

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.004

## 可捕获抗原的负载 ICG 的纳米胶束通过靶向淋巴结诱导肿瘤原位疫苗效应

程文静<sup>1,2</sup>, 张澄蔚<sup>1</sup>, 宋银宏<sup>1</sup>, 余祥<sup>1,3</sup> (1. 三峡大学 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443000; 2. 武汉市中医医院 检验科, 湖北 武汉 430000; 3. 海南大学 生物医学工程学院, 海南 三亚 572024)

**[摘要]** **目的:** 制备并表征负载吖啶菁绿(ICG)的纳米胶束(F127-ICG), 利用其光热效应、抗原吸附能力及淋巴结(LN)靶向优势, 探索F127-ICG的抗肿瘤作用。 **方法:** 采用薄膜水化法制备F127-ICG, 通过粒度电位仪测量F127-ICG的粒径及Zeta电位, 通过紫外可见分光光度计及荧光分光光度计检测F127-ICG的吸收光谱及荧光光谱。通过比较F127胶束与肿瘤细胞裂解液孵育前后基本性质及蛋白含量变化, 分析F127-ICG的抗原吸附作用。Calcein-AM/PI双染法检测F127-ICG对乳腺癌细胞4T1的光热杀伤作用。在小鼠皮下注射染料标记的F127胶束构建淋巴引流模型, 使用小动物活体成像检测F127胶束的LN靶向作用, 并使用离体器官成像检测F127胶束在小鼠腹股沟LN及腋窝LN中蓄积和渗透情况。构建小鼠背部双侧乳腺癌肿瘤模型, 小鼠瘤内注射F127-ICG进行光热治疗, 观察对侧肿瘤生长趋势。 **结果:** 成功构建负载 ICG 的 F127 胶束, 粒径为(19.41 ± 0.49)nm, Zeta 电位为-(2.78 ± 0.36)mV。F127-ICG与肿瘤抗原共孵育后粒径、负Zeta电位以及蛋白含量均增大( $P < 0.05$ )。Calcein-AM/PI双染法结果显示, F127-ICG可以发挥光热效应杀伤4T1细胞。活体成像结果显示, F127胶束可靶向LN。动物体内实验中, 与PBS及F127-ICG组相比, F127-ICG + 激光组的对侧肿瘤体积更小( $P < 0.05$ )。 **结论:** F127-ICG通过光热消融原位肿瘤组织, 同时捕获释放的肿瘤抗原并迁移至局部LN, 促进机体抗肿瘤免疫应答, 抑制远处肿瘤生长, 增强原位疫苗效应。

**[关键词]** 肿瘤疫苗; 纳米胶束; 抗原捕获; 淋巴结; 光热治疗

**[中图分类号]** R730.51; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2025) 11-1128-08

## Antigen-capturing ICG-loaded nanomicelles induce *in situ* tumor vaccine effects through targeting lymph nodes

CHENG Wenjing<sup>1,2</sup>, ZHANG Chengwei<sup>1</sup>, SONG Yinhong<sup>1</sup>, YU Xiang<sup>1,3</sup> (1. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443000, Hubei, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, Hubei, China; 3. School of Biomedical Engineering, Hainan University, Sanya 572024, Hainan, China)

