

光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针用于近红外二区肿瘤特异性光声成像

王瑞荣^{1,2}, 崔丹丹^{1,2}, 石玉娇^{1,2*}

¹华南师范大学生物光子学研究院, 激光生命科学教育部重点实验室, 广东 广州 510631;

²华南师范大学生物光子学研究院, 广东省激光生命科学重点实验室, 广东 广州 510631

摘要 肿瘤微环境中谷胱甘肽(GSH)的高表达通常被认为是肿瘤组织的显著内源性特征之一。本团队基于实验室合成的光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针能够特异性响应 GSH 的这一特点,提出了一种用于近红外二区(NIR-II)肿瘤特异性光声成像的方法。当光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针被定向到肿瘤组织后,探针能够在外部白光 LED 的触发下与肿瘤微环境中的 GSH 发生强烈的氧化还原反应,产生大量的在 NIR-II 区具有强烈光吸收的银纳米颗粒,从而实现肿瘤组织光声信号的特异性增强。接着,本团队对所合成的纳米探针的光敏感性及其 GSH 响应特性进行了体外验证。荷瘤小鼠模型实验证明,AgBr@PLGA 纳米探针能够在体内实现高对比度的肿瘤特异性成像。本研究结果说明,所合成的光敏感纳米探针在肿瘤特异性光声检测及诊断中具有很大的应用潜力。

关键词 医用光学; 肿瘤特异性成像; 近红外二区; 溴化银

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL202249.2007204

1 引言

谷胱甘肽(GSH)作为一种人体细胞内重要的调节代谢的物质,是维持细胞适当氧化还原状态的核心组分之一,具有重要的生理调节作用^[1]。GSH 由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸结合而成,它既是乙二醛酶及丙糖脱氢酶的辅酶,也是甘油醛磷酸脱氢酶的辅基,能够参与体内的三羧酸循环及糖代谢,并能够通过激活多种酶促进糖类、脂肪和蛋白质的代谢^[2-3]。此外,GSH 具有活性巯基,能够参与机体中多种重要的生化反应,保护体内重要酶蛋白巯基不被氧化、灭活,同时保证能量代谢和细胞利用^[4]。已有研究表明,许多疾病如癌症、心血管疾病、退行性疾病等的发生与 GSH 的特异性高表达密切相关。例如,在 A549 人类肺癌细胞中,GSH 的浓度比正常细胞要高出近一个数量级^[5]。因此,发展高灵敏的 GSH 检测及成像方法对相关疾病的诊断以及更好地理解疾病的发病机制具有重要意义^[6]。已有文献报道了通过构建硫醇敏感型荧光探针能够实现肿瘤细胞中 GSH 的高灵敏度检测与成像。然而,荧光成像较为有限的成像深度(约 1 mm),无法满足深层组织的成像需求,严重阻碍了深部肿瘤的准确检测,因而该方法在肿瘤检测及成像中的应用受到极大限制^[7-10]。有学者提出了基于磁共振成像(MRI)

的 GSH 特异性肿瘤成像技术,但 MRI 图像需要相对较长的扫描周期,且不能用于孕妇及带有起搏器的癌症患者,因而该技术的应用同样受到限制^[11]。因此,开发能够实现肿瘤组织中 GSH 特异性响应的高灵敏度深层成像方法迫在眉睫。

光声(PA)成像技术作为一种结合光学成像高灵敏度和超声成像深穿透能力(可达 10 cm)的新型生物医学影像方法,在过去的 20 年中一直受到众多生物医学影像学领域专家的广泛关注^[12-14],而且越来越多关于光声成像技术的研究被报道。传统的非标记光声成像技术通常将人体内丰富的内源性血红蛋白、黑色素、脂质、水及其他发色团等作为成像对比剂,实现组织生理功能、代谢情况、解剖结构等特征的成像,以及疾病发展过程中血管异常生长及血氧、血流等功能信息的监控^[15-18]。

然而,许多重大疾病的特征分子在生物组织光学窗口(NIR-I, 650~950 nm; NIR-II, 950~1700 nm)的光学吸收较弱,导致激发光照射下无法产生足够强的信号,从而无法实现光声成像。因此,亟需开发具有特异性光学吸收特性的纳米探针并将其作为光声成像的外源对比剂,以增强光声信号,从而极大地提高成像对比度^[19-20]。目前,已有多种纳米材料被开发出来作为光声成像的外源对比剂,如贵金属纳米探针、碳基纳米二维材料、高分子聚合物等。但这些材料大多不具备

收稿日期: 2022-05-10; 修回日期: 2022-05-21; 录用日期: 2022-05-26

基金项目: 国家自然科学基金(61822505、61805085、61627827)、广州市科技计划项目(201904010321)

通信作者: *shiyuj@scnu.edu.cn

生物响应性,无法特异性响应细胞内的特异性物质,因而往往缺乏疾病的特异性识别能力^[21-25]。本团队构建了一种能够特异性响应肿瘤微环境中高表达 GSH 的光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针,并提出了一种近红外二区(NIR-II)肿瘤特异性光声成像的方法。本团队自行合成的光敏感 AgBr@PLGA 纳米探针被动靶向到肿瘤组织后,能够在外部白光 LED 的触发下产生光学潜影,这些光学潜影可被肿瘤微环境中的 GSH 氧化还原,产生大量的银纳米颗粒,在 NIR-II 区表现出强烈的光吸收,光声信号急剧增强,从而可以实现肿瘤组织的特异性光声成像。本团队对所合成的纳米探针的形貌学及光学性质进行了表征,并对其响应外部触发白光 LED 的光敏感性及 GSH 响应特性进行了体外验证。最后,本团队在荷瘤小鼠模型中验证了所合成的 AgBr@PLGA 纳米探针能够在体内实现高对比度的肿瘤特异性成像,证明了所合成的光敏感纳米探针在肿瘤特异性光声检测及诊断中的巨大应用潜力。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

