·实验研究·

基于冷冻透射电镜技术的脂质体物理稳定性精准原位分析

刘　静,颜梦雨,韩　瑶,余　娅,何　琳,郭新秋*
(上海交通大学分析测试中心,上海 200240)

[摘要]　本研究利用冷冻透射电镜技术对脂质体的物理稳定性进行了精准原位评价。冷冻透射电镜技术无须干燥和染色,能够最大程度保留脂质体的原始形貌,清晰呈现双层膜结构及包载物的空间分布,克服了传统表征方法导致的形变、水合层干扰及探针卷积效应等问题,能够高效、直观地评估脂质体的形态、粒径及粒径分布、包载物状态等,为脂质体制剂的开发与优化提供了可靠的科学依据和质量控制标准,提高药物研发和生产的一致性和可比性,满足日益增长的临床需求。

[关键词]　脂质体;冷冻透射电镜技术;形貌;粒径;关键质量属性
[中图分类号] R917　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003－3734(2026)08－0869－06

Precise *in situ* analysis of liposome physical stability based on cryo-electron microscopy

LIU Jing, YAN Meng-yu, HAN Yao, YU Ya, HE Lin, GUO Xin-qiu*
(*Instrumental Analysis Center*, *Shanghai Jiao Tong University*, *Shanghai* 200240, *China*)

[**Abstract**]　This study employs cryo-electron microscopy (Cryo-EM) to precisely evaluate the physical stability of liposomes *in situ*. Cryo-EM eliminates the need for drying and staining, thereby preserving the native morphology of liposomes to the greatest extent. It clearly reveals the bilayer membrane structure and the spatial distribution of encapsulated substances, overcoming issues such as deformation, hydration layer interference, and probe convolution effects associated with traditional characterization methods. Cryo-EM enables efficient and intuitive assessment of liposome morphology, particle size, size distribution, and the state of encapsulated materials. Cryo-EM provides reliable scientific evidence and quality control standards for the development and optimization of liposomal formulations. Ultimately, it enhances the consistency and comparability of drug development and production, meeting the growing clinical demands.

[**Key words**]　liposomes; cryo-electron microscopy; morphology; particle size; critical quality attributes

脂质体是1961年英国科学家亚力克·邦汉姆等发现的由磷脂双分子层包裹内水相的封闭囊泡。其独特结构与功能使其成为理想生物载体,兼具安全性高、纳米级递送优势,在药物递送、基因治疗及疫苗开发等领域展现出广泛的应用前景[1-2]。近年来,脂质体在靶向药物递送和可控释放方面的潜力日益凸显,尤其在肿瘤、感染性疾病、疼痛管理和罕见病治疗等重大疾病领域取得了显著进展[3-4]。目前,全球已有16个原研脂质体药物获批上市,另有千余个品种处于临床试验阶段[1]。我国也已有多个脂质体产品成功获批上市,如紫杉醇注射剂、盐酸多柔比星脂质体注射液和注射用两性霉素B脂质体,但更多产品仍处于研发阶段。

脂质体的制备方法需要根据包封物质的性质和工艺要求进行选择,不同的制备技术直接影响脂质体的形态、粒径及分布、理化稳定性等关键特性。其中,

[基金项目]　2023年度上海交通大学决策咨询课题资助项目(JCZXSJB2023-15);上海交通大学分析测试中心实验技术研究课题资助项目(FC2024ZD03)

[作者简介]　刘静,女,博士,实验师,主要从事冷冻透射电镜方法学开发研究。E-mail: liujing2018@sjtu.edu.cn。
[通讯作者]　*郭新秋,女,硕士,助理研究员,主要从事冷冻透射电镜方法学开发及实验室建设与管理工作。E-mail: guoxq@sjtu.edu.cn。

