

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.18.003

可 NIR-II 荧光成像的多功能化疗栓塞微球 PLGA@Re-DOX 的制备及其在肝癌荧光手术导航中的应用*

李雪晓¹ 谢旒² 王晓彤¹ 殷佳慧¹ 李漫琳¹ 段广新^{1Δ}

(1 放射医学与辐射防护国家重点实验室 江苏省高校放射医学协同创新中心 苏州大学放射医学与防护学院 江苏 苏州 215123; 2 上海交通大学医学院附属第一人民医院消化科 上海 200080)

摘要 目的: 开发具备近红外二区 (Near-Infrared II, NIR-II) 荧光成像性能的多功能化疗栓塞微球, 评估其在肝癌 NIR-II 荧光手术导航中的应用效果。**方法:** 制备 NaGdF₄:Nd@NaGdF₄ 纳米颗粒 (Re NPs) 和聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (Polylactic-co-glycolic Acid, PLGA) 基微球, 利用透射电子显微镜 (Transmission Electron Microscope, TEM) 和荧光光谱仪分析 Re NPs 形貌和荧光性能。PLGA 基微球的形貌、元素组成通过光学显微镜、扫描电子显微镜 (Scanning Electron Microscope, SEM)、X 射线能谱分析 (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) 进行表征。利用紫外光谱仪测定 PLGA 微球的阿霉素 (Doxorubicin, DOX) 装载和 DOX 释放情况。细胞增殖-毒性实验 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 和溶血实验来评估其生物相容性。利用 NIR-II 成像系统分析 PLGA@Re-DOX 微球的成像效果和荧光稳定性。通过肝动脉插管将 PLGA@Re-DOX 微球递送至大鼠肝癌部位, 观察其对 NIR-II 荧光成像效果。**结果:** Re NPs 展现出良好的单分散性和均一球形结构, 平均粒径为 9.3±0.4 nm, 并具备优异的 NIR-II 荧光成像性能。PLGA、PLGA@Re-DOX 微球尺寸分别为 294±7 μm、288±13 μm, 具有高度的均一性。PLGA 微球具有良好的生物相容性, 其对细胞存活率和溶血率与对照组相比没有显著统计差异 ($P>0.05$)。此外, DOX 包封率可达 2.5%, 能缓慢释放药物。PLGA@Re-DOX 微球具有良好的肝内外 NIR-II 荧光成像效果和优异的荧光稳定性, 经肝动脉递送后进行 NIR-II 荧光成像可以清晰地显示肿瘤边缘。**结论:** 制备的 PLGA@Re-DOX 微球可有望实现对肝癌的 NIR-II 荧光成像和荧光手术导航。

关键词: PLGA 微球; NIR-II 荧光成像; 肝癌; 手术导航

中图分类号: R-33; R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2024)18-3415-07

Preparation and Application of Multifunctional PLGA@Re-DOX Chemoembolization Microspheres with NIR-II Fluorescence Imaging for HCC Fluorescence-guided Surgery*

LI Xue-xiao¹, XIE N², WANG Xiao-tong¹, YIN Jia-hui¹, LI Man-lin¹, DUAN Guang-xin^{1Δ}

(1 State Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Collaborative Innovation Center of Radiological Medicine of Jiangsu Higher Education Institutions, School of Radiation Medicine and Protection, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China;

2 Department of Gastroenterology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To prepare multifunctional chemoembolization microspheres featuring Near-Infrared II (NIR-II) fluorescence imaging capabilities, and to evaluate their effectiveness in NIR-II fluorescence-guided surgery for Hepatocellular Carcinoma (HCC). **Methods:** NaGdF₄:Nd@NaGdF₄ nanoparticles (Re NPs) and polylactic-co-glycolic acid (PLGA)-based microspheres were prepared. The morphology and fluorescence properties of Re NPs were analyzed using Transmission Electron Microscopy (TEM) and fluorescence spectrometer. The morphology and elemental composition of PLGA-based microspheres were characterized by Optical Microscopy, Scanning Electron Microscopy (SEM), and Energy Dispersive Spectroscopy (EDS). The loading capacity and release profile of Doxorubicin (DOX) in PLGA microspheres were determined using UV spectrophotometry. Biocompatibility of the PLGA microspheres was evaluated through Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and hemolysis assays. The imaging effectiveness and fluorescence stability of PLGA@Re-DOX microspheres were evaluated using a NIR-II imaging system. PLGA@Re-DOX microspheres were delivered to hepatic artery of rats for in-situ tumor imaging. **Results:** Re NPs were characterized by good monodispersity and uniform spherical structure, with an average particle size of 9.3±0.4 nm, displaying excellent NIR-II fluorescence imaging capabilities. PLGA and PLGA@Re-DOX microspheres were noted for their high uniformity with diameters of 294±7 μm and 288±13 μm, respectively. Good biocompatibility was

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (82172044); 国家自然科学基金青年基金项目 (22006109)

作者简介: 李雪晓, 男, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 肝癌介入治疗, E-mail: lxdd911@163.com

Δ 通讯作者: 段广新, E-mail: gxduan@suda.edu.com

(收稿日期: 2024-02-26 接受日期: 2024-03-23)

observed in the PLGA microspheres, as no significant statistical differences in cell viability and hemolysis rates were found compared to the control group ($P>0.05$). Additionally, a slow drug release was facilitated by a DOX encapsulation rate of up to 2.5%. The PLGA@Re-DOX microspheres demonstrated effective intrahepatic and extrahepatic NIR-II fluorescence imaging capabilities and excellent fluorescence stability, clearly delineating tumor margins post-delivery via hepatic artery. **Conclusion:** The synthesized PLGA@Re-DOX microspheres are promising for application in NIR-II fluorescence imaging and fluorescence-guided surgery of HCC.