实验中使用的主要仪器包括脉冲方波激光器(DS20HE-1064D/R,其重复频率为 5 kHz,波长为 1064 nm,脉冲宽度为 11 ns)、紫外可见分光光度计(Lambda 35)、动态光散射仪(Zetasizer Nano-ZS)、场发射扫描电子显微镜(ZEISS Gemini 500)。

试验中使用的试剂包括十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、NaBr、硫代硫酸钠、AgNO₃、聚乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA)。以上试剂均为分析纯。整个实验过程使用的是阻抗>18.4 MΩ·cm 的去离子水。

2.2 水溶性 AgBr@PLGA 纳米晶体的制备

溴化银(AgBr)根据文献所述方法合成,此合成方法已经相对较为成熟。首先配制一定量的 0.5 mol/L 的 AgNO₃ 溶液以及 0.5 mol/L 的 NaBr 溶液备用;然后取配制好的 AgNO₃ 及 NaBr 溶液各 4 mL,分别移至 50 mL 容量瓶中,并稀释至刻度线;将 0.12 g 表面活性剂 CTAB 加入盛有一定浓度的 NaBr 溶液的三颈瓶中(50 mL),搅拌 30 min 后,将已配制好的 AgNO₃ 溶液(50 mL)缓慢滴入其中,继续搅拌 30 min;最后加入 0.01 g 硫代硫酸钠,并将其放置在 25 °C 环境下避光反应 4 h,反应结束后可得到含有 AgBr 纳米粒子的乳液。

将 30 mg PLGA 溶于 1 mL 二氯甲烷溶液中,并搅拌至溶解;然后加入 100 μL AgBr 纳米溶液,再用超声破碎机搅拌 10 min;最后加入 3 mL 质量浓度为 0.5 mg/mL 的 PVA 溶液乳化,再用超声破碎机搅拌 10 min,将得到的溶液用磁力搅拌器搅拌 1 h,直至二氯甲烷全部挥发完全,即可得到水溶性 AgBr@PLGA 纳米晶体。

2.3 荷瘤小鼠肿瘤模型的构建

本研究使用肺腺癌小鼠模型进行研究。整个实验

过程使用的是 4~5 周龄的雌性 BALB/c 小鼠和裸鼠(均购于南方医科大学),并按照华南师范大学实验室相关管理规定进行饲养。整个饲养过程符合动物道德伦理。皮下肿瘤模型的构建步骤为:将 A549 细胞(100 μL,1×10⁶)皮下注射到小鼠右背部,作为活体肿瘤模型,待肿瘤长到大约 100 mm³ 时进行实验研究。本文所有实验使用的是 A549 荷瘤小鼠。

3 结果与分析

3.1 AgBr@PLGA 纳米晶体的感光原理

带隙为 2.6 eV 的 AgBr 是最常见的一种卤化银感光材料,本团队依据标准方案制备了 AgBr 纳米晶体溶液^[26-29]。在合成过程中添加了化学增感剂硫代硫酸钠,目的是在 AgBr 表面形成感光中心硫化银(Ag₂S),提高 AgBr 纳米晶体对光的敏感性。然后将亲水性高分子聚合物聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)包裹在 AgBr 表面,以增加其生物相容性。接收光子的 AgBr 晶体会发射电子,感光中心 Ag₂S 捕获电子并带负电。带负电的光敏中心吸引周边的自由银离子,随后,银离子和感光中心上的电子结合形成光解银。随着卤化银颗粒不断吸收光子,银离子颗粒在感光核中不断累积,感光中心逐渐扩大,形成稳定的显影中心,从而构成了感光材料的潜像。之后,感光材料上的潜像与具有还原性的 GSH 反应,转化成银颗粒,形成可见图像,如图 1(a)所示。随着曝光时间延长,AgBr 纳米晶体不断地吸收光子,银离子持续在感光核中积聚。随着还原的银原子不断积累,AgBr 纳米晶体的吸收系数逐渐增大,因此,产生的光声信号就会不断增强,如图 1(b)、(c)所示。

3.2 AgBr@PLGA 纳米晶体的表征

使用 JEM-1400 PLUS 透射电子显微镜对制备的 AgBr 纳米晶体的形态和大小进行表征。测试样品的质量浓度为 0.05 mg/mL。将 AgBr 纳米晶体装载到铜网表面,待其风干后再进行观察,其形貌如图 2(a)所示。通过透射电子显微镜(TEM)观察合成的纳米粒子的形貌,并对其尺寸进行测量。结果表明,纳米粒子分布均匀,尺寸在 120 nm 左右。采用动态光散表征 AgBr 纳米晶体的尺寸,表征结果为 90 nm。包裹后的 AgBr@PLGA 纳米探针的尺寸约为 120 nm,如图 2(b)所示。动态光散射水合粒径进一步验证了 AgBr@PLGA 的尺寸符合设计要求,此结果与 TEM 数据基本吻合。AgBr 晶体的晶格上存在诸多缺陷,包括物理缺陷和化学缺陷。物理缺陷包括空位、螺旋位错,而化学缺陷则包括 AgS 等增感剂引起的晶核缺陷,这些缺陷构成了 AgBr 感光纳米晶体的感光活性点。这些感光活性点被称为“感光中心”。基于此,本团队深入探究了在合成过程中添加增感剂硫代硫酸钠是否会对 AgBr@PLGA 纳米晶体的光敏性产生影响。将未添加和添加增感剂的 AgBr@PLGA 纳米晶体