**[Abstract]** **Objective:** To prepare and characterize indocyanine green (ICG)-loaded F127 nanomicelles (F127-ICG) and explore their anti-tumor effects through their photothermal effect, antigen-capturing capability, and lymph node (LN)-targeting properties. **Methods:** F127-ICG was prepared using the thin-film hydration method. The particle size and Zeta potential were measured using a Malvern particle size analyzer. The absorption and fluorescence spectra were determined using ultraviolet-visible and fluorescence spectrophotometry, respectively. The antigen-capturing capability of F127-ICG was analyzed by comparing the basic properties and protein content changes of F127 nanomicelles before and after incubation with tumor cell lysates. The photothermal cytotoxicity of F127-ICG against breast cancer cells (4T1) was evaluated using a Calcein-AM/PI double-staining assay. Dye-labeled F127 nanomicelles were subcutaneously injected into mice to establish a lymphatic drainage model. The LN targeting ability of F127 nanomicelles was detected using *in vivo* small animal imaging, and the accumulation and penetration of F127 nanomicelles in the inguinal and axillary lymph nodes of mice were detected by *ex vivo* organ imaging. A bilateral breast cancer model was established on the back of the mouse, and F127-ICG was injected intratumorally for photothermal therapy (PTT). Meanwhile, the growth of the contralateral tumor was monitored. **Results:** The F127-ICG nanomicelles were successfully prepared, with a mean particle size of (19.41 ± 0.49) nm and an average Zeta potential of - (2.78 ± 0.36) mV. After co-incubation of F127-ICG with tumor antigens, the particle size, Zeta potential negativity, and protein content all increased ( $P < 0.05$ ). The results of the Calcein-AM/PI double staining

**[基金项目]** 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室开放基金(No. 2023KZL024)

**[作者简介]** 程文静(1994—), 女, 硕士, 检验医师, 主要从事肿瘤免疫相关研究

**[通信作者]** 余祥; 宋银宏(扫码获取作者通信方式)

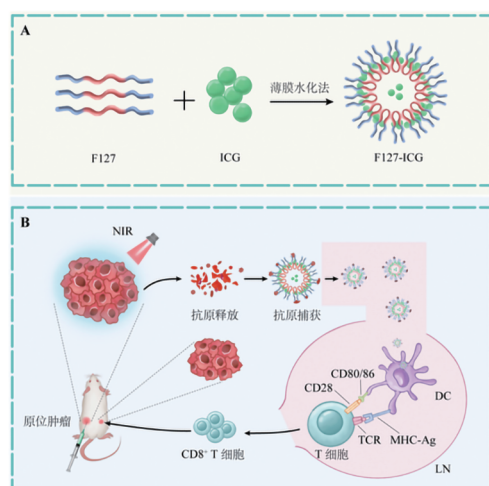


assay revealed that F127-ICG could effectively exert a photothermal effect to mediate the killing of 4T1 cells. *In vivo* imaging results revealed that F127 nanomicelles can effectively target LN. In animal experiments, the contralateral tumor volume in the F127-ICG + Laser group was smaller than that in the PBS and F127-ICG groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** F127-ICG-mediated photothermal effects can effectively ablate primary tumors and capture released tumor-specific antigens and then migrate to local LN, which promotes anti-tumor immune response, inhibits distant tumor growth, and enhances *in situ* vaccine efficacy.

**[Key words]** tumor vaccine; nanomicelle; antigen capture; lymph node; photothermal therapy

[Chin J Cancer Biother, 2025, 32(11): 1128-1135. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2025.11.004]

光热治疗(photothermal therapy, PTT)是一种有吸引力的抗癌策略<sup>[1-2]</sup>,通过消融肿瘤细胞产生物理治疗的效果,同时释放肿瘤抗原,发挥原位肿瘤疫苗效应,诱导机体产生抗原特异性细胞毒性T淋巴细胞应答,这对抑制肿瘤复发及消除远处病灶至关重要<sup>[3]</sup>。然而,光热诱导的抗原无法高效引流至淋巴结(lymph node, LN),不能被免疫系统充分识别和加工,限制了全身抗肿瘤免疫反应的发生。一些研究<sup>[4]</sup>指出,纳米颗粒可吸附抗原,在转运过程中与抗原提呈细胞(antigen-presenting cell, APC)及T淋巴细胞等相互作用,增强机体的抗癌效力。LN作为重要的免疫器官,可协调不同的免疫细胞,防御病原体入侵及调节适应性免疫。LN靶向药物有利于免疫反应的发生,改善LN的炎症并抑制肿瘤转移<sup>[5]</sup>。因此,本课题组设想一种以光热治疗为基础,联合具有抗原吸附及LN靶向的多功能纳米胶束来提高原位肿瘤疫苗效应,抑制远处肿瘤的生长。本研究通过F127聚合物负载光热剂吲哚菁绿(indocyanine green, ICG),制备多功能的F127-ICG纳米胶束(图1A),研究F127-ICG介导的光热效应对远处肿瘤生长的影响,旨在通过LN主动递送肿瘤抗原增强系统性抗肿瘤效应,为进一步抑制肿瘤转移及复发提供治疗新策略(图1B)。



