

# 温度响应相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 用于 近红外二区肿瘤高对比光声成像

孙晓冬<sup>1,2</sup>, 石玉娇<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>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;<sup>2</sup>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** 温度响应型纳米材料作为造影剂的巨大潜力推动了近年来光声成像领域的研究和发展,然而,目前报道的温度响应型纳米探针的响应温度超过了人体可以容忍的范围,同时可逆性低,这两个问题是其实际应用的严重障碍,影响了其有效成像和长期监测的效果。鉴于此,笔者设计了一种聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM)包裹金纳米棒(AuNR)的温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM,其可在生理温度附近表现出增强且可切换的近红外二区光吸收,实现对肿瘤的高对比度成像。当 AuNR@PNIPAM 微凝胶热靶向到肿瘤组织后,金纳米棒核吸收近红外光能量触发 PNIPAM 壳相变。当温度高于 PNIPAM 的体积相变温度时,PNIPAM 水凝胶经历溶胀到坍塌的体积相变,使金纳米棒周围的折射率变大,诱导微凝胶的局域表面等离子体共振峰发生红移并使其吸收峰强度增大。体内外实验均证明,利用所制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶,在外部近红外光刺激下动态调制温度场,可以获得对比度增强的光声图像。本工作可为开发温度响应型智能光声纳米探针从而增强成像对比度提供一定的参考。

**关键词** 生物光学; 温度响应; 相变; 聚(*N*-异丙基丙烯酰胺); 对比度增强

中图分类号 O436

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230598

## 1 引言

光声成像(PAI)是一种新兴的非侵入性医学影像方法,兼具纯光学成像的高对比度和纯超声成像的深穿透深度。基于光声效应<sup>[1]</sup>,生物组织中的发色团吸收脉冲激光能量后会发生热弹性膨胀,产生超声波,此时用光声系统收集超声信号就可生成光声图像。由于声波在组织中的散射比光子的散射小,因此光声成像能够克服传统光学成像的衍射极限<sup>[2-3]</sup>。此外,基于组织依赖性的光散射,光强度的衰减可以通过选择激发波长来实现最小化<sup>[4-5]</sup>,从而使得光在组织中的穿透深度最大化。近红外光因在生物组织中的衰减小、散射低而成为深层组织光声成像的理想选择,从而使得光声成像在各种临床成像中具有广阔的应用前景<sup>[6-7]</sup>。然而,在生物组织光学窗口(近红外一区,650~950 nm;近红外二区,950~1700 nm),许多病变组织的特征分子在激发光照射下产生的光声信号太弱,无法形成足够的成像对比度。为克服这一局限,研究人员引入了外源性造影剂,利用其结构多样性来调节局部组织的光学和声学特性,从而显著改善图像的对比度。这些外源性造影剂还可以通过结合分子靶向技术使靶向病

灶区域成像成为可能。金纳米颗粒(AuNPs)作为等离子体激元的候选者,具有可调的良好光学吸收性能和高效的光热性能,长期以来被广泛用作光声成像造影剂<sup>[8]</sup>。然而,目前金纳米颗粒大多是“always-on”光声探针,仅能提供稳定不变的成像对比度<sup>[9]</sup>,难以消除生物组织固有的背景影响。因此,开发一种响应型深层成像方法迫在眉睫。

近年来,刺激响应相变材料在药物递送、传感、催化等领域受到广泛关注,很多研究人员尝试利用刺激响应相变材料构建可激活探针来提高成像对比度<sup>[10-11]</sup>。刺激响应相变材料能够响应内部(pH<sup>[12]</sup>、氧化还原电位<sup>[13]</sup>等)和外部(温度<sup>[14]</sup>、光场<sup>[15]</sup>等)刺激从而改变其构象。然而,相较于肿瘤微环境刺激,温度响应条件可由外部近红外光刺激来实现,具有简易时空控制和波长选择精度等独特优势<sup>[16-19]</sup>。值得一提的是,与传统的 EPR (enhanced permeability and retention effect)效应不同,温敏型水凝胶可通过调节相变温度与肿瘤热疗温度一致来实现热靶向<sup>[20]</sup>。众所周知,与正常组织相比,肿瘤部位血管具有不均质特性,其对 42~45 °C 的高温更加敏感,在热疗作用下,肿瘤血管系统更通透,更有利于肿瘤部位的药物输送<sup>[21]</sup>。然而,温

收稿日期: 2023-03-09; 修回日期: 2023-04-30; 录用日期: 2023-05-24; 网络首发日期: 2023-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(12174125, 61805085)

通信作者: \*shiyuj@scnu.edu.cn

敏型水凝胶大多在靶向药物递送方面<sup>[22]</sup>被广泛研究,很少有人开展基于溶胀-坍塌体积相变构建温度响应型光声探针的相关研究。目前研究的最广泛的温敏型水凝胶是聚(*N*-异丙基丙烯酰胺)(PNIPAM),它的体积相变温度(VPTT)发生在人类和大多数动物的生理温度以下<sup>[23]</sup>。此外,将*N*-异丙基丙烯酰胺与丙烯酸、丙烯酰胺等单体共聚,不仅可以调节体积相变温度,还可以引入 pH 响应官能团构建多刺激响应系统<sup>[24]</sup>。PNIPAM 不仅可以可逆地、灵敏地响应温度变化,还具有良好的生物相容性,在光声成像领域具有非常大的应用潜力。

笔者提出了一种可逆的温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM,它可通过近红外光(980 nm)触发温度相变,实现光声信号的可逆切换,可用于肿瘤高对比度光声成像。所制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶在生理温度(37 °C)附近表现出增强的且可切换的近红外二区光吸收,不仅可以提供更大的成像深度,还具有优异的温度响应特性,从而可以提高成像灵敏度。本团队对合成的纳米探针形貌及其温度响应特性进行了表征,并对其光热效应进行了体外和体内验证,结果发现 AuNR@PNIPAM 微凝胶的光吸收的温度响应特性和光热效应在多个温度循环中是高度可逆的。本研究表明温度响应型 AuNR@PNIPAM 微凝胶可以在离体和体水平上显著提高光声成像的对比度,证明了所制备的这种温度响应型相变纳米探针具有良好的光声成像能力,在癌症早期诊断和热疗无创监测上具有巨大潜力。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

选用透射电子显微镜(JEM-1400 PLUS)对 AuNR@PNIPAM 纳米探针的形貌进行表征,待测 AuNR@PNIPAM 水溶液的质量浓度为 0.01 mg/mL。将 AuNR@PNIPAM 装载到铜网表面,待其常温 25 °C 风干或者高温 50 °C 烘干后再进行观察。AuNR@PNIPAM 纳米探针的近红外吸收光谱图选用紫外可见分光光度计(岛津 UV-2600)进行测量,测量范围为 600~1200 nm,待测 AuNR@PNIPAM 水溶液的质量浓度为 0.1 mg/mL,吸收皿光程为 10 mm。选用纳米粒度-Zeta 电位分析仪(Zetasizer Nano-ZS)测量 AuNR@PNIPAM 微凝胶的水合粒径和 Zeta 电位。AuNR@PNIPAM 水溶液的温度通过外部水浴恒温系统控制,将其加热到预设温度后再进行测试。

实验中用到的试剂包括十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、油酸钠(NaOl)、四氯金酸三水合物(HAuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O)、硼氢化钠、硝酸银、抗坏血酸、盐酸、3-丁烯酸(GC)、*N*-异丙基丙烯酰胺(98%)、*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺和 2,2-偶氮二(2-甲基丙基脒)二盐酸盐(AAPH)(97%),以上试剂除特别注明外均为分析

纯。实验用水均为去离子水,最终阻抗为 18 MΩ·cm。

### 2.2 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的制备

为了获得在近红外二区光谱范围内具有局域表面等离子体共振(LSPR)吸收峰的金纳米棒(AuNR),笔者采用克里斯托弗·B·默里等开发的种子生长方法<sup>[25]</sup>,基于抗坏血酸在 CTAB 和 NaOl 双表面活性剂中还原 H AuCl<sub>4</sub> 制备得到了 AuNR。将 NaBH<sub>4</sub>(600 μL, 10 mmol/L)注入到由 H AuCl<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O(5 mL, 0.5 mmol/L)和(5 mL, 200 mmol/L)CTAB 组成的溶液中,剧烈搅拌,制得种子液。种子液在 30 °C 恒温下静置 15 min,备用。将 CTAB(1.8 g)、NaOl(0.245 g)溶于 50 mL 去离子水中,先加入 AgNO<sub>3</sub>(480 μL, 40 mmol/L)搅拌 15 min,再加入 H AuCl<sub>4</sub>(50 mL, 1 mmol/L)配制生长液。生长液在 30 °C 恒温下搅拌,90 min 后加入 HCl(3.6 mL, 1 mol/L),15 min 后在剧烈搅拌下依次加入抗坏血酸(400 μL, 40 mmol/L)和金种子(160 μL),诱导 AuNR 的形成和生长,溶液保持在 30 °C 过夜。所得 AuNR 的平均长度约为 60 nm,宽度约为 10 nm,纵横比约为 6。