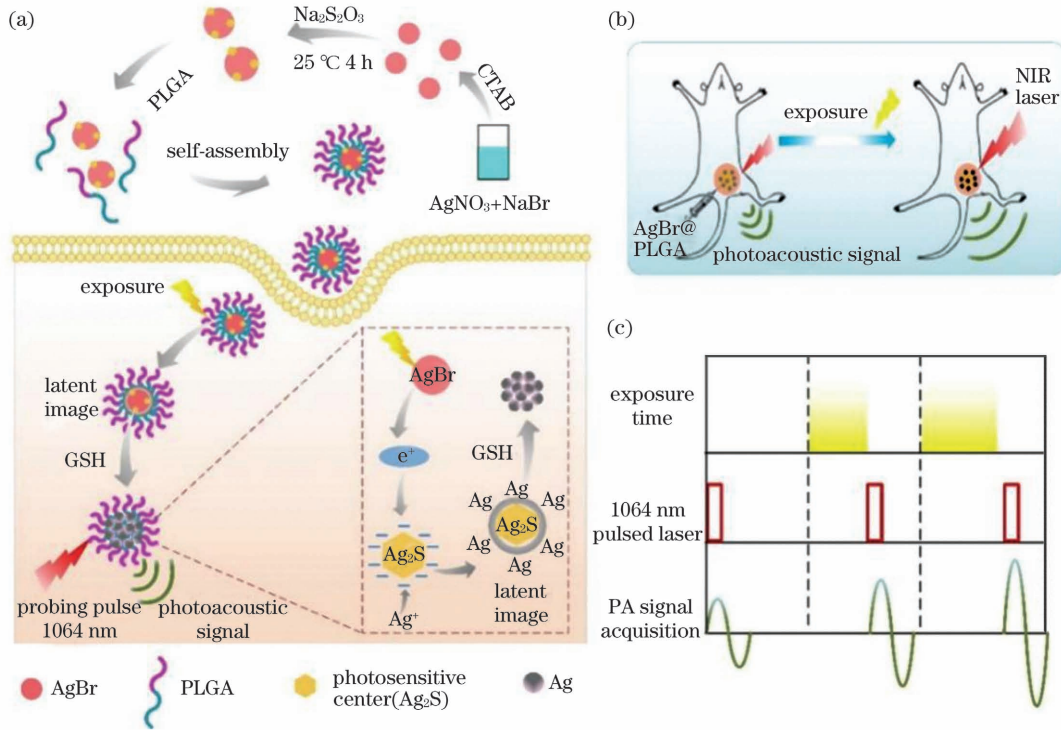


图 1 AgBr@PLGA 纳米粒子的制备及其曝光原理。(a) AgBr@PLGA 纳米粒子的感光原理；(b) AgBr@PLGA 纳米晶体的光声成像技术示意图；(c) 光声强度幅值的时间序列图

Fig. 1 Preparation and exposure principle of AgBr@PLGA nanoparticles. (a) Photosensitive principle of AgBr@PLGA nanoparticles; (b) schematic of photoacoustic imaging technology of AgBr@PLGA nanocrystals; (c) time sequence diagram of photoacoustic intensity amplitude