[DOI]10.20251/j.cnki.1003-3734.2026.08.011

脂质体的粒径大小及分布决定了其在体内的细胞相互作用和分布特性,形态和粒径则进一步影响药物递送性能和稳定性[5-7]。然而,脂质体的复杂结构和功能性辅料使其质量研究和质量控制面临巨大挑战。美国 FDA 和欧洲 EMA 发布了多项脂质体药物行业指南,包括 2002 年的《脂质体药物工业指南》、2010 年的聚乙二醇化脂质体阿霉素(pegylated liposomal doxorubicin,PLD,盐酸多柔比星脂质体注射液)产品指南、2018 年更新的《脂质体药物 CMC、人体药动学和生物等效性研究以及标签管理》[8]。2023 年我国国家药品监督管理局药品审评中心也发布了《脂质体药物质量控制研究技术指导原则》,为脂质体药物的质量控制提供了具体指导。因此,建立精准的质量控制方法对于评价脂质体的安全性和有效性至关重要。

传统的脂质体表征技术,如动态光散射(dynamic light scattering,DLS)、透射电子显微镜(transmission electron microscope,TEM)、扫描电子显微镜(scanning electron microscope,SEM)、原子力显微镜(atomic force microscope,AFM),虽然能够提供脂质体的部分理化特性信息,但无法在接近自然状态下进行观察。冷冻透射电镜(cryo-electron microscopy,Cryo-EM)技术作为一种先进的成像技术,能够在低温和高真空环境下对生物大分子进行成像,避免了化学固定或干燥等处理过程导致的结构变形[9-10],可以精确观察脂质体的形态、膜厚度、粒径分布、药物分布位置和物理状态等,为脂质体药物的质量研究和精准原位评价提供了强有力的工具。

本文旨在利用 Cryo-EM 技术对脂质体的形态、粒径、粒度分布及其物理稳定性进行全面表征,并与传统技术进行比较,建立脂质体药物质量研究和精准原位评价方法。这一研究将为脂质体药物的研发和监管标准的建立提供科学依据和技术支撑,推动脂质体药物在重大疾病治疗中的进一步应用。

材料与方法

1 试剂与仪器

1.1 试剂 聚乙二醇化远程可装载脂质体(空载脂质体,磷脂浓度 22.8 mg·mL^{-1},默克集团,批号:300202S-1EA-A-011);载药脂质体(磷脂浓度 15 mg·mL^{-1},实验室自制);载 mRNA 脂质纳米粒(磷脂浓度 60 mg·mL^{-1},实验室自制);磷钨酸(2%,pH 6.5,河南锐欣实验用品有限公司,批号:GZ0253624111919);碳膜铜网(230 目,北京中镜科仪技术有限公司,货号:BZ110223A);Cu 300-mesh,R1.2/1.3(德国耶拿 Quantifoil 公司,货号:N1-C14nCu30-01);超薄碳膜(Lacey,美国 Ted Pella 公司,货号:01895-F);AFM 探针(DNP－10 型氮化硅探针,弹性系数 k = 0.24 N·m^{-1},美国 Bruker 公司,货号:DNP-10)。

1.2 仪器 200 kV Cryo-EM(ThermoFisher Scientific 公司,型号:Glacios);生物型场发射 TEM(ThermoFisher Scientific 公司,型号:Talos F200C G2);投入式快速冷冻仪(FEI 公司,型号:Vitrobot Mark Ⅳ);超级分辨率场发射 SEM(JEOL 公司,型号:JSM-7800F);生物型快速 AFM(Bruker 公司,型号:FastScan Bio);高真空镀膜仪(Quorum 公司,型号:Q 150T ES plus);临界点干燥仪(Leica 公司,型号:EM CPD300);纳米粒度与 Zeta 电位仪(布鲁克海文公司,型号:Omin);冻干机(上海田枫公司,型号:TF-HFD);辉光放电仪(Ted Pella 公司,型号:PELCO easiGlow™ Glow Discharge 91000)。

2 方法

2.1 TEM 负染样品制备及表征 将脂质体溶液稀释 100 倍,使用辉光放电仪对碳膜载网进行亲水化处理。取 3 μL 溶液滴加至载网,静置 1 min,用滤纸吸去多余溶液,室温干燥 1 ~ 2 min。滴加 3 μL 磷钨酸染色液,染色 45 s,吸去多余染色液,室温干燥,于生物型场发射 TEM 下观察。