Key words: PLGA microspheres; NIR-II fluorescence imaging; Hepatocellular Carcinoma; Surgical navigation

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)18-3415-07

前言

肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)病情隐匿且进展迅速,许多患者在确诊时已处于中晚期^[1]。经肝动脉化疗栓塞(Transarterial chemoembolization, TACE)技术通过导管向肿瘤血管灌注携带化疗药物的栓塞剂(如碘油、微球等),既可以阻断肿瘤的血供,又能在局部释放化疗药物,从而达到协同治疗的效果^[2,3]。与传统化疗相比,TACE能够将化疗药物集中于肿瘤区域,减少对正常组织的影响,是中晚期肝癌患者的首选姑息治疗方式^[4,5]。经TACE治疗后,部分患者的肿瘤会出现缩小,甚至卫星病变消失,为根治性手术创造了条件^[6,7]。研究表明,对TACE治疗有完全响应的患者,在接受TACE降期治疗后进行肝切除手术,能显著提高患者的5年生存率和延长总生存期^[8-10]。然而,目前市场上现有的微球产品在降期治疗成功后,在根治性手术中并不能为临床医生提供有效的手术导航,这可能导致手术中切除过多正常肝组织或未能彻底切除肿瘤组织,进而影响患者的恢复和预后^[11,12]。因此,开发能够在手术中提供精确导航的材料,对提高肝癌手术的成功率和患者的生存质量具有重要意义^[13]。

荧光成像技术在生物医学领域中有着广泛的应用,包括分子监测、药物代谢和分布、图像辅助手术、临床治疗及诊断等^[14,15]。该技术相较于电子计算机断层扫描(Computed tomography, CT)、磁共振(Magnetic Resonance Imaging, MRI)及超声(Ultrasound, US)等成像方法,具有无放射性、更高的安全性、非侵入性、低检测限和高分辨率等优势^[16,17]。而且由于生物组织对近红外光的吸收和散射较少,能够实现更高的穿透效率,使得其成像技术主要集中于近红外窗口^[18,19]。特别是NIR-II荧光成像,在克服组织的强吸收、自发荧光和光子散射方面表现突出,具有深层组织穿透力、高空间分辨率及低背景噪声等优点,被认为是最具发展前景的体内荧光成像技术^[20,21]。稀土下转化纳米探针在NIR-II荧光成像中展现出诸多优势如发射光谱窄、寿命长、化学稳定性和光稳定性好等^[22,23],能够为荧光手术切除导航提供高效、精准的成像技术支持,提高手术治疗的成功率和患者的生存质量^[24-26]。因此,我们计划开发一种包载有DOX和具有NIR-II荧光成像功能的稀土下转化纳米探针的PLGA微球,评估其在肝癌NIR-II荧光手术导航中的应用效果。

1 材料与方法

1.1 材料

氢氧化钠(Sodium Hydroxide,上海阿拉丁生化科技有限公司);无水乙醇(Anhydrous Ethanol,国药集团化学试剂有限公司);油酸(Oleic Acid,上海阿拉丁生化科技有限公司);氯化钆

(III)六水合物(Gadolinium Chloride Hexahydrate,上海阿拉丁生化科技有限公司);氯化钕(III)六水合物(Neodymium Chloride Hexahydrate,上海阿拉丁生化科技有限公司);氟化钠(Sodium Fluoride,上海阿拉丁生化科技有限公司);环己烷(Cyclohexane,阿拉丁生化科技有限公司);十八烯(Octadecene,上海阿拉丁生化科技有限公司);聚乳酸-羟基乙酸共聚物(Poly-lactic-co-glycolic Acid, PLGA,济南岱罡生物科技有限公司);二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO,上海阿拉丁生化科技有限公司);阿霉素(Doxorubicin, DOX,上海阿拉丁生化科技有限公司);碳酸二甲酯(Dimethyl Carbonate,上海阿拉丁生化科技有限公司);聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol, PVA,上海阿拉丁生化科技有限公司);DMEM细胞培养液(Hyclone公司),青霉素-链霉素(美国HyClone公司);胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco公司);磷酸缓冲盐溶液(Phosphate Buffered Saline, PBS,上海培源生物科技股份有限公司);胰酶(Gibco公司);CCK-8细胞计数试剂盒(碧云天生物试剂有限公司);透射电子显微镜(美国FEI公司);稳态瞬态荧光光谱仪(英国爱丁堡公司);小动物近红外二区成像系统(苏州影睿光学科技有限公司);高分辨场发射扫描电镜(日本日立公司);莱卡倒置荧光显微镜(德国徕卡公司);紫外可见分光光谱仪(美国PerkinElmer公司);多功能酶标仪(美国BioTek公司);恒温振荡器(武汉格莱莫检测设备有限公司)

1.2 NaGdF₄:Nd@NaGdF₄ 纳米颗粒的制备

首先采用液相-固相-溶剂(Liquid-solid-solution, LSS)策略制备NaLnF₄(Ln = Gd, Nd)纳米簇前驱体^[27],即将1.2 g的氢氧化钠、4 mL的水、9 mL的乙醇和20 mL的油酸依次加入至50 mL三颈烧瓶中,搅拌10 min。然后,将0.475 mol/L氯化钆和0.025 mol/L氯化钕混合水溶液1 mL加入4 mL的氟化钠(0.5 mol/L)溶液中,搅拌60 min,得到NaGdF₄:5%Nd。按相同方式得到NaGdF₄,并分散在环己烷(2 mL)中备用。将NaGdF₄:5%Nd溶液加入含有6 mL的油酸和10 mL的十八烯三颈烧瓶中。在70℃条件下用氮气(N₂)冲洗30 min除去环己烷,而后加热至280℃,于280℃下搅拌反应30 min。冷却至室温后,在反应溶液加入2 mL的NaGdF₄(0.5 mmol)纳米团簇溶液、6 mL油酸和10 mL的十八烯,搅拌60 min。而后加入等量无水乙醇沉淀出产物,并用无水乙醇洗涤2次,最后将得到的NaGdF₄:Nd@NaGdF₄纳米颗粒(Re NPs),分散在6 mL环己烷中备用。