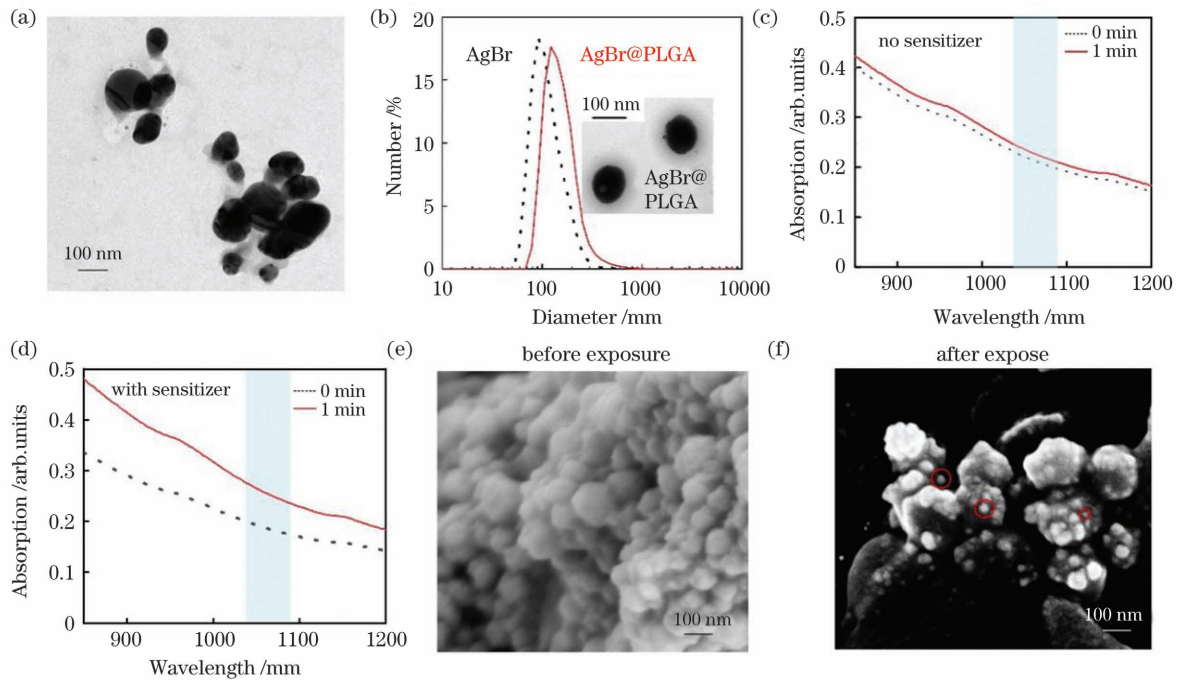


图 2 AgBr@PLGA 纳米晶体的表征。(a) AgBr 的 TEM 图像；(b) AgBr 和 AgBr@PLGA 纳米晶体的流体动力学直径，插图是该晶体的 TEM 照片；(c) 未添加增感剂的 AgBr@PLGA 纳米晶体曝光前后的吸收光谱；(d) 添加增感剂的 AgBr@PLGA 纳米晶体曝光前后的吸收光谱；(e) AgBr@PLGA 纳米晶体曝光前的 SEM 图像；(f) AgBr@PLGA 纳米晶体曝光后的 SEM 图像

Fig. 2 Characterization of AgBr@PLGA nanocrystals. (a) Transmission electron microscopy (TEM) image of AgBr; (b) hydrodynamic diameters of AgBr and AgBr@PLGA nanocrystals, where the insets are TEM images of AgBr@PLGA nanocrystals; (c) absorption spectra of AgBr@PLGA nanocrystals without sensitizer before and after exposure; (d) absorption spectra of AgBr@PLGA nanocrystals with sensitizers before and after exposure; (e) scanning electron microscopy (SEM) image of AgBr@PLGA nanocrystals before exposure; (f) SEM image of AgBr@PLGA nanocrystals after exposure

分别置于可见光 LED 灯(波长为 400~700 nm, 光功率密度为 0.01 W/cm^2)下观察, 可以看到未添加增感剂的 AgBr@PLGA 纳米晶体的吸收光谱在曝光前后的变化很不明显, 曝光前后样品吸收光谱的增加幅值较小, 如图 2(c) 所示。添加增感剂的 AgBr@PLGA 纳米晶体在可见光下曝光 1 min, 其吸收光谱的幅值便较曝光前有明显增大, 如图 2(d) 所示, 证实了 AgBr@PLGA 纳米晶体对光的超高灵敏度, 验证了在合成过程中添加增感剂可以提高 AgBr@PLGA 纳米晶体对光的敏感性。最后, 本团队进一步用场发射扫描电子显微镜直观监测了 AgBr@PLGA 纳米晶体曝光前后银单质的产生情况。与图 2(e) 所示的曝光前的 AgBr@PLGA 纳米晶体相比, 曝光后的 AgBr@PLGA 纳米晶体表面有明显的银单质(用红色圆圈标出)产生, 如图 2(f) 所示, 验证了 AgBr@PLGA 纳米晶体对光的敏感性。

3.3 AgBr@PLGA 纳米晶体仿体样品的光声成像

为了进一步验证上述实验结果, 本团队使用光声成

像系统对 AgBr@PLGA 纳米晶体仿体样品进行光声成像。为了验证本文提出的纳米晶体 AgBr@PLGA 光写入和光声读出的技术方法, 将 AgBr@PLGA+GSH 和 AgBr@PLGA 分别与 1%(质量分数)琼脂混合, 冷却后制成如图 3(a) 所示的样品, 并将该样品用 0.5%(质量分数)脂肪乳剂和 1.3%(质量分数)琼脂组成的散射介质覆盖。在实验过程中, 使用波长范围为 400~700 nm 的宽带 LED 作为曝光光源(LED 灯通过消色差系统进行变换, 以获得平行光束), 用直径约为 10 mm 的大光斑照射感兴趣区域 5 min, 光功率密度为 0.01 W/cm^2 。结果显示, 表面被散射介质覆盖的样品在光写入之前几乎看不清其式样, 如图 3(b) 所示。在进行光写入操作后, 样品较光写入之前清晰一些, 但仍无法清楚地看到样品的轮廓外形, 如图 3(c) 所示。利用光声成像技术可以清晰地观察到 AgBr@PLGA+GSH 样品的轮廓, 而对照组 AgBr@PLGA 就相对没那么清晰, 如图 3(d) 所示。这一实验结果证实了可以利用本文方法合成的 AgBr@PLGA 纳米晶体进行肿瘤特异性光写入和光声读出。

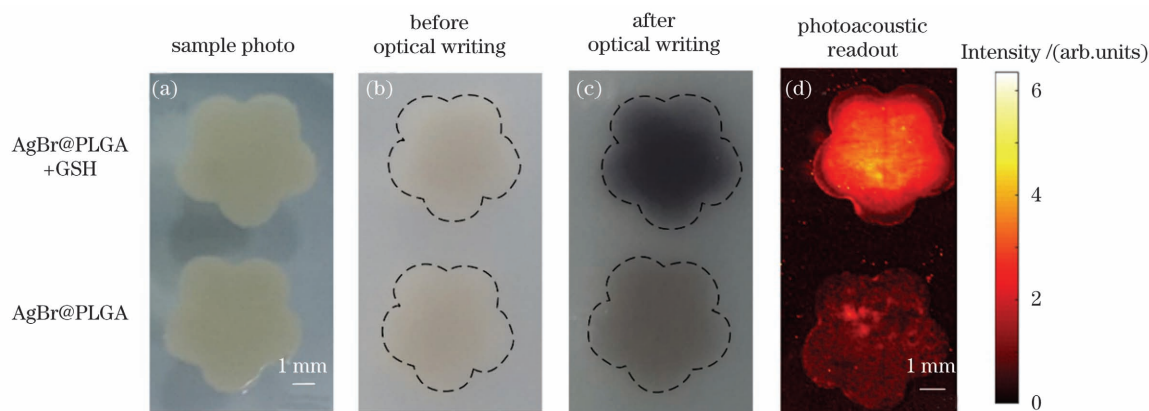


图 3 AgBr@PLGA 纳米晶体光写入和光声读出物理技术

Fig. 3 Optical writing and photoacoustic readout physics technology of AgBr@PLGA nanocrystal