2.2 Cryo-EM 样品制备及表征 使用投入式快速冷冻仪制备样品。载网经辉光放电仪亲水化处理后,设定上样仓温度(20 ℃)和湿度(100%),制备液态乙烷,设置冷冻参数(Blot time:3 ~ 5 s,Blot force:3 ~ 5,Wait time > 3 s)。取 3 μL 脂质体溶液滴加至载网,按程序冷冻,样品保存于液氮。使用 C-Ring/C-Clip Ring 固定载网,转移至 200 kV Cryo-EM,采用 low dose 模式拍摄(欠焦值为 －3 ~ －2 μm)。

2.3 SEM 样品制备及表征 将脂质体溶液滴加至硅片,冻干后放入高真空镀膜仪进行离子溅射(Au,5 nm),于 SEM 下观察(5 kV)。另取脂质体溶液离心富集,去除上清液后进行化学固定、梯度脱水,然后使用临界点干燥制得粉末。将脂质体粉末撒于导电胶上,放入高真空镀膜仪进行离子溅射(Au,5 nm),SEM 观察(5 kV)。

2.4 AFM 样品制备及表征 将样品稀释 100 倍,取 20 μL 溶液滴加至新剥离云母片,沉积 3 min。将云母片移至样品台,采用液相模式进行 AFM 观察。

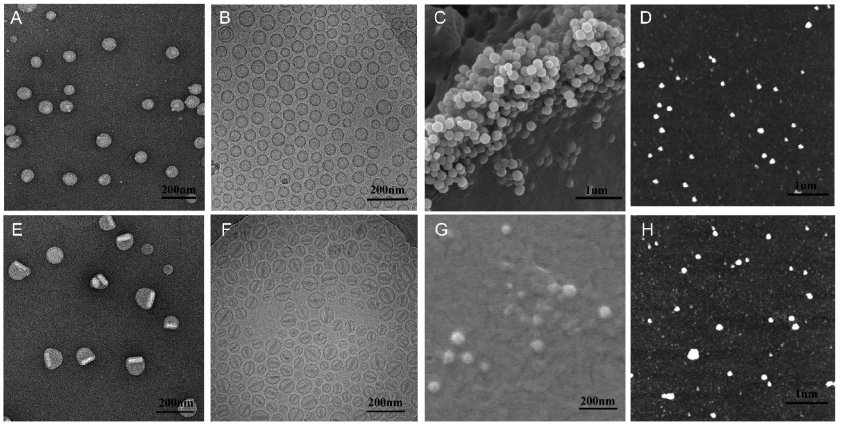
2.5 纳米粒 DLS 表征 将样品稀释 1 000 倍,取

500 μL 溶液置于比色皿中,使用纳米粒度与 Zeta 电位仪通过 DLS 分析平均体积直径及粒径分布。

结　果

1　脂质体形貌表征

脂质体通常呈现球形结构,其微观形貌可通过 TEM、AFM 或 SEM 观察,空载脂质体和载药脂质纳米粒的形貌特征见图 1。TEM 负染显示干燥过程会导致脂质体发生形变,其中载药脂质体的药物因干燥塌缩而偏离核心位置。SEM 仅能观察冻干粉的表面形貌,无法获取内部药物分布信息。AFM 虽无须特殊处理且不破坏样品结构,但仍局限于表面观察。相比之下,Cryo-EM 技术通过对溶液快速冷冻后在液氮温度下直接成像,可清晰呈现双层膜结构和药物分布,最大程度保留脂质体原始形貌,在脂质体表征中具有显著优势。