1.3 PLGA 基微球的制备

通过微流控技术制备微球即将PLGA(100 mg)单独或和Re NPs(含Gd质量为10 mg)、DOX(5 mg)一起溶解于10 mL碳酸二甲酯溶液中作为内相;将1 g聚乙烯醇溶于9 mL

水中作为外相;两相通过注射泵按一定的流速注射至微流控芯片通道内(外相:1500 $\mu\text{L}/\text{mL}$;内相:400 $\mu\text{L}/\text{mL}$)制备得到 PLGA 基(PLGA、PLGA@Re、PLGA-DOX、PLGA@Re-DOX)微球。收集制备的微球在通风橱放置 6 h 以挥发碳酸二甲酯。然后使用超纯水清洗微球 3 次,使用冷冻干燥机冻干处理,收集微球。

1.4 Re NPs、PLGA 基微球的表征

通过 TEM 电镜观察其形貌,并用 Image J 分析其尺寸分布。经荧光光谱仪和 NIR-II 成像系统分析 Re NPs 的荧光光谱和成像情况。通过光学显微镜、SEM 电镜观察 PLGA 基微球的形貌,并通过 Image J 分析微球的粒径分布。通过 X 射线能谱(Energy Dispersive Spectroscopy, EDS)分析微球各元素的组成。

1.5 PLGA 微球药物的装载与控释

药物装载:在 PLGA:DOX 投料质量比分别为 100:3、100:5、100:10 的条件下制备 PLGA@Re-DOX 微球,方法同上述。称取 5 mg 冻干后的 PLGA@Re-DOX 微球将其溶解于 2 mL 二甲基亚砜(DMSO)中,使用紫外分光光度计测 382 nm 处的吸光度,通过以下公式计算药物装载率与包封率。装载率 = 装载药物质量 / 投入药物总质量 $\times 100\%$;包封率 = 装载药物质量 / 微球总质量 $\times 100\%$ 。药物释放:分别取 20 mg PLGA@Re-DOX 微球置于 2 mL PBS 缓冲液中(pH=6.5、7.4),并置于恒温水浴振荡箱(37 $^{\circ}\text{C}$;150 rpm),每隔一段时间取 1 mL 上清,测 382 nm 处紫外吸光度,并补充 1 mL 新鲜 PBS。药物释放率 = 药物释放的质量 / 微球装载药物的总质量 $\times 100\%$ 。

1.6 PLGA 微球生物相容性

为了验证 PLGA 微球的生物相容性,进行了细胞增殖 - 毒性实验(Cell Counting Kit-8, CCK-8)、溶血实验。

CCK8 细胞增殖实验:将兔肝鳞癌肿瘤细胞(VX2),人脐静脉内皮细胞(HUVEC)接种于 96 孔板中,每孔 5000 个细胞。细胞培养于在含 10%胎牛血清和 1%双抗(链霉素、青霉素)的 DMEM 培养基中,条件为 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 。待细胞贴壁后,移除原培养基,并分别加入 100 μL 含有不同浓度 PLGA 微球(0、1.6、3.1、6.2、12.5、25、50 mg/mL)的 DMEM 培养基。孵育 24 h 后,去除培养基并使用 PBS 清洗两次,随后加入含 10% CCK-8 的培养基溶液 100 μL 。将孔板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下继续孵育 30 min,之后使用酶标仪在 450 nm 波长下测定每孔的吸光度(Optical Density, OD),计算细胞存活率。细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 本底 OD 值) / (对照组 OD 值 - 本底 OD 值) $\times 100\%$ 。

溶血实验:取 1 mL 新鲜兔血,加入 10 mL PBS 溶液,充分摇匀。使用 1000 \times g 离心 15 min,分离红细胞和血浆并收集沉淀的红细胞。随后,将红细胞重新悬浮在 PBS 溶液中,制备成 4%的红细胞悬浮液,备用后续实验。在 2 mL 的离心管中分别配置含有不同浓度的 PLGA 微球(1.6、3.1、6.2、12.5、25、50 mg/mL 以及阴性对照组 PBS 和阳性对照组水)的实验组。每组均加入 4%的红细胞悬浮液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 1 小时。孵育后,分离未溶解的红细胞和溶血产生的上清液。从每个样品中吸取 100 μL 的上清液转移到新的 96 孔板中。使用酶标仪在 540 nm 波长下测量各样品上清液的 OD 值,以评估红细胞的溶血程度。溶血率 = (样本测试组 OD 值 - 阴性对照组 OD 值) / (阳性对照组 OD 值 - 阴性对照组 OD 值) $\times 100\%$

1.7 PLGA@Re-DOX 微球 NIR-II 荧光成像效果及荧光稳定性

为了验证 PLGA@Re-DOX 微球的 NIR-II 荧光成像能力,首先将 PLGA 基微球放置在生理盐水中,通过 NIR-II 成像系统观察其成像能力。而后为了探究 PLGA@Re-DOX 微球光稳定性,将 PLGA@Re-DOX 微球分别放置在 PBS 和 FBS 溶液中,每隔一天对 PLGA@Re-DOX 微球进行 NIR-II 荧光成像,最后通过测量平均荧光像素强度来分析光稳定性。而后为了进一步探索 PLGA@Re-DOX 微球在体内生物成像方面的潜力,将 2 mg PLGA@Re-DOX 微球直接注射至大鼠肝叶内进行 NIR-II 荧光成像,验证其在生物组织内的成像能力。