3.4 AgBr@PLGA 纳米晶体小鼠体内光声成像

为了证实 AgBr@PLGA 纳米晶体可以被用于特异性肿瘤光声成像, 本团队将所制备的纳米晶体 AgBr@PLGA+GSH 注入小鼠背部皮下组织, 再用波长为 1064 nm 的激光器对其进行光声成像。图 4(a) 为小鼠皮下组织样品照片。将小鼠皮下组织置于光功率密度为 0.01 W/cm^2 、波长为 400~700 nm 的 LED 灯下曝光不同时间, 并对目标区域的光声信号进行检测, 检测结果如图 4(b) 所示。实验结果表明, 随着曝光时间延长, 注射了 AgBr@PLGA 纳米晶体的小鼠背部的光声信号逐渐增强, 曝光 30 min 左右实验组光声信号趋于饱和。这一实验结果为后期 AgBr@PLGA 纳米晶体用于肿瘤特异性光声成像提供了指导。选取相同浓度的氧化石墨烯注射入小鼠皮下组织(作为对照组), 对小鼠目标位置进行二维光声成像, 成像结果如图 4(c) 所示。结果显示, 随着曝光时间延长, 注射 AgBr@PLGA+GSH 的小鼠背部皮下组织的光声信号逐渐增强, 而对照组(注射氧化石墨烯)的光声信号

几乎不变。小鼠原位三维光声图像如图 4(d) 所示。

3.5 AgBr@PLGA 晶体荷瘤小鼠体内光声成像

最后, 为了验证 AgBr@PLGA 纳米晶体可以用于特异性肿瘤光声成像, 本团队对荷瘤小鼠进行了在体光声成像。同时, 为了探究构建的 AgBr@PLGA 纳米晶体是否能够特异性响应内源性肿瘤标记物 GSH, 选用 A549 肿瘤小鼠模型进行实验。这是因为 A549 肿瘤细胞富含 GSH, GSH 的浓度比正常细胞要高出近一个数量级。实验前, 将戊巴比妥钠经由腹腔注射于小鼠体内(40 mg/kg), 待小鼠麻醉后, 将 100 μL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的 AgBr@PLGA 纳米晶体直接原位注射于肿瘤部位。AgBr@PLGA 纳米晶体由于高通透性和滞留效应(EPR)积聚在肿瘤内。然后在小鼠表皮涂抹超声耦合液, 并将小鼠置于波长为 1064 nm 的光声成像系统探测器的下方。在小鼠肿瘤部位原位注射 PBS 缓冲液(作为对照组)。动态调整曝光时间, 进行不同曝光时间的荷瘤小鼠光声成像, 成像结果如图 5(a) 所示。实验结果显示, 对照组小鼠的