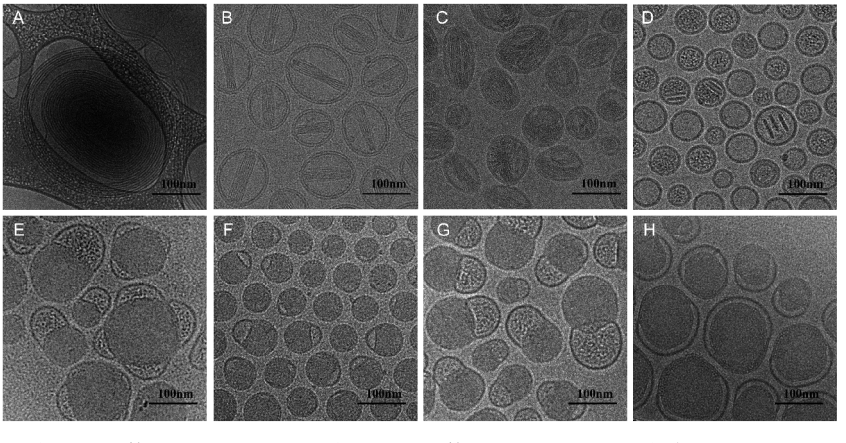


A、E:TEM 负染表征;B、F:Cryo-EM 表征;C、G:SEM 表征;D、H:AFM 表征

图 1　空载脂质体(A ~ D)和载药脂质纳米粒(E ~ H)的微观形貌图

2　脂质体包载分布与物理状态精准分析

脂质体通常呈球形,其形态、脂膜层数、包载物的空间分布及存在形式直接影响稳定性、药物释放行为及体内药动学。Cryo-EM 下的载药脂质体形态见图 2A,从图中可清晰观测脂质双分子层的层数、脂膜厚度及水相中包载物(如药物、核酸)的形态。不同药物包载导致脂质体形态变化:阿霉素包载(如 Doxil 及其仿制药)可诱导线性纤维束形成,导致物理拉伸[11],见图 2B;而封装其他药物(如环丙沙星)后,无定形沉淀经冻融结晶,形成纤维束,使脂质体由球形转变为细长状[12],见图 2C;纤维束构成的纳米晶体结合高分辨 Cryo-EM 与 X 射线散射可鉴定其种类[13],见图 2D。不同方法制备的脂质纳米粒呈现“中空”小粒径与“非中空”大粒径颗粒的复合组装结构(见图 2E ~ 图 2H),其形态与制备方法密切相关,可能影响生物活性。Cryo-EM 技术为快速评估脂质体形态提供了有力工具,对开发和优化新型脂质体制剂及脂质纳米粒具有重要意义。

