlled Release*[J], 2004, 96(2): 273–283.
- [42] Leto I, Coronello M, Righeschi C, et al. *ChemMedChem*[J], 2016, 11(16): 1745–1751.
- [43] Brooks P, Montgomery A, Rosenfeld M, et al. *Cell* [J], 1994, 79(7): 1157–1164.
- [44] Sonali, Singh R P, Sharma G, et al. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*[J], 2016, 147(5): 129–141.
- [45] Engin D, Cater J, Thistlethwaite A, et al. *International Journal of Hyperthermia*[J], 1995, 11(2): 211–216.
- [46] Manickam D, Li J, Putt D, et al. *Journal of Control Release*[J], 2010, 141(1): 77–84.
- [47] Li N, Li N, Yi Q, et al. *Biomaterials* [J], 2014, 35(35): 9529–9545.
- [48] Overall C, Lopez-Otin C. *Nat Rev Cancer*[J], 2002, 2(9): 657–672.
- [49] G. Kong M. *International Journal of Hyperthermia*[J], 1999, 15(5): 345–370.
- [50] Koltover I. *Science*[J], 1998, 281(5373): 78–81.
- [51] Taylor K, Morris R. *Thermochemica Acta* [J], 1995, 248(3): 289–301.
- [52] Shigeta K, Kawakami S, Higuchi Y, et al. *Journal of Controlled Release*[J], 2007, 118(2): 262–270.
- [53] Jiang L, Li L, He B, et al. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [J], 2016, 12(1): 79–90.
- [54] Yue D, Cheng G, He Y, et al. *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2014, 2(41): 7210–7221.
- [55] Liabakk N, Talbot I, Smith R, et al. *Cancer Research*[J], 1996, 56(1): 190–196.
- [56] Ji T, Li S, Zhang Y, et al. *ACS Applied Materials & Interfaces*[J],

- 2016, 8(5): 3438–3445.
- [57] Pradhan P, Giri J, Rieken F, et al. *Journal of Controlled Release*[J], 2010, 142(1): 108–121.
- [58] Nie Y, Gunther M, Gu Z, et al. *Biomaterials*[J], 2011, 32(3): 858–869.
- [59] Xu H, Wang K, Deng Y, et al. *Biomaterials*[J], 2010, 31(17): 4757–4763.
- [60] Chen D, Liu W, Yan S, et al. *International Journal of Nanomedicine* [J], 2011, 6(6): 2053–2061.
- [61] Zhang Z, Zhang X, Xu X, et al. *Advanced Functional Materials*[J], 2015, 25(33): 5250–5260.
- [62] Jiang L, Li L, He X, et al. *Biomaterials*[J], 2015, 52: 126–139.
- [63] Bunker A, Magarkar A, Viitala T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*[J], 2016, 1858(10): 2334–2352.
- [64] Yingchoncharoen P, Kalinowski D, Richardson D. *Pharmacological Reviews*[J], 2016, 68(3): 701–787.
- [65] Forssen E, Tökés Z. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 1979, 91(4): 1295–1301.
- [66] Shi K, Li J, Cao Z, et al. *Journal of Controlled Release*[J], 2015, 217: 138–150.
- [67] Nichols J, Deamer D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*[J], 1976, 455(1): 269–271.
- [68] Chen A. *Chinese Journal of Pharmaceutics*[J], 2005, 3(4): 227–235.
- [69] Yin H, Kanasty R, Eltoukhy A, et al. *Nat Rev Genet*[J], 2014, 15(8): 541–555.
- [70] Gandhi N, Tekade R, Chougule M. *Journal of Controlled Release*[J], 2014, 194: 238–256.
- [71] Sioud M, Sørensen D. *Biochemical and Biophysical Research Communications*[J], 2003, 312(4): 1220–1225.
- [72] Chen K, Rajewsky N. *Nat Rev Genet*[J], 2007, 8(2): 93–103.
- [73] Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Nakamura A, et al. *Scientific Reports* [J], 2014, 4: 3883.
- [74] Torchilin S. *Immobilized Enzymes in Medicine* [M]. Berlin: Springer, 1991.
- [75] Gaspar M, Perez-Soler R, Cruz M. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*[J], 1996, 38(4): 373–377.