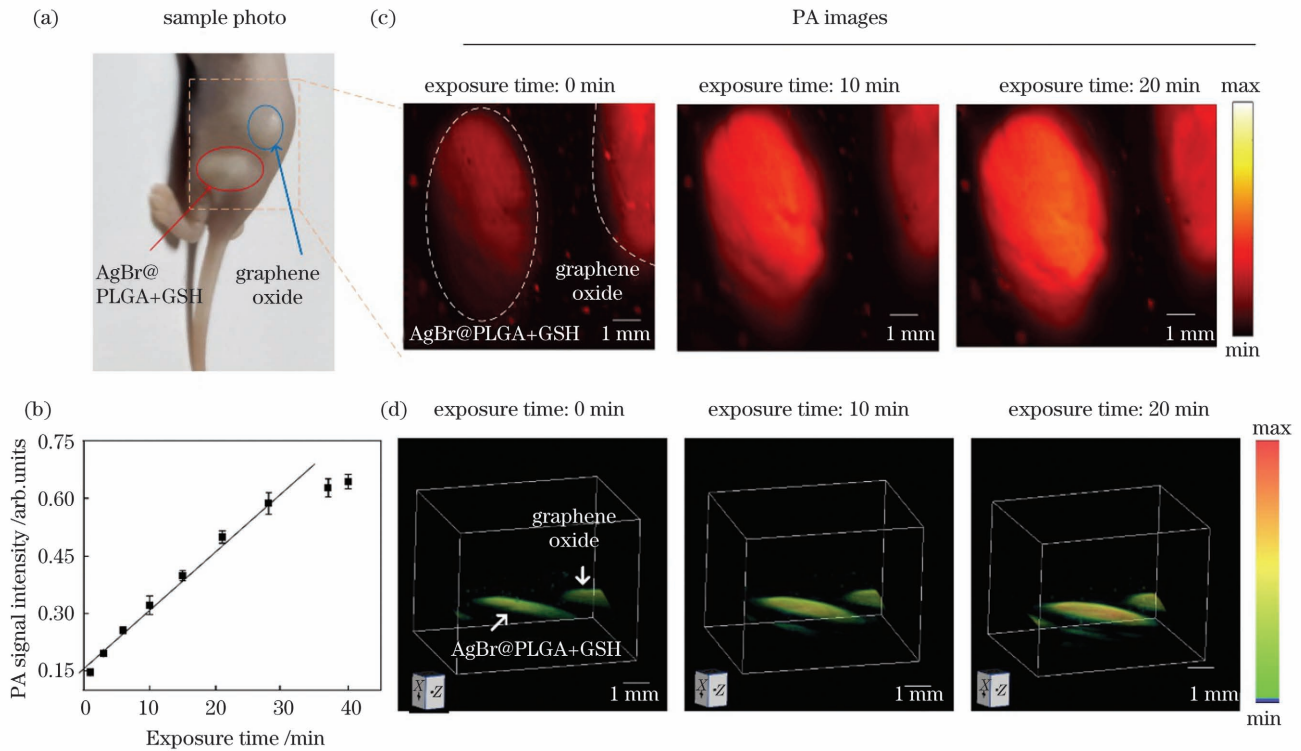


图 4 小鼠体内光声成像。(a)注射纳米粒子的小鼠照片。(b)注射 AgBr@PLGA+GSH 纳米晶体的小鼠皮下组织的光声信号；(c)注射 AgBr@PLGA+GSH 纳米晶体的小鼠皮下组织的二维光声成像；(d)小鼠原位三维光声图像

Fig. 4 *In vivo* photoacoustic (PA) imaging of mice. (a) Photograph of mice injected with nanoparticles; (b) photoacoustic signal of subcutaneous tissue of mice injected with AgBr@PLGA+GSH nanocrystals; (c) two-dimensional photoacoustic images of subcutaneous tissue of mice injected with AgBr@PLGA+GSH nanocrystals; (d) three-dimensional *in vivo* photoacoustic images of mice

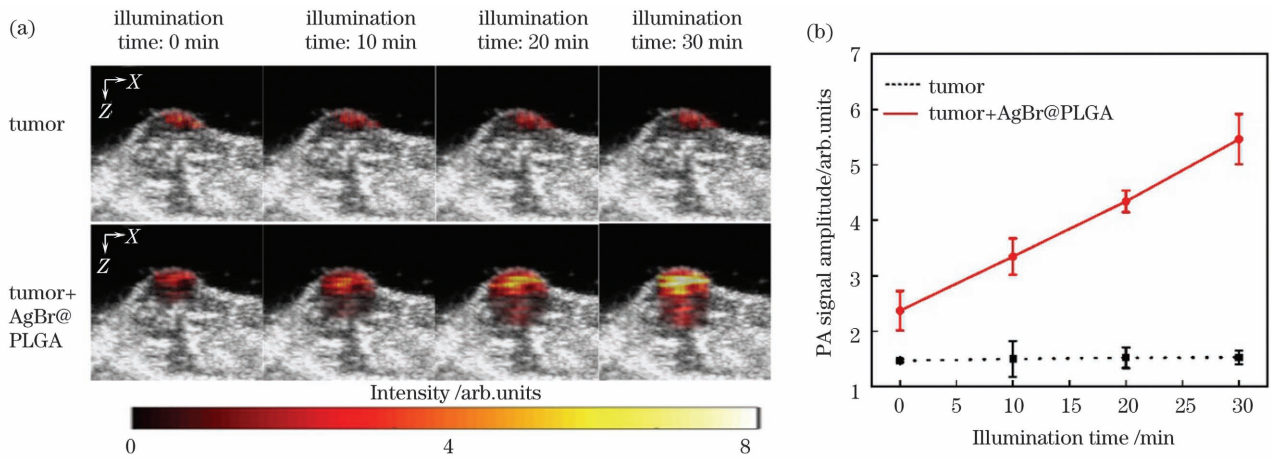


图 5 荷瘤小鼠体内光声成像。(a)不同曝光时间下肿瘤光声和超声成像的叠加图；(b)不同曝光时间下光声信号幅值的统计结果

Fig. 5 *In vivo* photoacoustic imaging of tumor-bearing mice. (a) Overlay of tumor photoacoustic and ultrasound imaging at different exposure time; (b) statistics of photoacoustic signal amplitude at different exposure time

光声信号不会随曝光时间的变化而变化,而原位注射 AgBr@PLGA 纳米晶体的小鼠肿瘤区域的光声信号随曝光时间的延长而增强。进一步,本团队对实验组和对照组在不同曝光时间下的光声信号幅值进行了统计,得到的统计结果显示,只有在肿瘤区域注射 AgBr@PLGA 纳米晶体的小鼠,其光声信号的幅值才随曝光时间的延长而增大,而对照组小鼠的光声信号几乎保持不变,如图 5(b)所示。这一结果与光声图像吻合良好,从而验证

了 AgBr@PLGA 纳米晶体可用于基于外部光触发、特异性响应 GSH 的肿瘤特异性光声成像。

4 结 论

AgBr@PLGA 纳米晶体通过光学写入和氧化还原显色反应被成功地用于超高灵敏度的肿瘤特异性光声成像。AgBr@PLGA 纳米晶体被肿瘤部位的 GSH 激活后,由于暴露在外部触发光下还原为银纳米颗粒,

从而表现出增强的 NIR-II 吸收。肿瘤中丰富的 GSH 含量使 AgBr@PLGA 纳米晶体的 NIR-II 光吸收的开启变得更加容易,可以实现具有相对较高成像深度的肿瘤特异性光声成像。更重要的是,这项技术只要控制曝光时间就能实现肿瘤区域对比度的增强,从而可以抑制不需要的背景信号,如分子成像中的血液信号。但需要注意的是,材料在成像波长处的响应并不是吸收峰位置。在接下来的研究中,本团队拟开发在 NIR-II 区具有强吸收的感光材料,以实现更深的光声成像。这项工作将吸引更多关注、开发用于精确生物医学成像的高效可激活光声探针的研究人员的注意。