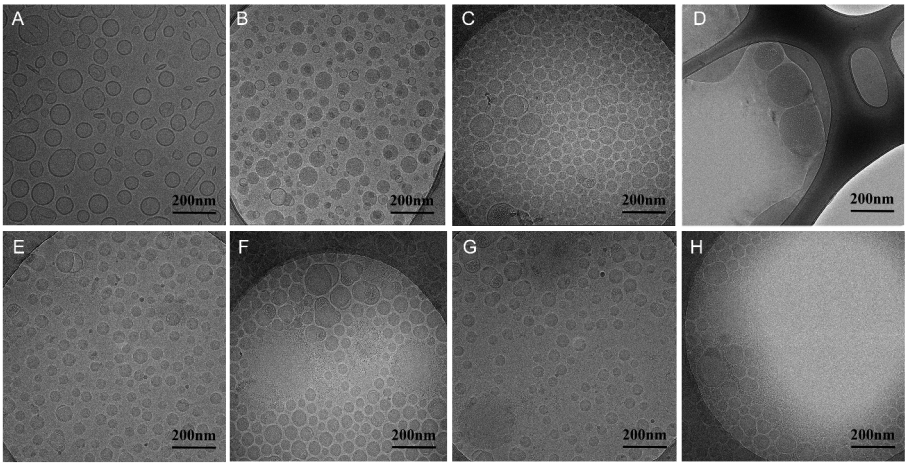


A:多层脂质体;B ~ D:包载不同药物的脂质体;E ~ H:不同方法制备的脂质纳米粒

图 2　各类脂质体在 Cryo-EM 下的微观形态图

3 脂质体物理稳定性的评价

Cryo-EM 在脂质体关键质量属性表征中具有重要作用,为脂质体制备工艺优化和稳定性评估提供了不可或缺的技术支持。合格的脂质体形态规整、分散均匀。如图 3A 所示,室温储存后脂质体出现尺寸分布不均、形态不规则、双层膜结构受损及破裂现象,核壳结构难以观测。包封率测试虽能反映药物或核酸的包裹程度,但无法直观揭示空壳脂质体(生产中的工艺杂质)情况。如图 3B 所示,Cryo-EM 可快速直观评估脂质纳米粒中的空壳现象,为快速判断包载情况提供了重要技术支持。此外,脂质体包载物在不同储存环境下是否泄漏是评价其稳定性的关键指标,泄漏不仅影响药动学和药效,还可能增加毒性。脂质纳米粒在不同储存温度(室温、4 和 -20 ℃)和不同储存时间下的 Cryo-EM 形貌见图 3C ~ 图 3H。可以看到,室温储存导致样品结构完全破坏;4 ℃下可以保存较长时间,但是长期储存易导致颗粒破裂及核酸游离;-20 ℃反复冻融严重破坏脂质纳米粒的样品结构。可见,Cryo-EM 形貌表征为存储和运输条件的优化提供了快速检测方法。



A:室温环境下储存的脂质体层膜破裂;B:脂质纳米粒中的空壳现象;C:新鲜制备的脂质纳米粒的形态;D:脂质纳米粒在室温下放置 d 3 的形态;E:脂质纳米粒在 4 ℃下放置 d 3 的形态;F:脂质纳米粒在 4 ℃下放置 d 60 的形态;G:脂质纳米粒在 -20 ℃下放置 d 3 的形态;H:脂质纳米粒在 -20 ℃下反复冻融 2 次后的形态

图 3 脂质体在 Cryo-EM 下的微观形态图

4 脂质体粒径及粒径分布的表征和分析

粒径及粒径分布对脂质体药物的包封、释放、稳定性及体内药动学具有重要影响。目前常用表征方法包括电镜法、AFM 及 DLS。不同测试方法测得的空载脂质体粒径分布及统计结果见图 4 和表 1。

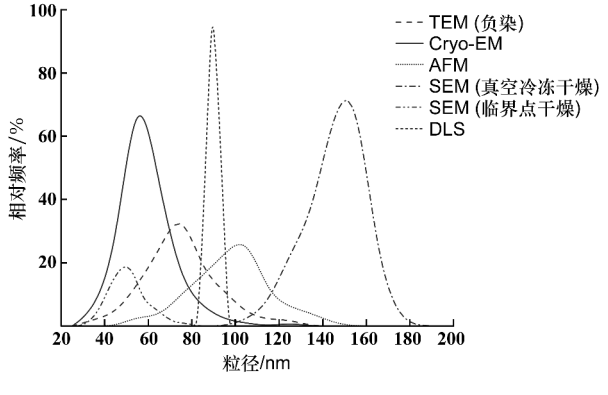


图 4 不同表征方法测得的空载脂质体的粒径分布

表 1 不同表征方法测得的空载脂质体粒径分布的统计结果

测试方法	平均粒径/nm
DLS	90 ± 2
Cryo-EM	60 ± 11
AFM	102 ± 13
TEM(负染)	75 ± 17
SEM(临界点干燥)	50 ± 7
SEM(真空冷冻干燥)	191 ± 26

DLS 利用悬浮粒子布朗运动时光散射强度随时间的变化反映粒径及粒径分布,是目前研究脂质体粒径最常用的传统手段之一。通过 DLS 测试可以看出,该样品粒径分布窄,尺寸均一性较好。但由于脂质体表面的亲水端容易与水分子紧密吸附,水合层影响了颗粒的扩散动力学行为和光散射现象,水合层厚度导致脂质体粒径测量值偏大[14]。