1.8 大鼠原位 N1S1 肝癌模型的构建

使用 SD 大鼠(年龄 8 周,雄性,购自维通利华实验动物有限公司)建立大鼠原位 N1S1 肝癌模型,用于 PLGA@Re-DOX 微球 NIR-II 荧光成像。首先使用水合氯醛麻醉大鼠,大鼠腹部剃毛处理然后沿腹中线切开腹部,充分暴露肝左叶,而后注射 50 μL N1S1 细胞(1×10^7 个),最后缝合腹腔,碘酒消毒^[28]。待 2 周成瘤后进行后续 PLGA@Re-DOX 微球 NIR-II 荧光成像实验。

1.9 PLGA@Re-DOX 微球在原位肝癌模型中的 NIR-II 荧光成像效果

通过经肝动脉插管给药的方式将 PLGA@Re-DOX 微球注射至原位肝癌大鼠。肝动脉插管给药即按照上述方式打开腹部,然后显露肝固有动脉、胃十二指肠动脉和肝总动脉,并且暂时结扎胃十二指肠动脉远端和肝总动脉,并将导管从胃十二指肠动脉远端结扎的上游置入肝固有动脉,微球通过导管递送后恢复肝动脉血流,最后通过近红外二区成像仪进行成像分析。

1.10 统计学分析

结果统计使用 GraphPad Prism 10.0 软件分析。通过 t 检验比较两组间的均数差异。在所有统计分析中,* 表示显著性水平为 $P < 0.05$,结果以均值 \pm 标准误形式呈现。

2 结果

2.1 Re NPs、PLGA 基微球的表征

TEM 电镜结果显示 Re NPs 单分散性良好,粒径均一呈球形,平均粒径为 9.3 ± 0.4 nm(图 1 A,B)。Re NPs 在 1050 nm 处有一个较大的吸收峰且具有优异的 NIR-II 荧光成像性能(图 1 C)。

通过光学显微镜和 SEM 观察微球的形貌与尺寸,结果显示微球呈均匀规则的球形,表面光滑(图 2 A,B)。PLGA、PLGA@Re-DOX 微球尺寸分别为 294 ± 7 μm 、 288 ± 13 μm (图 2 C),具有高度的均一性。EDS 光谱结果显示,相较于 PLGA 微球,PLGA@Re-DOX 微球新出现了 Gd 元素的特性吸收峰,这表明成功包载了 Re NPs(图 2 D)。

2.2 PLGA 微球药物的装载与控释

在一定的投料质量比范围内,当质量比上升,药物的包封率上升,当 100:10 时药物包封率可达到 2.5%(图 3 A),这一结果表明 PLGA@Re-DOX 微球具有优异的药物包封能力。药物释放实验表明,在 pH=6.5 和 pH=7.4 的 PBS 缓冲液中 PLGA@Re-DOX 微球中 DOX 可实现缓慢释放(图 3 B)。这可实现肿瘤部位维持治疗所需的药物浓度,从而增强治疗效果,有望实现对中晚期肝癌的降期治疗。

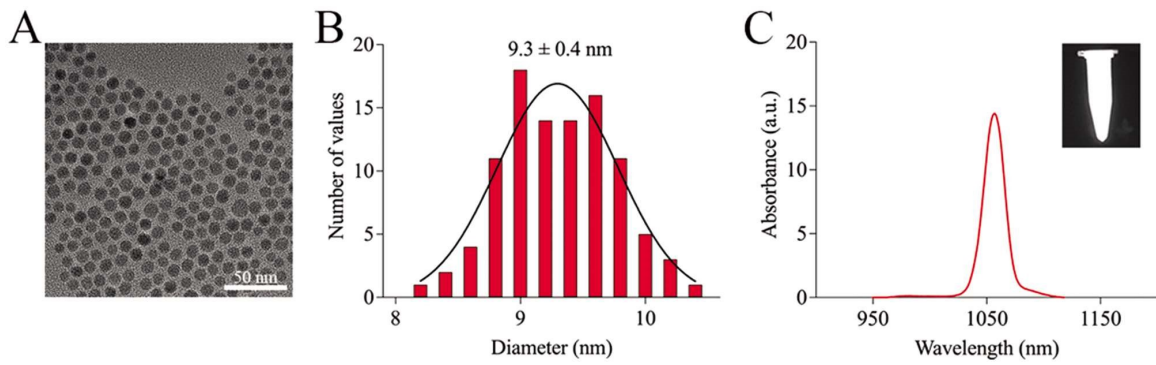


图 1 Re NPs 表征

注:A. Re NPs TEM 图像;B. Re NPs 粒径分布直方图;C. Re NPs 荧光光谱及 NIR-II 荧光成像图。

Fig.1 Characterization of Re NPs

Note: A. TEM image of Re NPs; B. Histogram of particle size distribution of Re NPs; C. Fluorescence spectrum and NIR-II fluorescence imaging of Re NPs.