参 考 文 献

- [1] Estrela J M, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy[J]. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 2006, 43(2): 143-181.
- [2] Liu Y J, Yang Z, Huang X L, et al. Glutathione-responsive self-assembled magnetic gold nanowreath for enhanced tumor imaging and imaging-guided photothermal therapy [J]. *ACS Nano*, 2018, 12(8): 8129-8137.
- [3] Kong F P, Liang Z Y, Luan D R, et al. A glutathione (GSH)-responsive near-infrared (NIR) theranostic prodrug for cancer therapy and imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(12): 6450-6456.
- [4] Lee M H, Yang Z G, Lim C W, et al. Disulfide-cleavage-triggered chemosensors and their biological applications [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(7): 5071-5109.
- [5] Russo A, DeGraff W, Friedman N, et al. Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumor cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs [J]. *Cancer Research*, 1986, 46(6): 2845-2848.
- [6] Lim C S, Masanta G, Kim H J, et al. Ratiometric detection of mitochondrial thiols with a two-photon fluorescent probe [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(29): 11132-11135.
- [7] Niu L Y, Guan Y S, Chen Y Z, et al. BODIPY-based ratiometric fluorescent sensor for highly selective detection of glutathione over cysteine and homocysteine [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(46): 18928-18931.
- [8] Chen J W, Jiang X Q, Zhang C W, et al. Reversible reaction-based fluorescent probe for real-time imaging of glutathione dynamics in mitochondria [J]. *ACS Sensors*, 2017, 2(9): 1257-1261.
- [9] 王少伟, 雷铭. 近红外二区激发多光子荧光成像 [J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617002.
Wang S W, Lei M. Near infrared-II excited multiphoton fluorescence imaging [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617002.
- [10] 戴汉铭, 阮小红, 邵进军, 等. 激活型近红外二区小分子生物成像 [J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(6): 0617010.
Dai H M, Ruan X H, Shao J J, et al. Activatable NIR-II small molecules for bioimaging [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(6): 0617010.
- [11] Zhao Z L, Fan H H, Zhou G F, et al. Activatable fluorescence/MRI bimodal platform for tumor cell imaging via MnO₂ nanosheet-aptamer nanoprobe [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(32): 11220-11223.
- [12] Kim C, Favazza C, Wang L V. *In vivo* photoacoustic tomography of chemicals: high-resolution functional and molecular optical imaging at new depths [J]. *Chemical Reviews*, 2010, 110(5): 2756-2782.
- [13] 沈康, 刘松德, 施钧辉, 等. 基于双域神经网络的稀疏视角光声图像重建 [J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507208.
Shen K, Liu S D, Shi J H, et al. Dual-domain neural network for sparse-view photoacoustic image reconstruction [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507208.
- [14] 邓可欣, 崔曼修, 左宏志, 等. 光声计算断层图像重建中声速异质性补偿方法 [J]. *中国激光*, 2021, 48(15): 1507001.
Deng K X, Cui M X, Zuo H Z, et al. Speed-of-sound heterogeneity compensation method in photoacoustic computed tomographic image reconstruction [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2021, 48(15): 1507001.
- [15] Wang S L, Zhang L L, Zhao J J, et al. A tumor microenvironment-induced absorption red-shifted polymer nanoparticle for simultaneously activated photoacoustic imaging and photothermal therapy [J]. *Science Advances*, 2021, 7(12): eabe3588.
- [16] Liu C, Wang D P, Zhan Y, et al. Switchable photoacoustic imaging of glutathione using MnO₂ nanotubes for cancer diagnosis [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(51): 44231-44239.
- [17] Sayin V I, Ibrahim M X, Larsson E, et al. Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice [J]. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(221): 221ra15.
- [18] Zhou Z J, Song J B, Nie L M, et al. Reactive oxygen species generating systems meeting challenges of photodynamic cancer therapy [J]. *Chemical Society Reviews*, 2016, 45(23): 6597-6626.
- [19] Chen J Q, Qi J, Chen C, et al. Tocilizumab-conjugated polymer nanoparticles for NIR-II photoacoustic-imaging-guided therapy of rheumatoid arthritis [J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(37): e2003399.
- [20] Chen J Q, Sedgwick A C, Sen S, et al. Expanded porphyrins: functional photoacoustic imaging agents that operate in the NIR-II region [J]. *Chemical Science*, 2021, 12(29): 9916-9921.
- [21] Chu C C, Lin H R, Liu H, et al. Tumor microenvironment-triggered supramolecular system as an *in situ* nanotheranostic generator for cancer phototherapy [J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(23): 1605928.
- [22] Tang L G, Yu F, Tang B W, et al. Tumor microenvironment-activated ultrasensitive nanoprobe for specific detection of intratumoral glutathione by ratiometric photoacoustic imaging [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(31): 27558-27567.
- [23] Cui D D, Shi Y J, Xing D, et al. Ultrahigh sensitive and tumor-specific photoacoustography in NIR-II region: optical writing and redox-responsive graphic fixing by AgBr@PLGA nanocrystals [J]. *Nano Letters*, 2021, 21(16): 6914-6922.
- [24] Yin C, Tang Y F, Li X Z, et al. A single composition architecture-based nanoprobe for ratiometric photoacoustic imaging of glutathione (GSH) in living mice [J]. *Small*, 2018, 14(11): e1703400.
- [25] Burridge P W, Li Y F, Matsa E, et al. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Nature Medicine*, 2016, 22(5): 547-556.
- [26] Eachus R S, Marchetti A P, Muentner A A. The photophysics of silver halide imaging materials [J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 1999, 50: 117-144.
- [27] 傅广生, 杨少鹏, 李晓苇, 等. 卤化银感光材料光作用动力学研究进展 [J]. *感光科学与光化学*, 2002, 20(1): 60-68.
Fu G S, Yang S P, Li X W, et al. The research advances in silver halide photo-action kinetics [J]. *Photographic Science and Photochemistry*, 2002, 20(1): 60-68.
- [28] 边国俊. 照相化学增感剂专利最新动态 [J]. *信息记录材料*, 2001, 2(2): 39-42.
Bian G J. The latest development of the patents of photographic chemical sensitizer [J]. *Magnetic Recording Materials*, 2001, 2(2): 39-42.
- [29] Gurney R W, Mott N F. The theory of the photolysis of silver bromide and the photographic latent image [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series A - Mathematical and Physical Sciences*, 1938, 164(917): 151-167.