AFM 是检测脂质体粒径的重要方法,但其测量存在结果偏大和分布较宽的情况,这主要有两方面原因:一方面是由于磷脂和胆固醇组成的脂质体倾向于与亲水性和带负电荷的云母相互作用而吸附在云母上,使脂质体发生部分延展变形,导致观察到的高度低于其实际直径;另一方面是原子力探针的卷积效应[15]会使得脂质体的表观半径(D)大于真实半径(R),见图 5。通过如下公式(1)计算 100 个单独脂质体的信息,得到脂质体的表观直径为(102 ± 13) nm。其中,w 为针尖和脂质体接触位置的宽度,R 为脂质体测量平均高度的一半,r 为针尖半径(10 nm),θ 为探针针尖角度的一半,D 为表观半径。

$$D = R\cos\theta + w = R\cos\theta + \left(R + R\sin\theta + \frac{r}{\sin\theta} - r\right) \times \tan\theta = R\frac{1+\sin\theta}{\cos\theta} + r\frac{1-\sin\theta}{\cos\theta} \quad \text{公式(1)}$$

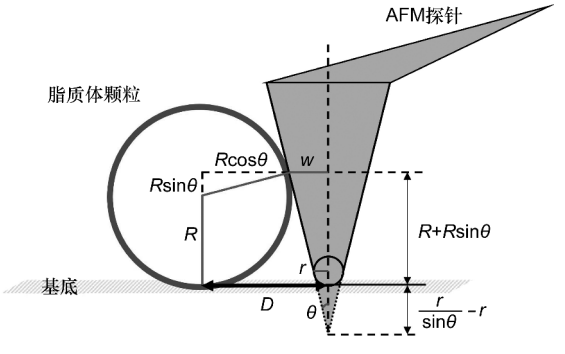
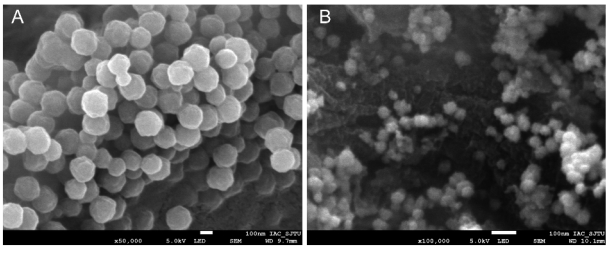


图 5 AFM 探针卷积效应及表观直径计算方法示意图[15]

常温干燥、真空冷冻干燥和临界点干燥 3 种干燥方法获得的粒径及分布差异显著。常温干燥(负染 TEM)是直接将溶液滴在 TEM 载网后于室温环境下干燥,易导致脂质体塌缩形变,脂质体的测量粒径偏大且分布较宽。真空冷冻干燥(见图 6A)和临界点干燥(见图 6B)是 SEM 观察常用的制样方法。真空冷冻干燥因慢速预冻易形成大冰晶,会导致颗粒粒径显著增大,并且内部溶质迁移至表面形成浓缩层,使得干燥时间增加,颗粒聚集,使得在 SEM 观察中难以区分相邻颗粒边界,从而导致脂质体测量粒径较大且分布较宽。而临界点干燥是对脂质体梯度脱水后使用超临界 CO_2 进行干燥处理,由于脂质体含水率非常高,常规梯度脱水难以完全置换,导致干燥后容易发生皱缩,测得的样品颗粒粒径显著偏小,并未获得较优的 SEM 图像,后续使用这一技术制备用于 SEM 观察的脂质体粉末仍须不断探索。可见,干燥方法对脂质体的结构和功能影响较大,需要仔细调整工艺参数才能保证脂质体质量的稳定[16]。



A:真空冷冻干燥;B:临界点干燥

图 6 不同干燥方法获得的脂质体粉末的 SEM 图像

Cryo-EM 制样简单,取脂质体的悬浊液直接滴加在载网上快速冷冻,无须其他前处理即直观获得脂质体形貌,结合图像分析软件即可快速测定粒径及分布,是最高效直观的粒径表征方法。但需要注意的是,Cryo-EM 样品的冰层厚度一般为 50 ~ 200 nm,较大粒径脂质体容易在冰层中受到挤压,影响获得的粒径信息。