在 AuNR 表面制备 PNIPAM 微凝胶壳的聚合反应最初是由拉斐尔·孔特雷拉斯-卡塞雷斯等发明用来包裹金纳米球的<sup>[26]</sup>。本次实验中聚合反应的简要步骤如下:

1) 先用 3-丁烯酸(VAA)对 AuNR 进行表面修饰。将制备的 CTAB 稳定的 AuNR 水溶液(100 mL)离心 2 次(8000 r/min, 20 min),弃去上清液,并将沉淀物重新分散在 100 mL 去离子水中;然后将 AuNR 水溶液加热至 73 °C,在搅拌下加入 VAA(600 μL)并使反应在 73 °C 下进行 1 h。

2) 将所得溶液离心 1 次(8000 r/min, 20 min),弃去上清液,将沉淀物重新分散在 10 mL 去离子水中,将所得溶液转移到三口反应瓶中,再加入 *N*-异丙基丙烯酰胺(0.1 g)和 *N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(0.012 g),然后将其加热,待温度达到 70 °C 时用氮气吹扫溶液 15 min。关闭氮气流,通过添加 AAPH(200 μL, 25 mmol/L)来引发聚合。7~10 min 后,透明溶液变浑浊,聚合反应在(70±8) °C 下持续 6 h。将样品溶液在搅拌状态下冷却至室温,然后用去离子水(15 mL)稀释并离心 4 次(7500 r/min, 20 min),沉淀物冻干保存。

### 2.3 光热性能测试

AuNR@PNIPAM 微凝胶的体外光热性能测试:取 200 μL 质量浓度分别为 0.25、0.5、1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 水溶液和 PBS 置于光程为 5 mm 的比色皿中,测试前在室温下静置 10 min,以保证所有样品的起始温度基本一致。将待测比色皿置于光功率密度为 1.5 W/cm<sup>2</sup> 的 980 nm 连续激光下照射 20 min,用红外热成像仪记录样品溶液的温度变化情况。另外,取 3 组 200 μL 质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM

水溶液置于光程为 5 mm 的比色皿中,将比色皿置于光功率密度分别为 1.0、1.5、2.0 W/cm<sup>2</sup> 的 980 nm 连续激光下照射 20 min,利用红外成像仪记录样品溶液的温度变化。

AuNR@PNIPAM 微凝胶的光热稳定性测试:取 200  $\mu$ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 溶液置于光程为 5 mm 的比色皿中,将比色皿置于光功率密度为 1.5 W/cm<sup>2</sup> 的 980 nm 连续激光下照射 20 min,然后移开光源,使 AuNR@PNIPAM 溶液自然冷却 15 min。升温到自然冷却这一过程共重复 6 次,并利用红外热成像仪记录溶液的温度变化。

AuNR@PNIPAM 微凝胶的在体光热效应对比:将 100  $\mu$ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 和 PBS 分别皮下注射到 2 只 Balb/c 雌鼠同一组织部位(右侧后背),曝光光源为 980 nm 连续激光,其光功率密度为 1.5 W/cm<sup>2</sup>,用 0.2 cm<sup>2</sup> 的光斑照射感兴趣区域 30 min,用红外成像仪记录该区域组织的温度变化。

#### 2.4 光声性能测试

选用脉冲激光器(DS20HE-1064D/R, PHOTONICS)作为光声成像的激发光源,激光重复频率可调(仿体实验中的激光重复频率为 1 kHz,活体实验中的为 5 kHz),波长为 1064 nm,脉冲宽度为 11 ns。激光从激光器输出后,先经过扩束系统进行扩束,再经过准直系统,最后通过物镜聚焦照射到样品上。实验过程中对样品进行  $x$ - $y$  面点扫描和  $x$ - $z$  面点扫描,使用单

阵元探测器检测光声信号。采用的环形中空聚焦超声换能器的中心频率为 10 MHz,透光孔径为 6 mm,95% 带宽,焦距为 15.3 mm。检测到的光声(PA)信号经过滤波器(BLP-21.4+, Mini Circuits, New York, USA)后由放大器(LNA-650, RF Bay Inc., Maryland, USA)放大,再传输给采集卡。激光能量密度控制在 20 mJ/cm<sup>2</sup> 以下。这里所用成像算法为峰峰值投影算法,即:计算光声信号的最大值与最小值,求其差值得到图像。

### 3 结果与分析

#### 3.1 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 动态调制光声信号的原理

基于局域表面等离子体共振(LSPR)效应,AuNR 具有两个表面等离子体共振吸收峰,分别对应横向和纵向,可以方便地通过改变 AuNR 的长径比使其纵向表面等离子体共振峰位于近红外二区,而且其光吸收强度随周围环境折射率的变化而改变<sup>[27]</sup>。PNIPAM 水凝胶是一种被广泛应用的温敏聚合物,在其体积相变温度附近其折射率会发生突变。利用该原理,笔者选择纵向表面等离子体共振峰位于 960 nm 左右的 AuNR 作为热源,以 PNIPAM 作为温度响应开关,构建 AuNR@PNIPAM 核壳相变纳米探针,并通过调节单体比例和分子量来调整其体积相变温度接近生理温度<sup>[28]</sup>。如图 1 所示,在 980 nm 连续激光照射下,AuNR 通过光热效应产生热量并将热量传递给

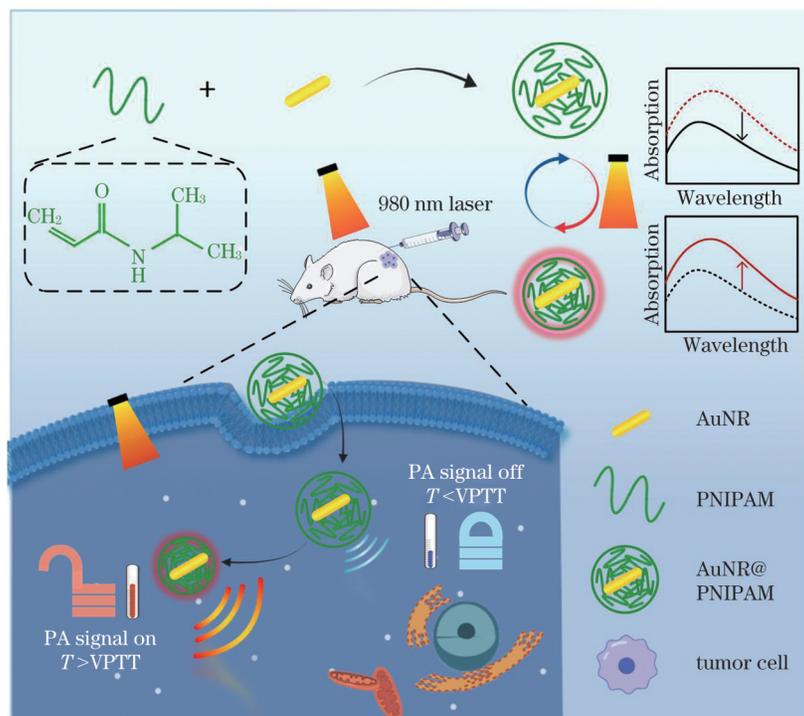


图 1 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 用于肿瘤高对比度光声成像示意图,通过外部近红外光(980 nm)刺激动态调制光声信号

Fig. 1 Schematic illustration of the thermosensitive phase change nanoprobe AuNR@PNIPAM for dynamic contrast-enhanced photoacoustic imaging of tumors, where an external near-infrared optical stimulus (980 nm) dynamically modulates photoacoustic signals

PNIPAM 壳,当温度高于体积相变温度时,微凝胶发生从溶胀态到坍塌态的体积相变。在溶胀状态下,微凝胶的含水量高,折射率较小(约等于水的折射率)。在坍塌状态下,微凝胶的折射率较大并接近 PNIPAM 的折射率<sup>[29]</sup>。这种由温升引起的体积相变驱使 AuNR 核周围的折射率急剧升高,核壳微凝胶的纵向表面等离子体共振峰红移,吸收峰强度增大,近红外二区光吸收急剧增强,产生的光声信号不断增强。综上所述,AuNR@PNIPAM 核壳微凝胶具有优异的温度响应特性,可以通过近红外光开关(980 nm)来调制其温度场,实现近红外二区光吸收的可逆切换,控制光声信号的关闭和开启。