Photosensitive AgBr@PLGA Nanoprobes for Near-Infrared Second Region Tumor-Specific Photoacoustic Imaging

Wang Ruirong^{1,2}, Cui Dandan^{1,2}, Shi Yujiao^{1,2*}

¹MOE Key Laboratory of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China;

²Guangdong Provincial Key Laboratory of Laser Life Science, College of Biophotonics, South China Normal University, Guangzhou 510631, Guangdong, China

Abstract

Objective The occurrence of numerous diseases, including cancer, cardiovascular diseases, and degenerative diseases, is closely related to the specific high expression of GSH. For instance, in A549 human lung adenocarcinoma cells, the GSH concentration was approximately an order of magnitude higher than that in normal cells. Therefore, the development of highly sensitive GSH detection and imaging approaches has crucial clinical value for the diagnosis of related diseases and a better understanding of the pathogenesis of the disease. The development of highly sensitive deep imaging approaches that can achieve GSH-specific responses in tumor tissues is still urgently needed. Photoacoustic (PA) imaging technology, as a novel biomedical imaging approach, which combines the high sensitivity of optical imaging with the deep penetration capability (up to 10 cm) of ultrasonic imaging, has been favored by the field of biomedical imaging in the last two decades. However, the characteristic molecules of many major diseases have weak optical absorption in the optical window of biological tissue (NIR-I, 650–950 nm; NIR-II, 950–1700 nm), resulting in the inability to generate a strong enough signal under excitation light irradiation, so that it is impossible to realize photoacoustic imaging. Thus, developing nanoprobes with specific optical absorption properties as exogenous contrast agents for photoacoustic imaging can enhance the photoacoustic signal, thereby greatly improving the imaging contrast. Presently, various nanomaterials have been developed as exogenous contrast agents for photoacoustic imaging, including noble metal nanoprobes, carbon-based nano-2D materials, and high molecular polymers. Most of these materials are not biologically responsive and cannot specifically respond to specific substances in cells; they often lack the specific ability to recognize diseases. In this study, the authors developed a photosensitive AgBr@PLGA nanoprobe that can specifically respond to highly expressed GSH in the tumor microenvironment and proposed a tumor-specific near-infrared second region (NIR-II) photoacoustic imaging approach.

Methods The synthesized photosensitive AgBr@PLGA nanoprobes can be passively targeted to tumor tissue and can generate optical latent images triggered by external white light LEDs. GSH in the tumor microenvironment can reduce these optical latent images, resulting in a considerable number of silver nanoparticles that demonstrate strong light absorption and sharp improvements in photoacoustic signal in the NIR-II region, thereby realizing specific photoacoustic imaging of tumor tissue.

Results and Discussions The authors characterize the morphology and optical properties of the synthesized nanoprobes, and confirm *in vitro* their photosensitivity and GSH response characteristics in response to externally triggered white light LEDs. The experimental findings show that the prepared nanoparticles have good biocompatibility and ultra-high sensitivity to external trigger light, and the photoacoustic signal is continuously strengthened as exposure time increases. The model demonstrated that the synthesized AgBr@PLGA nanoprobes can attain high-contrast tumor-specific imaging *in vivo*, demonstrating the synthesized photosensitive great application potential of nanoprobes in tumor-specific photoacoustic detection and diagnosis.

Conclusions In this research, AgBr@PLGA nanocrystals were successfully used for ultrahigh-sensitivity and tumor-specific photoacoustic imaging through optical writing and redox chromogenic reactions. AgBr@PLGA NCs can show improved NIR-II absorption because of the reduction of Ag nanoparticles when exposed to external trigger light after activation by GSH at the tumor site, as illustrated in Figure 2. The tumor-rich GSH content reduces the turn-on of NIR-II light absorption of AgBr@PLGA nanocrystals, enabling tumor-specific photoacoustic imaging with relatively high imaging depth, as demonstrated in Figure 5. Furthermore, this technique can accomplish contrast improvement in the tumor area by controlling the exposure time, and employing this approach can suppress unwanted background signals, such as blood signals in molecular imaging, as demonstrated in Figure 4. However, it should be noted that the response of the material at the imaging wavelength is not the same as the position of the absorption peak. We will develop photosensitive materials with strong absorption in the NIR-II region in the following study to achieve deeper PA imaging. This study will attract more attention to the development of effective activatable PA probes for accurate biomedical imaging.

Key words medical optics; tumor-specific imaging; NIR-II; AgBr