讨　论

本研究基于 Cryo-EM 技术,系统评估了脂质体的物理稳定性,揭示了其在形态、粒径及包载物分布等方面的关键特征。Cryo-EM 技术无须干燥和染色,能够最大程度保留脂质体的原始形貌,精准表征双层膜结构及包载物的空间分布。通过对比负染 TEM、SEM、AFM、DLS 等传统表征手段,发现 Cryo-EM 技术可避免形变、水合层干扰及探针卷积效应的影响,提供真实、高效的粒径及形貌信息。此外,Cryo-EM 技术能够直观揭示脂质体在储存过程中因不稳定导致的破裂、包载物泄漏等问题,为制剂的性能优化和临床应用提供了重要的技术支撑,是精准原位评价脂质体物理稳定性的理想手段。Cryo-EM 技术也存在一定局限性,如设备成本高昂、样品纯度要求较高,低浓度或异质性较强的样品可能难以获得高质量图像。未来,随着技术的不断改进和成本的逐渐降低,Cryo-EM 将会在脂质体研发和产业化中发挥更大的作用。

[参 考 文 献]

[1] 冯赫宣, 李佩珊, 刘懿萱, 等. 脂质体的研究与应用进展[J]. 药学进展, 2024, 48(10): 725 – 734.

[2] DESHPANDE S, CASPI Y, MEIJERING AEC, *et al*. Octanol-assisted liposome assembly on chip[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10447.

[3] SENAPATI S, MAHANTA AK, KUMAR S, *et al*. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2018, 3: 7.

[4] SRIWIDODO, UMAR AK, WATHONI N, *et al*. Liposome-polymer complex for drug delivery system and vaccine stabilization [J]. *Heliyon*, 2022, 8(2): e08934.

[5] 王兴芝, 代英辉, 王东凯. 脂质体的制备方法及应用的研究进展[J]. 中国药剂学杂志(网络版), 2024(1): 14 – 24.

[6] 杨莉斌, 沈静, 胡荣. 抗肿瘤药物脂质体粒径对肿瘤靶向性的影响[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(4): 428 – 430.

[7] 储晓婷, 周梅, 汪康, 等. 不同粒径聚乙二醇化维生素 K1 脂质体的制备及体内外评价[J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1323 – 1331.

[8] 周誉, 宫新江, 杨进波. FDA 关于《脂质体药物 CMC、人体药动学和生物等效性研究以及标签管理》的行业指南介绍[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(16): 1835 – 1840.

[9] TONGGU LG, WANG LG. Cryo-EM sample preparation method for extremely low concentration liposomes[J]. *Ultramicroscopy*, 2020, 208: 112849.

[10] YAO X, FAN X, YAN N. Cryo-EM analysis of a membrane protein embedded in the liposome[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, 117(31): 18497 – 18503.

[11] WIBROE PP, AHMADVAND D, OGHABIAN MA, *et al*. An integrated assessment of morphology, size, and complement activation of the PEGylated liposomal doxorubicin products Doxil®, Caelyx®, DOXOrubicin, and SinaDoxosome[J]. *J Control Release*, 2016, 221: 1 – 8.

[12] CIPOLLA D, WU H, SALENTINIG S, *et al*. Formation of drug nanocrystals under nanoconfinement afforded by liposomes[J]. *RSC Adv*, 2016, 6(8): 6223 – 6233.

[13] 魏晓慧, 徐宇虹. 脂质体纳米药物的“成分-结构-性质”关系研究[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(10): 1126 – 1135.

[14] 刘涛. 液体中颗粒 Zeta 电位及粒度标准物质的研制[D]. 北京: 中国石油大学, 2018.

[15] TAKAHASHI N, HIGASHI K, UEDA K, *et al*. Determination of nonspherical morphology of doxorubicin-loaded liposomes by atomic force microscopy[J]. *J Pharm Sci*, 2018, 107(2): 717 – 726.

[16] 王立华, 王永利, 黄慧婷, 等. 脂质体冻干因素研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(24): 371 – 374.

编辑:毕晓帆/接受日期:2025 – 08 – 25