- [76] Iwanaga K, Ono S, Narioka K, et al. *Journal of Pharmaceutical Sciences*[J], 1999, 88(2): 248–252.
- [77] Torchilin V. *Nature Reviews Drug Discovery* [J], 2005, 4(2): 145–160.
- [78] Torchilin V. *Molecular Medicine Today*[J], 1996, 2(6): 242–249.
- [79] Liu X, Madhankumar A, Miller P, et al. *Neuro-Oncology*[J], 2016, 18(5): 691–699.
- [80] Yuan A, Huan W, Liu X, et al. *Molecular Pharmaceutics*[J], 2017, 14(1): 242–251.
- [81] Smith D, Simon J, Baker Jr J. *Nat Rev Immunol*[J], 2013, 13(8): 592–605.
- [82] Yanasarn N, Sloat B, Cui Z. *Molecular Pharmaceutics*[J], 2011, 8(4): 1174–1185.
- [83] Werninghaus K, Babiak A, Groß O, et al. *The Journal of Experimental Medicine*[J], 2009, 206(1): 89–97.
- [84] Desel C, Werninghaus K, Ritter M, et al. *Plos One*[J], 2013, 8(1): e53531.
- [85] Patel N R, Rathi A, Mongayt D, et al. *International Journal of Pharmaceutics* [J], 2011, 416(1): 296–299.
- [86] Yang Z, Gao D, Cao Z, et al. *Biomater Sci*[J], 2015, 3(7): 1035–1049.
- [87] Sun X, Pang Z, Ye H, et al. *Biomaterials*[J], 2012, 33(3): 916–924.
- [88] Lee Michael J, Ye Albert S, Gardino Alexandra K, et al. *Cell*[J], 2012, 149(4): 780–794.
- [89] Tagami T, Foltz W D, Ernsting M J, et al. *Biomaterials*[J], 2011, 32(27): 6570–6578.
- [90] James N D, Coker R J, Tomlinson D, et al. *Clinical Oncology*[J], 1994, 6(5): 294–296.
- [91] D'Acemont V, Herzog C, Genton B. *Journal of Travel Medicine*[J], 2006, 13(2): 78–83.
- [92] Chang H I, Yeh M K. *Int J Nanomedicine*[J], 2012, 7: 49–60.
- [93] Azab M, Benchaboune M, Blinder K J, et al. *American Journal of Ophthalmology*[J], 2001, 131(5): 541–560.
- [94] Shaji J, Patole V. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* [J], 2008, 70(3): 269–277.
- [95] DiGiulio, Sarah. FDA Approves Onivyde Combo Regimen for Advanced Pancreatic Cancer[N]. FDA Actions & Updates, 2015–10–25 [2017–11–05]. [Http://journals.lww.com/oncology-times/blog/fdaactionsandupdates/pages/post.aspx?PostID=124](http://journals.lww.com/oncology-times/blog/fdaactionsandupdates/pages/post.aspx?PostID=124).
- [96] Im H, Hg P. *International Journal of Antimicrobial Agents*[J], 2001, 17(3): 161–169.
- [97] Walsh T, Hiemenz J, Seibel N, et al. *Clinical Infectious Diseases*[J], 1998, 26(6): 1383.
- [98] Li X. *Clinical Infectious Diseases*[J], 2002, 35(4): 359–366.
- [99] Surdam J, Licini D, Baynes N, et al. *The Journal of Arthroplasty*[J], 2015, 30(2): 325–329.
- [100] Glantz M, Lafollette S, Jaeckle K, et al. *Journal of Clinical Oncology* [J], 1999, 17(10): 3110–3116.
- [101] Batist G, Ramakrishnan G, Rao C, et al. *Journal of Clinical Oncology* [J], 2001, 19(5): 1444–1454.
- [102] Sarris A, Hagemester F, Romaguera J, et al. *Annals of Oncology*[J], 2000, 11(1): 69–72.
- [103] Petre C, Dittmer D. *International Journal of Nanomedicine*[J], 2007, 2(3): 277–288.
- [104] Gambling D, Hughes T, Martin G, et al. *Anesthesia & Analgesia*[J], 2005, 100(4): 1065–1074.
- [105] Simon J A. *Menopause—the Journal of the North American Menopause Society*[J], 2006, 13(13): 222–231.