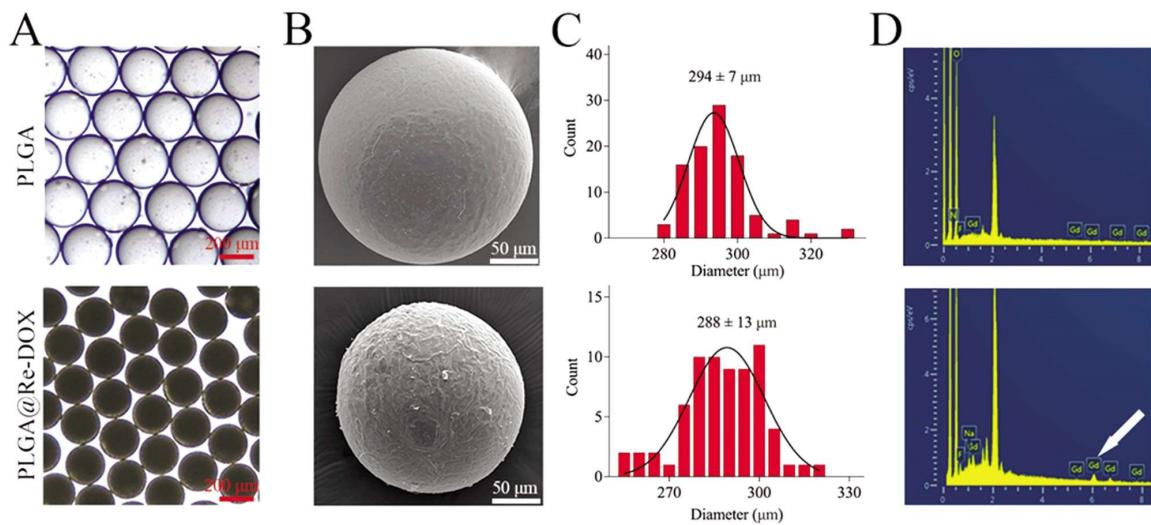


图 2 PLGA 基微球的表征

注:A. PLGA 基微球光学显微镜图像;B. PLGA 基微球 SEM 图像;C. PLGA 基微球粒径分布直方图;D. PLGA 基微球 EDS 光谱图。

Fig.2 Characterization of PLGA-based microspheres

Note: A. Optical microscope image of PLGA-based microspheres; B. SEM image of PLGA-based microspheres; C. Histogram of particle size distribution of PLGA-based microspheres; D. EDS spectrum of PLGA-based microspheres.

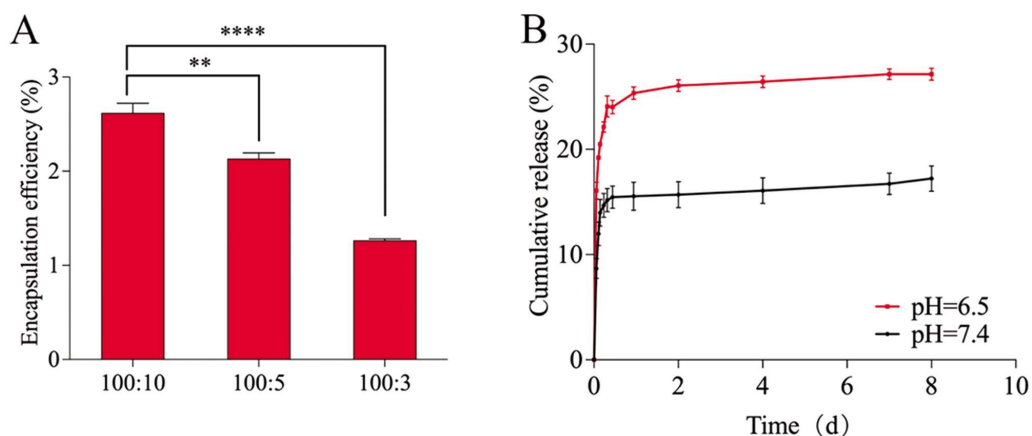


图 3 DOX 装载与释放情况

注:A.不同质量比下药物包封率;B. PLGA@Re-DOX 微球在 pH=6.5 和 7.4 PBS 中的药物释放曲线。

Fig.3 DOX loading and release profile

Note: A. Drug encapsulation efficiency at different mass ratios; B. Drug release profiles of PLGA@Re-DOX microspheres in PBS at pH 6.5 and 7.4.

2.3 PLGA 微球生物相容性

为了评估 PLGA 微球的细胞毒性, 将 PLGA 微球与 VX2

和 HUVEC 细胞共孵育。CCK-8 实验结果显示, 在共孵育 24 h 后细胞的存活率没有明显的下降(图 4 A), 甚至在浓度高达 50

mg/mL 时,细胞存活率依然高于 94%,与对照组相比没有显著统计差异($P>0.05$)。如图 4 B 溶血实验结果显示,即便是高浓度的 PLGA 微球(50 mg/mL)亦不会引起红细胞细胞膜破裂与