### 3.2 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的表征

首先对制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶的形貌和尺寸进行表征,结果如图 2(a)所示。随着温度升高,AuNR@PNIPAM 水溶液的颜色从透明红棕色变成粉红色,这是因为高温下 AuNR@PNIPAM 微凝胶坍塌,折射率增大。为了验证微凝胶的形貌和尺寸,采用透射电子显微镜观测了 AuNR@PNIPAM 微凝胶在

50 °C 和 25 °C 下的形貌,可以清楚地看到:在坍塌(50 °C)和溶胀(25 °C)状态下,PNIPAM 壳的直径分别约为 300 nm 和 400 nm;所制备的微凝胶呈现单一的核壳球形结构,整体分布均匀;当温度升至 50 °C(在体积相变温度之上)时,PNIPAM 壳的体积与 25 °C 时相比约减小了 57.81%。此外,通过动态光散射(DLS)检测了 AuNR@PNIPAM 微凝胶在不同温度下的水合粒径,结果如图 2(b)所示。在溶胀(25 °C)和坍塌(50 °C)状态下测得的水合粒径分别约为 465.07 nm 和 404.56 nm,粒径尺寸明显大于 TEM 结果,这是因为水合粒径状态下的微凝胶含有较高比例的水<sup>[30]</sup>。随着温度升高,DLS 测得的微凝胶的粒径尺寸呈现出变小的趋势,这与 TEM 观测结果一致。通过 Zeta 电位测定得到 PNIPAM 包裹 AuNR 前后的 Zeta 电位分别为  $(37.48 \pm 1.76)$  mV 和  $(-9.31 \pm 0.10)$  mV,证实了 AuNR 核被 PNIPAM 壳成功包裹。

为了进一步表征 AuNR@PNIPAM 微凝胶的温度灵敏度,测量了 AuNR@PNIPAM 水溶液在 37~50 °C 范围内的吸收光谱。如图 2(c)所示,微凝胶的吸收光谱显示出与 AuNR 相似的 LSPR 吸收峰,同样表明 AuNR 被

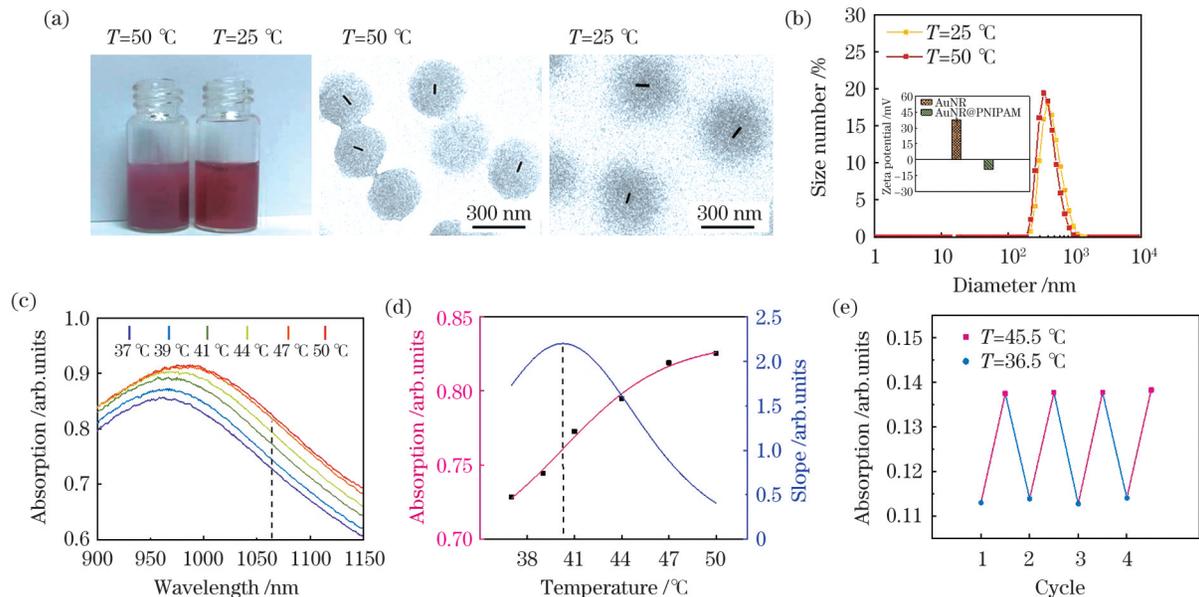


图 2 AuNR@PNIPAM 微凝胶的表征分析。(a)采用透射电镜(TEM)表征 AuNR@PNIPAM 微凝胶的热响应尺寸和形貌变化特征,从左到右依次是不同温度(50 °C和 25 °C)下 AuNR@PNIPAM 水溶液的照片、在 50 °C下制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶的透射电镜照片以及在 25 °C下制备 AuNR@PNIPAM 微凝胶的透射电镜照片;(b)采用 DLS 分析不同温度(50 °C和 25 °C)下 AuNR@PNIPAM 微凝胶的流体动力学尺寸,插图为 AuNR 和 AuNR@PNIPAM 的 Zeta 电位图;(c)不同温度下 AuNR@PNIPAM 微凝胶的吸收光谱;(d)AuNR@PNIPAM 微凝胶在 1064 nm 处的光吸收与温度的函数关系;(e)在温度高于和低于体积相变温度中点的加热循环期间,AuNR@PNIPAM 微凝胶在 1064 nm 处的光吸收的可逆性

Fig. 2 Characterization of AuNR@PNIPAM microgels. (a) Feature of temperature-responsive size and morphology change of AuNR@PNIPAM microgels analyzed by TEM, the images are arranged from left to right and include: the photographs of AuNR@PNIPAM aqueous solution at different temperatures (50 °C and 25 °C), TEM image of AuNR@PNIPAM microgels prepared at 50 °C and TEM image of AuNR@PNIPAM microgels prepared at 25 °C; (b) hydrodynamic size of AuNR@PNIPAM microgels at different temperatures (50 °C and 25 °C) analyzed by DLS, the inset is Zeta potentials of AuNR and AuNR@PNIPAM; (c) absorption spectra of AuNR@PNIPAM microgels at different temperatures; (d) absorption at 1064 nm of AuNR@PNIPAM microgels varies with temperature; (e) reversibility in absorption of AuNR@PNIPAM microgels at 1064 nm during heating cycles above and below AuNR@PNIPAM microgels' phase transition midpoint

PNIPAM 壳成功包裹住。在 37~44 °C 范围内, AuNR@PNIPAM 微凝胶的纵向表面等离子体共振峰发生红移(与包裹前相比),约红移了 12 nm;同时,其在 1064 nm 处的光吸收增强了约 9.10%。这是由于周围温度持续升高并超过了 PNIPAM 的体积相变温度,使其发生溶胀-坍塌相变, AuNR 核周围的折射率急剧增大,导致纵向表面等离子体共振峰红移以及吸收峰强度增大。绘制了微凝胶在 1064 nm 处的光吸收与温度的函数关系图,如图 2(d)所示,并且通过对其求一阶导数确定了体积相变温度约为 40 °C,此时 AuNR@PNIPAM 微凝胶光吸收增强速率随温度的变化最快。此外,为了证明所制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶温敏性相变的可逆性,测量了其在 4 个连续加热冷却循环(从 36.5 °C 到 45.5 °C)期间在 1064 nm 处的光吸收变化,如图 2(e)所示。在图 2(e)中可以观察到光吸收的周期性变化,验证了该微凝胶相变的可持续性和可重复性,证明了温度响应的稳健性。以上结果表明,所制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶具有良好的温度响应性能,能较好地满足对肿瘤高对比度光声成像的灵敏度要求。

### 3.3 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的体外光声成像

由于 AuNR@PNIPAM 微凝胶的近红外二区光吸收具有温度响应特性,笔者研究了不同温度下

AuNR@PNIPAM 微凝胶的光声成像效果。将不同质量浓度(3.5 mg/mL 和 5 mg/mL)的 AuNR@PNIPAM 水溶液注入透明橡胶管(内径为 1 mm,厚度为 0.1 mm)中,并保证注入的体积相同,然后用 1064 nm 激光对样品进行 *x-y* 面点扫描,使用单阵元探测器检测光声信号,激发光的能量密度控制在约 20 mJ/cm<sup>2</sup> 以下。其中 AuNR@PNIPAM 仿体样品置于水槽中,温度由精度为 0.1 °C 的外部水浴恒温系统控制,测试温度为 37 °C 和 45 °C。将测得的光声信号进行归一化处理。图 3(a) 是不同温度下光声信号在图 3(c) 白色实线位置处的峰峰值投影曲线,该图显示信号幅值与温度呈正相关。图 3(c) 描绘了不同温度下的光声信号二维图, AuNR@PNIPAM 光声图像强度随着温度升高明显增强。对图 3(c) 中的光声图像强度进行统计分析得到图 3(b),可见:随着溶液温度从 37 °C 升至 45 °C, AuNR@PNIPAM 的光声信号幅值在质量浓度为 3.5 mg/mL 时增强幅度较大,增强了 49.0%,而对对照组 AuNR 的光声信号只增强了 17.6%。这些结果表明所制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶具有良好的温度响应特性,可用于动态增强光声成像,从而有效抑制背景信号。

### 3.4 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的光热成像

为了评估 AuNR@PNIPAM 微凝胶的体外光热性

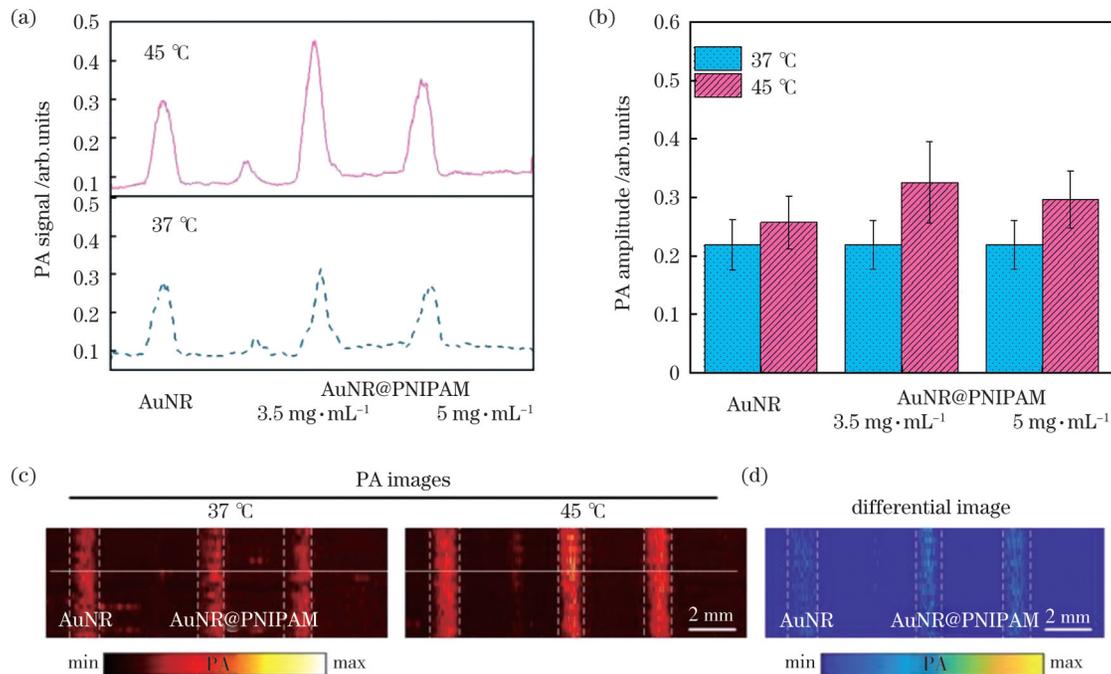


图 3 验证 AuNR@PNIPAM 微凝胶的温度响应特性。(a)不同温度下 AuNR@PNIPAM 微凝胶光声信号在(c)图实线位置处的峰峰值投影曲线;(b)不同温度下 AuNR@PNIPAM 微凝胶光声信号幅值的统计结果;(c)不同温度下 AuNR@PNIPAM 微凝胶的二维光声图像;(d)AuNR@PNIPAM 微凝胶和 AuNR 的光声差图(37 °C 和 45 °C)

Fig. 3 Temperature-responsive property of AuNR@PNIPAM microgels. (a) Peak to peak value projection of the photoacoustic signal of AuNR@PNIPAM microgels at different temperatures at the position of the solid line in Fig. 3(c); (b) photoacoustic signal amplitude statistics of AuNR@PNIPAM microgels at different temperatures; (c) two-dimensional photoacoustic images of AuNR@PNIPAM microgels at different temperatures; (d) PA difference image of AuNR@PNIPAM microgels and AuNR samples (37 °C and 45 °C)

能,将 AuNR@PNIPAM 微凝胶置于 980 nm 连续激光下进行照射,并利用红外热像仪实时记录其温差模式下的温升曲线。以 PBS 作为对照组,检测 200  $\mu\text{L}$  不同质量浓度的 AuNR@PNIPAM 微凝胶在不同激光功率密度的 980 nm 连续激光照射下的温升曲线。首先测量质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 微凝胶在不同光功率密度的 980 nm 连续激光照射下的温升,结果如图 4(a)所示。分析图 4(a)可得:温度随着激光功率的增加而升高;当激光功率密度达到  $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$  时,1 mg/mL AuNR@PNIPAM 微凝胶的温升幅值  $\Delta T$  在短时间内(10 min)迅速达到约  $8.1^\circ\text{C}$ 。接着使用光功率密度为  $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$  的 980 nm 连续激光照射不同质量浓度的 AuNR@PNIPAM 微凝胶,由图 4(b)可知 AuNR@PNIPAM 微凝胶质量浓度与温升幅值  $\Delta T$  呈正相关关系:随着微凝胶质量浓度从  $0.25 \text{ mg}/\text{mL}$  增加到  $1 \text{ mg}/\text{mL}$ ,温度变化最大值略有提高,提高了约  $1.2^\circ\text{C}$ 。然后对质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 微凝胶进行 6 个加热冷却循环。如图 4(c)所示, AuNR@PNIPAM 微凝胶在后 4 个激光照射周期内的温升幅值  $\Delta T$  最大值始终约为  $7.5^\circ\text{C}$ ,且峰形无明显变

化,这表明 AuNR@PNIPAM 微凝胶具有良好的光热稳定性。上述结果表明制备的 AuNR@PNIPAM 微凝胶具有高效的、稳定的近红外二区光热转换效果。

使用红外热成像仪监测了 AuNR@PNIPAM 微凝胶的体内光热效应,以显示辐照时间依赖性的光热行为。以 PBS 为对照组,将  $100 \mu\text{L}$  的 PBS 和质量浓度为 1 mg/mL 的 AuNR@PNIPAM 微凝胶分别皮下注射到正常小鼠的同一部位(右侧后背,确保注射深度保持相对一致),并实时成像。图 4(d)记录了在激光功率密度为  $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$  的 980 nm 连续激光照射下,间隔 10 min 的光热图像。可见,注射微凝胶的组织区域的局部温度随暴露时间明显升高,小鼠其他身体部位未观察到明显的温升,而对照组注射 PBS 的组织区域则观察到了轻微的温升。图 4(e)统计分析了注射 AuNR@PNIPAM 微凝胶组织区域的温升随辐照时间的变化情况, PBS 组的温升幅值约为  $3.0^\circ\text{C}$ ,而 AuNR@PNIPAM 微凝胶组的温升更快。注射微凝胶的组织区域的局部温升幅值在 10 min 内迅速超过  $6.0^\circ\text{C}$ ,最后温升幅值稳定在  $6.9^\circ\text{C}$  左右。这一温升不足以引起不可逆的细胞损伤,同时达到了 PNIPAM 壳的相变温度。由于探针吸收