血红素的外溢,其溶血值与 PBS 组相比没有显著统计差异($P>0.05$)。这表明 PLGA 微球具有良好生物相容性,为其血管栓塞使用提供安全保障。

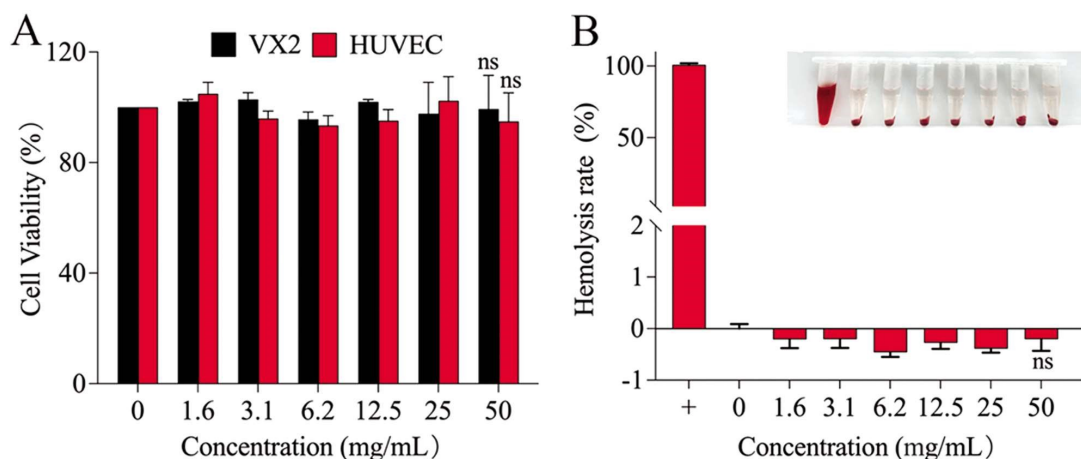


图 4 PLGA 微球的生物相容性

注:A.不同浓度 PLGA 微球对 HUVEC 和 VX2 细胞增殖的影响;B. 不同浓度 PLGA 微球的溶血率。

Fig.4 Biocompatibility of PLGA microspheres

Note: A. Effect of different concentrations of PLGA microspheres on the proliferation of HUVEC and VX2 cells;

B. Hemolysis rates of PLGA microspheres at different concentrations.

2.4 PLGA@Re-DOX 微球 NIR-II 荧光成像效果及荧光稳定性

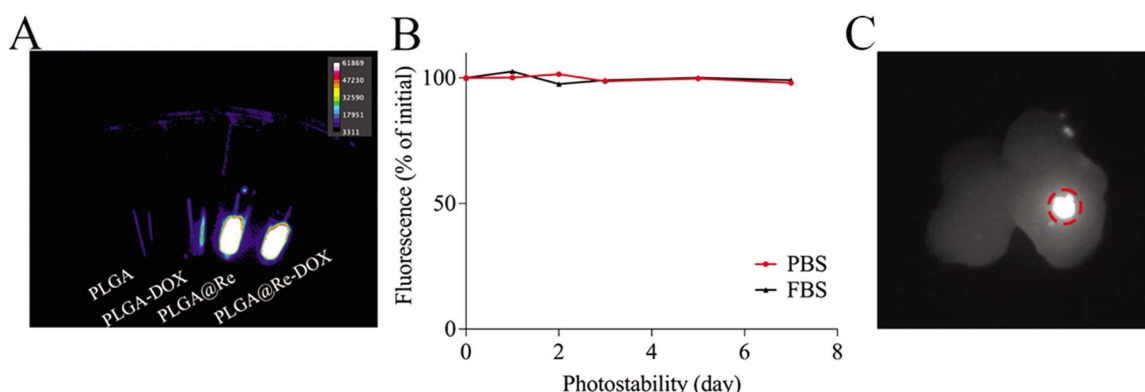


图 5 PLGA@Re-DOX 微球 NIR-II 荧光成像效果及荧光稳定性

注:A. PLGA 基微球的 NIR-II 荧光成像图像;B. PLGA@Re-DOX 微球在 PBS 和 FBS 中的荧光稳定性;

C. PLGA@Re-DOX 微球在肝内 NIR-II 荧光成像图像。

Fig.5 NIR-II fluorescence imaging performance and fluorescence stability of PLGA@Re-DOX microspheres

Note: A. NIR-II fluorescence imaging of PLGA-based microspheres; B. Fluorescence stability of PLGA@Re-DOX microspheres in PBS and FBS;

C. NIR-II fluorescence imaging of PLGA@Re-DOX microspheres in the liver.

近红外二区成像结果显示 PLGA@Re-DOX 微球具有良好的 NIR-II 荧光成像效果(图 5 A),并且在 PBS 和 FBS 溶液中放置一周后其荧光信号几乎没有衰减(图 5 B),这表明其具有良好的光稳定性。并且将 PLGA@Re-DOX 微球直接注射至肝内,其同样表现出优异的成像效果(图 5 C),这为其后续的手术导航奠定基础。

2.5 PLGA@Re-DOX 微球在原位肝癌模型中的 NIR-II 荧光成像效果

构建的原位 N1S1 肝癌大鼠经动脉插管递送 PLGA@Re-DOX 微球(图 6 A)后进行 NIR-II 荧光成像。成像结果显示 PLGA@Re-DOX 微球可清楚的显示肿瘤边缘,即使是小肿瘤(图 6 B)。这有利于完全切除肿瘤组织,成功获得阴性切

缘,提高手术精度。

3 讨论

通过以上结果表明,本研究成功制备了 NaGdF₄:Nd@NaGdF₄ 纳米颗粒(Re NPs),通过透射电子显微镜(TEM)、稳态瞬态荧光光谱仪、NIR-II 成像系统对其进行表征,结果显示 Re NPs 单分散性良好、粒径均一,且具有良好的 NIR-II 荧光成像性能。通过微流控系统成功制备了 PLGA 基微球,并采用光学显微镜、扫描电子显微镜(SEM)、X 射线能谱(EDS)对其进行表征,结果显示 PLGA 基微球呈球形,表面光滑且粒径均一。EDS 光谱结果证明 PLGA@Re-DOX 微球成功包载了 Re NPs。通过紫外光谱仪分析 PLGA 微球装载 DOX 能力和