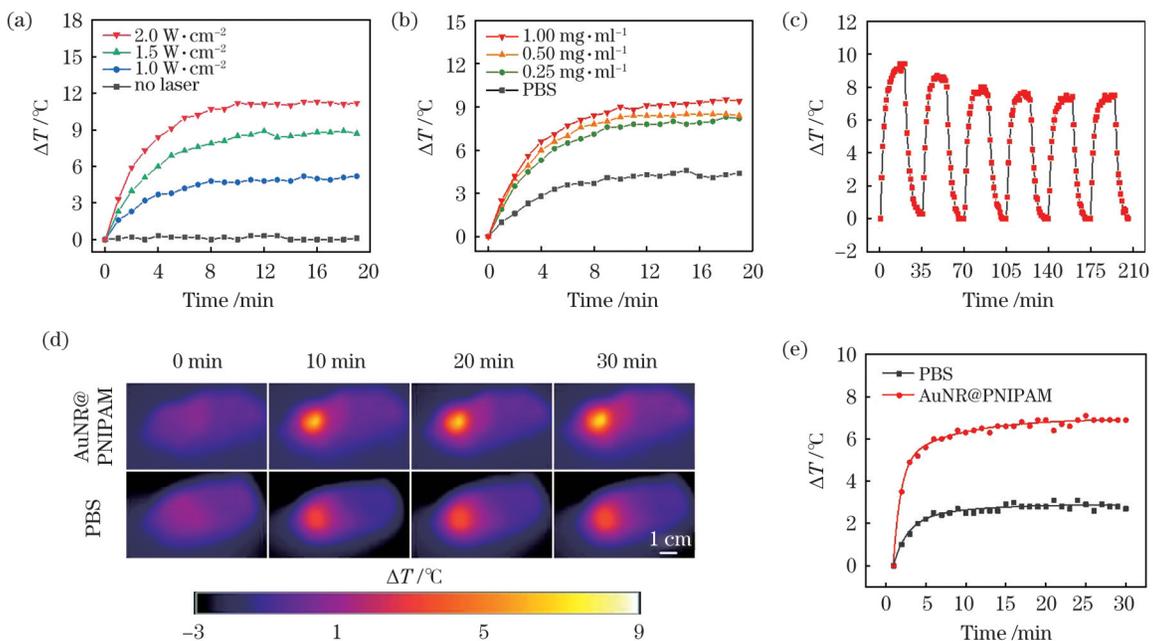


图 4 AuNR@PNIPAM 微凝胶的光热性能测试。(a)在不同激光功率密度的 980 nm 激光照射下,1 mg/mL AuNR@PNIPAM 微凝胶温升随时间的变化;(b)不同质量浓度 AuNR@PNIPAM 微凝胶在 980 nm 激光( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 20 min)照射下的温升随时间的变化;(c)1 mg/mL AuNR@PNIPAM 微凝胶在 980 nm 激光( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 20 min)照射下的光热稳定性;(d)注射 PBS 和 AuNR@PNIPAM(1 mg/mL)后 980 nm 激光( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ )照射下小鼠皮下组织的光热图像;(e)实时记录注射 PBS 和 AuNR@PNIPAM(1 mg/mL)后 980 nm 激光( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 30 min)照射下小鼠皮下组织的升温曲线

Fig. 4 Photothermal property of AuNR@PNIPAM microgels. (a) Temperature rise versus time for 1 mg/mL AuNR@PNIPAM microgels irradiated by 980 nm laser with different laser power densities; (b) temperature rise versus time for different mass concentrations of AuNR@PNIPAM microgels under 980 nm laser irradiation ( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 20 min); (c) photothermal stability of 1 mg/mL AuNR@PNIPAM microgels under 980 nm laser irradiation ( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 20 min); (d) photothermal images of subcutaneous tissue of mice injected with PBS or AuNR@PNIPAM (1 mg/mL) under 980 nm laser irradiation ( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ ); (e) real-time recording of the temperature rise curve of subcutaneous tissue of mice injected with PBS or AuNR@PNIPAM (1 mg/mL) under 980 nm laser irradiation ( $1.5 \text{ W}/\text{cm}^2$ , 30 min)

激光能量后产生的热会传导给周围组织,因此探针的实际温度变化大于探测到的周围组织的温升(6.9 °C),可以推测 AuNR@PNIPAM 本身的温度超过了其相变温度(40.0 °C)。上述结果验证了 AuNR@PNIPAM 微凝胶具有良好的近红外二区光热转换效率,可以利用近红外光(980 nm)来调制温度场从而触发 AuNR@PNIPAM 的温敏性相变。

### 3.5 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的体内光声成像

为了验证 AuNR@PNIPAM 微凝胶在体内的光声成像能力,将其注入正常小鼠背部皮下组织,注射 PBS 的小鼠为对照组,并采用波长为 1064 nm 的激光对其进行光声成像。图 5(a)为注射 PBS、PNIPAM 微凝胶和 AuNR@PNIPAM 微凝胶的小鼠皮下组织光声

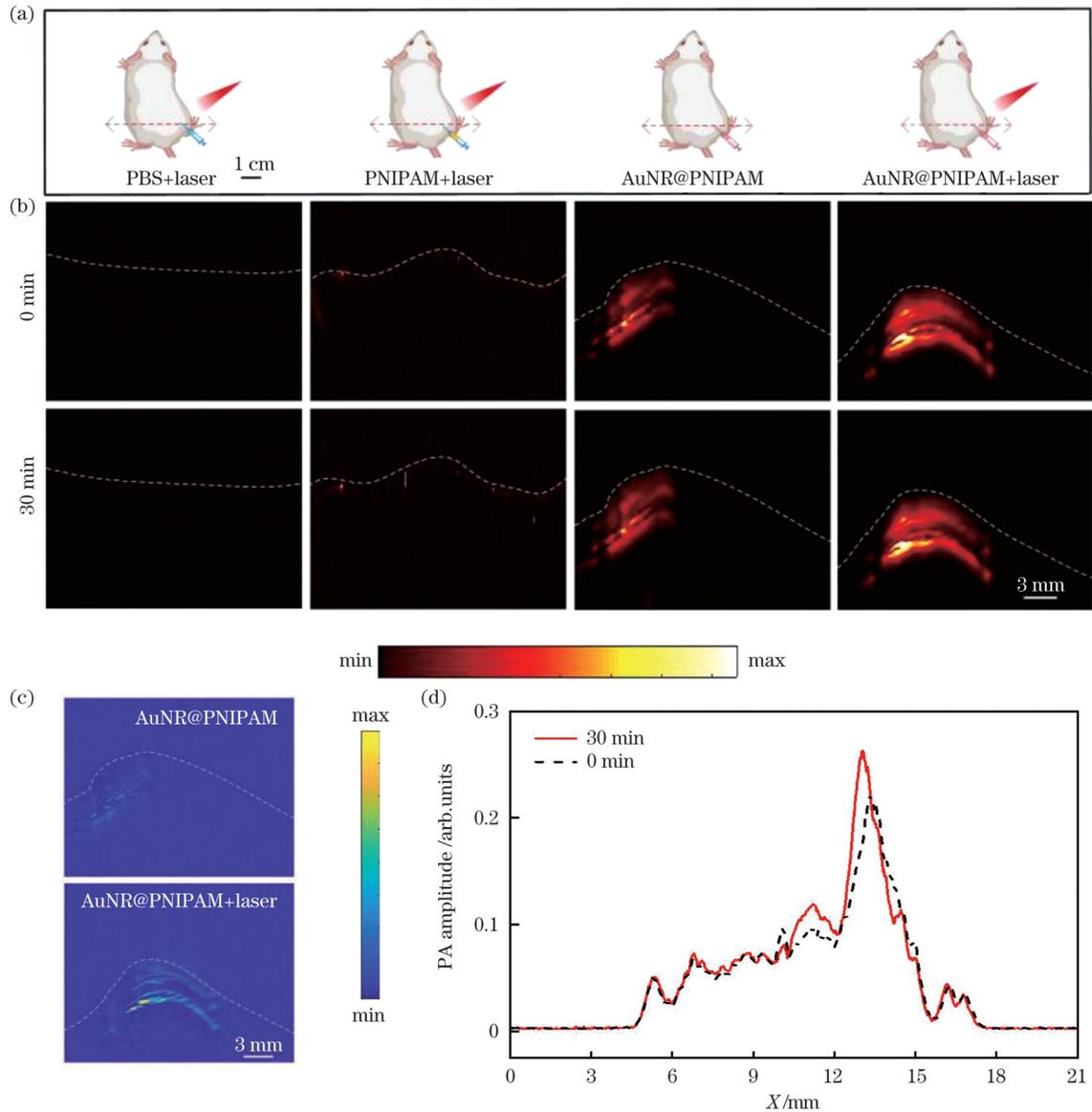


图 5 AuNR@PNIPAM 微凝胶体内光声成像验证。(a)注射 PBS、PNIPAM 微凝胶和 AuNR@PNIPAM 微凝胶的小鼠皮下组织光声成像示意图;(b)图 5(a)中虚线位置处的  $x-z$  断层成像,从左到右依次是注射 PBS(980 nm 激光打开)、PNIPAM(980 nm 激光打开)、AuNR@PNIPAM(980 nm 激光关闭)和 AuNR@PNIPAM(980 nm 激光打开)后暴露 30 min 小鼠皮下组织的光声图像;(c)980 nm 激光关闭和打开情况下,注射 AuNR@PNIPAM 的小鼠皮下组织的光声差图;(d)注射 AuNR@PNIPAM(980 nm 激光打开)的小鼠皮下组织在虚线所在位置处的光声信号幅值的峰峰值投影曲线

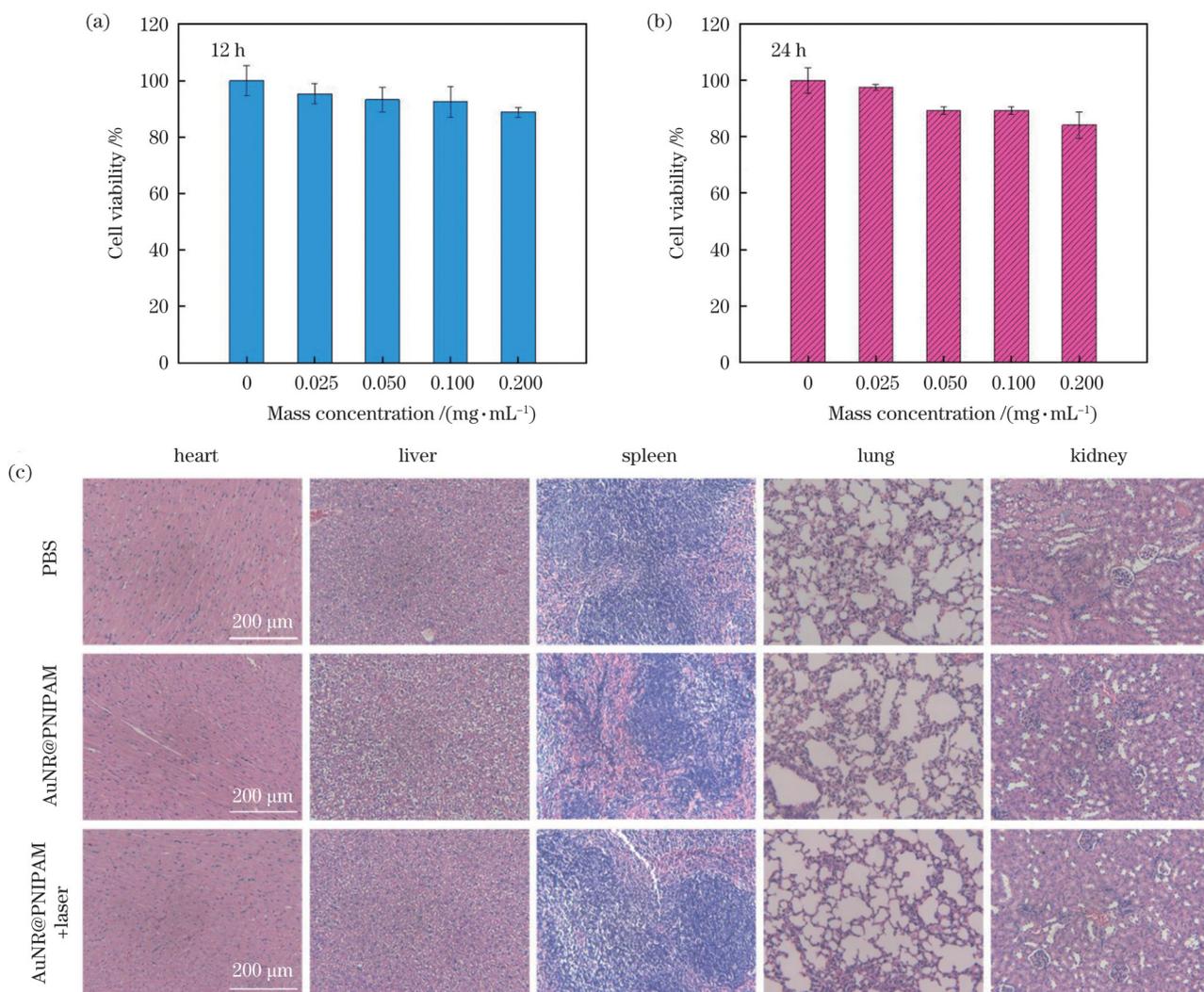
Fig. 5 *In vivo* photoacoustic imaging verification of AuNR@PNIPAM microgels. (a) Schematic diagrams of photoacoustic imaging of subcutaneous tissue of mice injected with PBS, PNIPAM microgels and AuNR@PNIPAM microgels; (b)  $x-z$  tomography at the position of the corresponding dotted line in Fig. 5(a), these photoacoustic images of mice with 30 min laser irradiation are arranged from left to right according to three experimental conditions: injection of PBS (980 nm laser on), PNIPAM (980 nm laser on), AuNR@PNIPAM (980 nm laser off) and AuNR@PNIPAM (980 nm laser on); (c) photoacoustic difference images of subcutaneous tissue of mice with injection of AuNR@PNIPAM under the conditions of 980 nm laser off or on; (d) peak to peak value projection of the photoacoustic signal amplitude at the position of the dotted line of subcutaneous tissue of mice with injection of AuNR@PNIPAM (980 nm laser on)

成像示意图。将小鼠皮下组织置于光功率密度为  $1.5 \text{ W/cm}^2$  的  $980 \text{ nm}$  连续激光下照射  $30 \text{ min}$ , 并对小鼠目标位置[图 5(a)虚线处]进行  $x-z$  面点扫描, 同时采用单阵元探测器检测光声信号, 得到的光声图像如图 5(b) 所示。相较于对照组 1 (注射 PBS+ $980 \text{ nm}$  激光照射), 对照组 2 (注射 PNIPAM 微凝胶+ $980 \text{ nm}$  激光照射) 和对照组 3 (仅注射 AuNR@PNIPAM 微凝胶), 实验组 (注射 AuNR@PNIPAM 微凝胶+ $980 \text{ nm}$  激光照射) 的光声信号随着  $980 \text{ nm}$  激光照射明显增强, 而 3 个对照组的光声信号几乎不变。这一结果证明了 AuNR@PNIPAM 微凝胶在  $980 \text{ nm}$  激光照射下可以利用温度触发增强光声信号。图 5(c) 是对照组 3 和实验组的光声差图。该图显示, 通过对激光照射前后的光声图像进行差分处理, 可以有效抑制背景信号并识别目标区域。对实验组 (注射 AuNR@PNIPAM 微凝胶+ $980 \text{ nm}$  激光照射) 的光声信号在图 5(a) 虚线位置处的峰峰值投影曲线进行统计分析, 分析结果如图 5(d) 所示。与激光照射前相比, 激光照射后的光声信号幅值增强了  $24.43\%$ 。以上结果为 AuNR@PNIPAM 微凝胶用于温度响应的肿瘤高对比度光声成像提供了参考。

### 3.6 温度响应型相变纳米探针 AuNR@PNIPAM 的毒性验证

为了验证纳米粒子的生物相容性, 采用 CCK-8 试剂检测盒检测 AuNR@PNIPAM 的体外细胞毒性。选用人肝癌细胞 HepG2 进行体外实验及建模。图 6(a)、(b) 所示的统计实验数据表明, 在最大质量浓度的实验条件下, 细胞存活率保持在  $84\%$  以上。这一结果说明 AuNR@PNIPAM 对细胞生长没有明显的不良影响。

为进一步验证 AuNR@PNIPAM 的体内毒性, 将 Balb/c 雌鼠 ( $3\sim 4$  周龄) 随机分为 3 组, 将注射 PBS 和 AuNR@PNIPAM 的小鼠作为对照组, 将注射 AuNR@PNIPAM 并进行  $980 \text{ nm}$  激光照射的小鼠作为实验组。实验组小鼠于注射后用光功率密度为  $1.5 \text{ W/cm}^2$  的  $980 \text{ nm}$  激光照射  $5 \text{ min}$ 。首先评估小鼠主要器官的病理结构, 如图 6(c) 所示, AuNR@PNIPAM 微凝胶和  $980 \text{ nm}$  激光照射不会对小鼠的主要器官造成损害。接着在小鼠静脉注射  $1 \text{ d}$  后采集  $0.6\sim 0.8 \text{ mL}$  的血液进行全血分析, 系统地分析了血清生化参数和血液学参数。图 6(d)、(e) 显示, 与 PBS 组相比, 实验组小鼠的血生化各项指标和血常规各项指标未见明显异常, 说明 AuNR@PNIPAM 微凝胶和  $980 \text{ nm}$  激光照