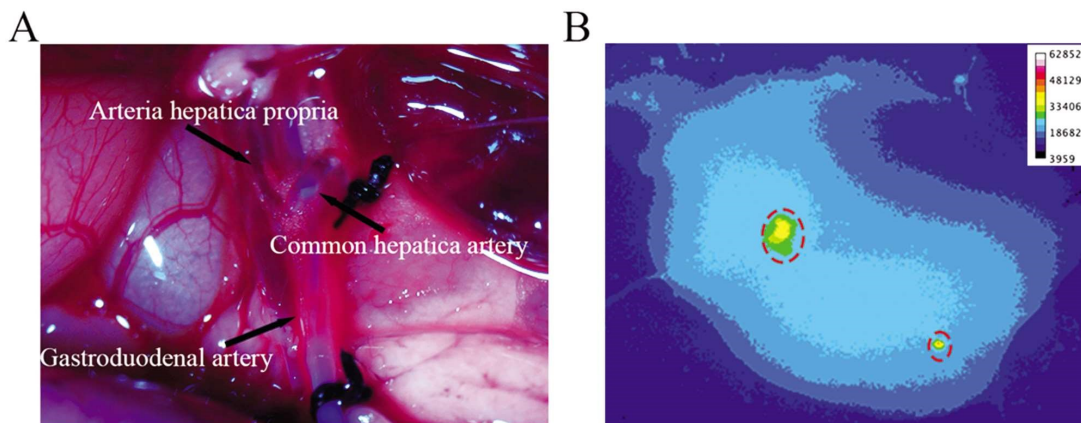


图 6 PLGA@Re-DOX 微球体内 NIR-II 荧光成像效果

注:A.大鼠肝动脉插管解剖图;B. PLGA@Re-DOX 微球在肿瘤部位的 NIR-II 荧光成像效果。

Fig. 6 In vivo NIR-II fluorescence imaging performance of PLGA@Re-DOX microspheres

Note: A. Anatomical diagram of rat hepatic artery catheterization; B. NIR-II fluorescence imaging of PLGA@Re-DOX microspheres at the tumor site.

DOX 释放情况,结果表明在 PLGA 与 DOX 投料质量比为 100:10 下封装率可达 2.5%。同时 DOX 在不同 pH 的 PBS 中可以实现缓慢释放,从而维持肿瘤部位药物高浓度。为了验证 PLGA 微球的生物相容性,进行了 CCK-8 和溶血实验,结果表明 PLGA 微球具有良好的生物相容性,这为其体内生物应用提供了安全性保障。通过 NIR-II 成像系统分析 PLGA @Re-DOX 微球在肝内外的成像效果以及荧光稳定性,结果表明 PLGA@Re-DOX 微球在肝内外都具有良好的成像效果且荧光稳定性优异。在体内动物实验中,采用原位 N1S1 肝癌大鼠模型,通过经肝动脉插管递送 PLGA@Re-DOX 微球以评估其对肿瘤的 NIR-II 荧光成像效果,结果显示 PLGA@Re-DOX 微球可清晰的显示肿瘤边缘。同时,NIR-II 荧光成像组织穿透能力强、背景噪声低以及空间分辨率高,这为其后续的荧光手术切除奠定了坚实的基础。

综上所述,本研究成功合成了 Re NPs,并且通过微流控系统成功制备了包载 Re NPs 和 DOX 的多功能 PLGA 微球(PLGA@Re-DOX 微球),使其集栓塞、化疗、NIR-II 荧光成像功能于一体。值得注意的是,PLGA@Re-DOX 微球可以实现药物的缓慢释放以及对肿瘤部位的精准 NIR-II 荧光成像,这为后续的中晚期肝癌的降期治疗和荧光手术切除导航奠定了实验基础。随着医疗技术和设备的发展,中晚期肝癌的治疗方式也呈多样化^[29]。TACE 治疗后部分患者肿瘤缩小,实现肝癌降期治疗。这使得根治性手术切除成为可能。然而,现有微球在手术导航上的不足可能影响手术效果和患者预后。因此,集栓塞、化疗、NIR-II 荧光成像于一体的多功能肝癌 TACE 微球的设计为中晚期 HCC 的治疗提供了新思路、新方法。目前本研究已成功验证了 PLGA@Re-DOX 微球的药物缓释和对肿瘤部位的 NIR-II 荧光成像能力,后续其在体内疗效需进一步验证。另外微球常需与 X 线造影剂(碘海醇等)结合使用来评估微球在血管中的分布和栓塞位置。然而,造影剂随血流迅速消散,导致手术后无法确定栓塞体的精确位置,妨碍了治疗结果的评估^[30]。因此自身具有 X 线成像功能的栓塞微球值得进一步研究。

参考文献(References)

[1] Rumgay H, Arnold M, Ferlay J, et al. Global burden of primary liver

cancer in 2020 and predictions to 2040 [J]. *J Hepatol*, 2022, 77(6): 1598-1606.

[2] Amoyav B, Bloom A I, Goldstein Y, et al. Drug-Eluting Porous Embolic Microspheres for Trans-Arterial Delivery of Dual Synergistic Anticancer Therapy for the Treatment of Liver Cancer [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(30): e2301548.

[3] 彭冉, 李慕梓, 刘宇洲, 等. 微球联合碘化油 TACE 治疗肝细胞癌的疗效和安全性[J]. *介入放射学杂志*, 2023, 32(3): 265-271.

[4] Gallage S, Garcia-Beccaria M, Szydlowska M, et al. The therapeutic landscape of hepatocellular carcinoma[J]. *Med*, 2021, 2(5): 505-552.

[5] Hatanaka T, Yata Y, Naganuma A, et al. Treatment Strategy for Intermediate-Stage Hepatocellular Carcinoma: Transarterial Chemoembolization, Systemic Therapy, and Conversion Therapy[J]. *Cancers* 2023, 15(6): 1798.