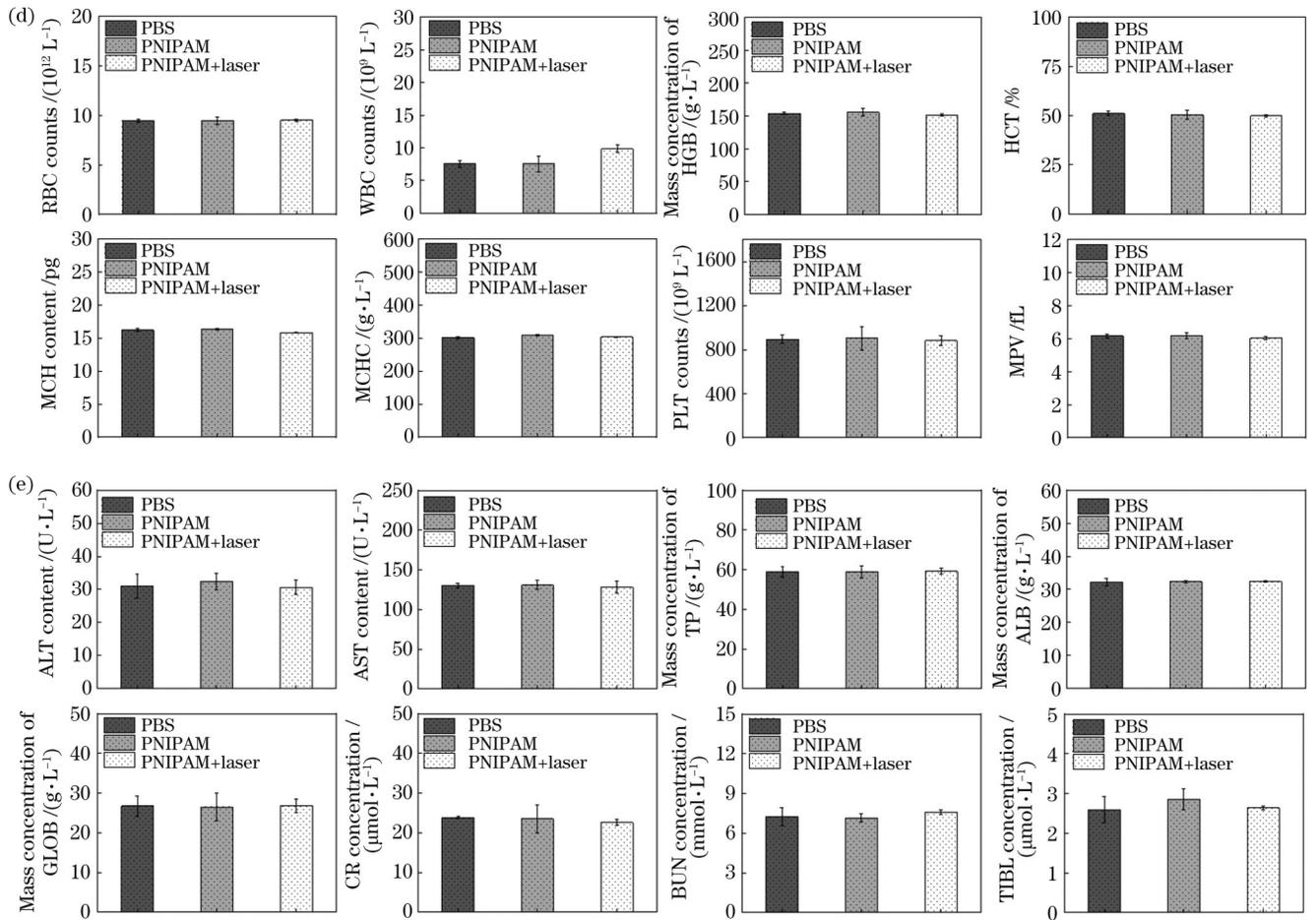


图6 AuNR@PNIPAM微凝胶的体外毒性验证。(a)(b)CCK-8试剂盒检测与不同质量浓度AuNR@PNIPAM共孵育12、24 h后的HepG2的细胞活性;(c)注射PBS、AuNR@PNIPAM(1 mg/mL, 980 nm激光关闭)、AuNR@PNIPAM(1 mg/mL, 980 nm激光开启)1 d后正常小鼠不同器官的H&E染色图;(d)静脉注射PBS、AuNR@PNIPAM(1 mg/mL, 980 nm激光关闭)、AuNR@PNIPAM(1 mg/mL, 980 nm激光开启)1 d后正常小鼠的血液学分析(RBC:红细胞;WBC:白细胞;HGB:血红蛋白;HCT:血细胞比容;MCH:平均红细胞血红蛋白;MCHC:平均红细胞血红蛋白质量浓度;PLT:血小板;MPV:平均血小板体积);(e)静脉注射PBS、AuNR@PNIPAM(980 nm激光关闭)、AuNR@PNIPAM(980 nm激光开启)1 d后正常小鼠的血清生化分析(ALT:丙氨酸氨基转移酶;AST:天门冬氨酸氨基转移酶;TP:总蛋白;ALB:白蛋白;GLOB:球蛋白;CR:肌酐;BUN:血尿素氮;TBIL:总胆红素)

Fig. 6 *In vitro* cytotoxicity assay of AuNR@PNIPAM microgel. (a)(b) CCK-8 kit assays for cellular activity of HepG2 after co-cubation with different mass concentrations of AuNR@PNIPAM microgels for 12 h and 24 h; (c) H&E-stained images of different organs of mice after 1 d intravenous injection with PBS, AuNR@PNIPAM microgels (1 mg/mL, 980 nm laser off), and AuNR@PNIPAM (1 mg/mL, 980 nm laser on); (d) blood hematology analyses of healthy mice after 1 d of intravenous injection with PBS, AuNR@PNIPAM (1 mg/mL, 980 nm laser off), and AuNR@PNIPAM (1 mg/mL, 980 nm laser on) (RBC: red blood cells; WBC: white blood cells; HGB: haemoglobin; HCT: haematocrit; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular haemoglobin concentration; PLT: platelets; MPV: mean platelet volume); (e) serum biochemistry analyses of healthy mice after 1 d of intravenous injection with PBS, AuNR@PNIPAM (1 mg/mL, 980 nm laser off), and AuNR@PNIPAM (1 mg/mL, 980 nm laser on) (ALT: alanine transaminase; AST: aspartate transaminase; TP: total protein; ALB: albumin; GLOB: globulin; CR: creatinine; BUN: blood urea nitrogen; TBIL: total bilirubin)

射未在小鼠模型中引起明显的感染和炎症反应。上述结果表明,AuNR@PNIPAM微凝胶具有良好的生物相容性和较低的细胞毒性。

## 4 结 论

制备的可逆温度响应型相变纳米探针AuNR@PNIPAM可以在生理温度(37 °C)附近放大其

光声信号,实现对肿瘤的高对比度光声成像。AuNR@PNIPAM微凝胶具有可逆的温度响应特性,在生理温度附近,溶胀的PNIPAM壳随温度升高发生坍塌,从而表现出增强的近红外二区光吸收和放大的光声信号,进一步抑制了背景信号。这种由温度相变引起的光声信号放大可以通过外部近红外光(980 nm)开关来实现。最后,通过体内实验证明了AuNR@PNIPAM

有望实现肿瘤高对比度光声成像。此外,PNIPAM的包裹有效提升了 AuNR 的结构稳定性和生物相容性,有助于 AuNR@PNIPAM 在生物医学领域的进一步推广应用。

### 参 考 文 献

- [1] Bell A G. On the production and reproduction of sound by light[J]. American Journal of Science, 1880, 3(118): 305-324.
- [2] Wang L V. Prospects of photoacoustic tomography[J]. Medical Physics, 2008, 35(12): 5758-5767.
- [3] 穆根, 张振辉, 王玉娇. 生物医学影像中的光声成像技术[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007208.  
Mu G, Zhang Z H, Shi Y J. Photoacoustic imaging technology in biomedical imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007208.
- [4] Kobat D, Durst M E, Nishimura N, et al. Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation[J]. Optics Express, 2009, 17(16): 13354-13364.
- [5] Balu M, Baldacchini T, Carter J L, et al. Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media[J]. Journal of Biomedical Optics, 2009, 14(1): 010508.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Li W W, Chen X Y. Gold nanoparticles for photoacoustic imaging [J]. Nanomedicine, 2015, 10(2): 299-320.
- [9] Chen Y S, Frey W, Kim S, et al. Silica-coated gold nanorods as photoacoustic signal nanoamplifiers[J]. Nano Letters, 2011, 11(2): 348-354.
- [10] Ng K K, Shakiba M, Huynh E, et al. Stimuli-responsive photoacoustic nanoswitch for *in vivo* sensing applications[J]. ACS Nano, 2014, 8(8): 8363-8373.
- [11] Dai Y N, Su J Z, Wu K, et al. Multifunctional thermosensitive liposomes based on natural phase-change material: near-infrared light-triggered drug release and multimodal imaging-guided cancer combination therapy[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2019, 11(11): 10540-10553.
- [12] Xie J, Li A Q, Li J S. Advances in pH-sensitive polymers for smart insulin delivery[J]. Macromolecular Rapid Communications, 2017, 38(23): 1700413.
- [13] Li H M, Jiang H, Zhao M N, et al. Intracellular redox potential-responsive micelles based on polyethylenimine-cystamine-poly( $\epsilon$ -caprolactone) block copolymer for enhanced miR-34a delivery[J]. Polymer Chemistry, 2015, 6(11): 1952-1960.
- [14] Peng W L, Zhang Z P, Rong M Z, et al. Core-shell structure design of hollow mesoporous silica nanospheres based on thermo-sensitive PNIPAM and pH-responsive catechol-Fe<sup>3+</sup> complex[J]. Polymers, 2019, 11(11): 1832.
- [15] Gliozzi A S, Miniaci M, Chiappone A, et al. Tunable photo-responsive elastic metamaterials[J]. Nature Communications, 2020, 11: 2576.
- [16] Lü R C, Yang P P, He F, et al. A yolk-like multifunctional platform for multimodal imaging and synergistic therapy triggered by a single near-infrared light[J]. ACS Nano, 2015, 9(2): 1630-1647.
- [17] Huang P, Rong P F, Jin A, et al. Dye-loaded ferritin nanocages for multimodal imaging and photothermal therapy[J]. Advanced Materials, 2014, 26(37): 6401-6408.
- [18] Lin L S, Yang X Y, Niu G, et al. Dual-enhanced photothermal conversion properties of reduced graphene oxide-coated gold superparticles for light-triggered acoustic and thermal theranostics [J]. Nanoscale, 2016, 8(4): 2116-2122.
- [19] Topete A, Alatorre-Meda M, Villar-Alvarez E M, et al. Polymeric-gold nanohybrids for combined imaging and cancer therapy[J]. Advanced Healthcare Materials, 2014, 3(8): 1309-1325.
- [20] Meyer D E, Shin B C, Kong G A, et al. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia[J]. Journal of Controlled Release, 2001, 74(1/2/3): 213-224.
- [21] Drake P, Cho H J, Shih P S, et al. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumour therapy *via* magnetic field hyperthermia [J]. Journal of Materials Chemistry, 2007, 17(46): 4914-4918.
- [22] Cao Y X, Zhang C, Shen W B, et al. Poly(N-isopropylacrylamide)-chitosan as thermosensitive *in situ* gel-forming system for ocular drug delivery[J]. Journal of Controlled Release, 2007, 120(3): 186-194.
- [23] Schild H G. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application[J]. Progress in Polymer Science, 1992, 17(2): 163-249.
- [24] Jones C D, Lyon L A. Synthesis and characterization of multiresponsive core-shell microgels[J]. Macromolecules, 2000, 33(22): 8301-8306.
- [25] Ye X C, Zheng C, Chen J, et al. Using binary surfactant mixtures to simultaneously improve the dimensional tunability and monodispersity in the seeded growth of gold nanorods[J]. Nano Letters, 2013, 13(2): 765-771.
- [26] Contreras-Cáceres R, Pastoriza-Santos I, Alvarez-Puebla R, et al. Growing Au/Ag nanoparticles within microgel colloids for improved surface-enhanced Raman scattering detection[J]. Chemistry—A European Journal, 2010, 16(31): 9462-9467.
- [27] Link S, Mohamed M B, El-Sayed M A. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 1999, 103(16): 3073-3077.
- [28] Pamies R, Zhu K Z, Kjøniksen A L, et al. Thermal response of low molecular weight poly-(N-isopropylacrylamide) polymers in aqueous solution[J]. Polymer Bulletin, 2009, 62(4): 487-502.
- [29] Toma M, Jonas U, Mateescu A, et al. Active control of SPR by thermoresponsive hydrogels for biosensor applications[J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2013, 117(22): 11705-11712.
- [30] Philipp M, Kyriakos K, Silvi L, et al. From molecular dehydration to excess volumes of phase-separating PNIPAM solutions[J]. The Journal of Physical Chemistry B, 2014, 118(15): 4253-4260.

# Temperature-Responsive Phase-Change AuNR@PNIPAM Nanoprobe for the Second Near-Infrared Region Tumor-Contrast Photoacoustic Imaging

Sun Xiaodong<sup>1,2</sup>, Shi Yujiao<sup>1,2\*</sup>

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

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

## Abstract

**Objective** The considerable potential of temperature-responsive nanomaterials as contrast agents has driven research and development in the field of photoacoustic imaging in recent years. However, the temperature-sensitive nanoprobe currently reported have response temperatures that exceed the tolerable range of humans, and their reversibility is low, which are two serious problems that hinder imaging and long-term monitoring in practical applications. Molecular photoacoustic imaging has emerged as a noninvasive imaging modality for cancer diagnosis, which couples superb optical absorption contrast and an excellent ultrasonic spatial resolution. However, research on molecular photoacoustic imaging has focused on optical wavelengths in the visible and near-infrared (NIR) part of the spectrum between 550 and 900 nm, with a relatively low sensitivity and limited imaging depth. Of note, the characteristic molecules of many major diseases—particularly in the early stage—exhibit no obvious photoacoustic contrast in the optical window of biological tissue (NIR-I, 650–950 nm; NIR-II, 950–1700 nm). Moreover, most of the current photoacoustic contrast agents are “always-on” probes, which can only provide invariable imaging contrast and struggle to eliminate the inherent background effect of biological tissues. In contrast, activable photoacoustic contrast agents can respond to a given cancer biomarker and emit signals. Therefore, there is an urgent need to develop a stimulus-responsive photoacoustic probe for the second NIR region. In this paper, a reversible temperature-responsive phase-change AuNR@PNIPAM nanoprobe is proposed that can dynamically modulate the temperature field through an external NIR optical switch to obtain contrast-enhanced photoacoustic images.

**Methods** When the temperature-sensitive AuNR@PNIPAM microgel is delivered to tumor tissue under 980 nm laser irradiation, the gold nanorod core absorbs NIR light energy, triggering a phase transition of the PNIPAM shell. As the temperature exceeds the volume phase transition temperature (VPTT) of PNIPAM, the PNIPAM hydrogel undergoes a sol-gel phase transition, which increases the refractive index around the gold nanorod, inducing a redshift of the localized surface plasmon resonance band and an increase in the absorption-peak intensity of the microgel. Therefore, these microgels exhibit enhanced and switchable NIR absorption in the physiological temperature range, allowing high-contrast imaging of tumors.

**Results and Discussions** The authors characterized the morphology and temperature response of the synthesized AuNR@PNIPAM microgel. It was observed that PNIPAM was successfully compounded onto AuNR, and when the temperature exceeded the VPTT of PNIPAM, the volume change of the PNIPAM hydrogel resulted in a change in the refractive index, enhancing the absorption in the second NIR region, as illustrated in Fig. 2. Furthermore, the microgel exhibited a high and stable photothermal conversion efficiency in *in vitro* and *in vivo* photothermal experiments, as shown in Fig. 4. The experimental results in Fig. 5 confirmed that the prepared AuNR@PNIPAM microgel could enhance the photoacoustic imaging contrast when an external NIR optical switch was used to trigger the temperature phase transition. Therefore, owing to their excellent photoacoustic imaging contrast ability, AuNR@PNIPAM microgels have considerable potential for early cancer diagnosis and hyperthermia detection.

**Conclusions** In this study, the photoacoustic signal of AuNR@PNIPAM microgels was amplified near the physiological temperature, indicating their feasibility for high-contrast photoacoustic imaging of tumors. AuNR@PNIPAM microgels exhibited improved NIR-II absorption under 980 nm laser irradiation, because of a redshift of the localized surface plasmon resonance band and an increase in the absorption-peak intensity. Furthermore, the prepared AuNR@PNIPAM microgels exhibited reversible temperature-responsive characteristics and an efficient and stable photothermal conversion effect; hence, they could modulate the temperature field through the NIR optical switch to realize the reversible switching of NIR-II absorption. Thus, these microgels could control the turning on/off of the photoacoustic signal to suppress the unwanted background signals. This work proposes a strategy for achieving high-contrast imaging of tumors by dynamically responding to temperature stimuli, providing guidance for the development of temperature-responsive smart photoacoustic probes for enhancing imaging contrast.

**Key words** bio-optics; temperature response; phase change; poly(*N*-isopropylacrylamide); contrast enhancement