[6] Shiraishi J, Itoh S, Tomino T, et al. Curative surgery for multiple hepatocellular carcinomas after lenvatinib plus transarterial chemoembolization: a case report[J]. *J Surg Case Rep*, 2023, 2023(8): rjad485.

[7] Yamamura K, Beppu T. Conversion surgery for hepatocellular carcinoma after multidisciplinary treatment including lenvatinib [J]. *Hepatol Res*, 2021, 51(10): 1029-1030.

[8] Zhu X D, Huang C, Shen Y H, et al. Hepatectomy After Conversion Therapy Using Tyrosine Kinase Inhibitors Plus Anti-PD-1 Antibody Therapy for Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma [J]. *Ann Surg Oncol* 2023, 30(5): 2782-2790.

[9] Wu J Y, Zhang Z B, Zhou J Y, et al. Outcomes of Salvage Surgery for Initially Unresectable Hepatocellular Carcinoma Converted by Transcatheter Arterial Chemoembolization Combined with Lenvatinib plus Anti-PD-1 Antibodies: A Multicenter Retrospective Study[J]. *Liver Cancer*, 2023, 12(3): 229-237.

[10] Roldan G A, Blomker J, Aby E S. Hepatocellular Carcinoma from a Hepatologist's Perspective [J]. *Semin Intervent Radiol*, 2023, 40(6): 524-535.

[11] Saghaifan Larjani R, Shabani Ravari N, Goodarzi N, et al. Current status of transarterial chemoembolization (TACE) agents in hepatocellular carcinoma treatment [J]. *J Drug Deliv Sci Tec*, 2022, 77: 103905.

- [12] Welling M M, Duszenko N, van Meerbeek M P, et al. Microspheres as a Carrier System for Therapeutic Embolization Procedures: Achievements and Advances[J]. *J Clin Med*, 2023, 12(3): 918.
- [13] Shi X, Xu D, Cheng H, et al. Recent Advances in Interventional Fluorescence Imaging: Toward the Precise Visualization of Transarterial Mini-Invasive Delivery Systems [J]. *Acc Mater Res*, 2023, 4(3): 251-263.
- [14] Li C, Chen G, Zhang Y, et al. Advanced Fluorescence Imaging Technology in the Near-Infrared-II Window for Biomedical Applications[J]. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(35): 14789-14804.
- [15] Li N, Wang M, Zhou J, et al. Progress of NIR-II fluorescence imaging technology applied to disease diagnosis and treatment [J]. *Eur J Med Chem*, 2024, 267: 116173.
- [16] Upputuri P K, Pramanik M. Photoacoustic imaging in the second near-infrared window: a review[J]. *J Biomed Opt*, 2019, 24(4): 1-20.
- [17] Refaat A, Yap M L, Pietersz G, et al. In vivo fluorescence imaging: success in preclinical imaging paves the way for clinical applications [J]. *J Nanobiotechnol*, 2022, 20(1): 450.
- [18] Xu R, Liu J, Cao H, et al. In Vivo High-Contrast Biomedical Imaging in the Second Near-Infrared Window Using Ultrabright Rare-Earth Nanoparticles[J]. *Nano Lett*, 2023, 23(23): 11203-11210.
- [19] Luo H, Gao S. Recent advances in fluorescence imaging-guided photothermal therapy and photodynamic therapy for cancer: From near-infrared-I to near-infrared-II [J]. *J Control Release*, 2023, 362: 425-445.
- [20] Guo Z, Cui Z. Fluorescent nanotechnology for in vivo imaging[J]. *Wires Nanomed Nanobi*, 2021, 13(5): e1705.
- [21] Wan H, Yue J, Zhu S, et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1171.
- [22] Tong L, Cao J, Wang K, et al. Lanthanide-Doped Nanomaterials for Tumor Diagnosis and Treatment by Second Near-Infrared Fluorescence Imaging[J]. *Adv Optical Mater*, 2023, 12(4): 2301767.
- [23] Du P, Wei Y, Liang Y, et al. Near-Infrared-Responsive Rare Earth Nanoparticles for Optical Imaging and Wireless Phototherapy[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(8): e2305308.
- [24] Yang R Q, Lou K L, Wang P Y, et al. Surgical Navigation for Malignancies Guided by Near-Infrared-II Fluorescence Imaging [J]. *Small Methods*, 2021, 5(3): e2001066.
- [25] Zhang X, He S, Ding B, et al. Synergistic strategy of rare-earth doped nanoparticles for NIR-II biomedical imaging [J]. *J Mater Chem B*, 2021, 9(44): 9116-9122.
- [26] Xu Z, Qian J, Wu H, et al. Novel pH-activatable NIR fluorogenic spray mediated near-instant and precise tumor margins identification in human cancer tissues for surgical resection [J]. *Theranostics*, 2023, 13(13): 4497-4511.
- [27] Duan G, Wei Z, Zhang J, et al. NIR-II fluorescence nanoprobe based on Erbium for fallopian tube diseases diagnosis [J]. *Materials & Design*, 2023, 227: 111726.
- [28] Wu M, Zhang L, Shi K, et al. Polydopamine-Coated Radiolabeled Microspheres for Combinatorial Radioembolization and Photothermal Cancer Therapy [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2023, 15 (10): 12669-12677.
- [29] Yin Z, Chen D, Liang S, et al. Neoadjuvant Therapy for Hepatocellular Carcinoma[J]. *J Hepatocell Carcino*, 2022, 9: 929-946.
- [30] Zhu X, Duan M, Zhang L, et al. Liquid Metal-Enabled Microspheres with High Drug Loading and Multimodal Imaging for Artery Embolization[J]. *Adv Funct Mater*, 2023, 33(18): 2209413.