A: F127-ICG合成过程示意图; B: 通过将光热治疗与抗原捕获、LN靶向相结合而引发的抗肿瘤免疫效应示意图。NIR: 近红外光; TCR: T细胞受体; MHC-Ag: 主要组织相容性抗原。

图1 体外纳米胶束合成及体内治疗机制示意图

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及细胞

6~8周龄,体重16~20 g雌性BALB/c健康小鼠来源于三峡大学实验动物中心。小鼠分笼饲养于SPF级动物饲养间。实验动物质量合格证号:42010200009702,实验动物生产许可证号为SCXK(鄂)2022-0012。小鼠饲养环境控制适宜的温度(20~22 °C)、相对湿度(50%~60%)和12 h光照/12 h黑暗循环,保证自由饮食,实验前小鼠需适应性喂养1周。三峡大学实验动物伦理委员会已批准所有动物实验(伦理审批号:2021020F),实验动物设施使用证明许可证号为SYXK(鄂)2022-0061,并严格按照相关规定进行动物实验。

小鼠4T1乳腺癌细胞购自武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司。Pluronic® F-127购自美国Sigma试剂公司,ICG购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。稳定的近红外染料DiR-BOA(代替ICG来避免其在水溶液中的荧光不稳定性),由上海大学曹卫国教授委托合成。胎牛血清(FBS)购自美国Gibco公司,胰蛋白酶购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,无菌PBS及青霉素/链霉素购自美国Hyclone公司,三氯甲烷购自成都市科隆化学品有限公司,RPMI 1640培养基购自美国Corning公司,Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒(Calcein-AM/PI Double Stain Kit)购自北京索莱宝公司。

### 1.2 主要仪器

Nano-ZS90纳米粒度仪购自英国Malvern公司,全波长酶标仪购自美国Tecan公司,F-4600荧光分光光度计购自日本日立公司,101T-10L恒温磁力搅拌器购自上海秋佐科学仪器有限公司,真空干燥器购自美国圣斯特国际集团,氮吹仪购自天津奥特赛恩斯仪器有限公司,808 nm光纤激光器购自长春市亮丽光电有限公司,手持测温热像仪购自杭州微影软件有限公司,小动物活体成像仪IVIS®LuminaXRMS购自美国PerkinElmer公司。

### 1.3 F127胶束制备

取100 mg的F127溶于2 mL的氯仿,混匀后转移至圆底烧瓶中,封口膜封口后,使用氮吹仪吹2 h至

形成一层药膜,真空放置2 h均匀干燥药膜,然后加入2 mL过滤且预热过的去离子水,置于50 °C恒温磁力搅拌器中搅拌30 min,可观察到绿色的澄清溶液,0.22 μm滤膜过滤未反应的原材料得到空载的F127胶束。在合成的初始阶段,加入250 μg ICG或者1 mg DiR-BOA合成负载药物的F127-ICG或者F127(DiR-BOA)。整个实验过程注意避光。

#### 1.4 F127-ICG基本性质表征

取F127-ICG或游离ICG溶液,用超滤离心管(截留分子量为30 000)进行浓缩,再用一次性针式过滤器(0.22 μm微孔滤膜)过滤,借助Nano-ZS90纳米粒度仪,通过动态光散射的方法判定F127-ICG粒径大小和Zeta电位。取2 mL F127-ICG分别使用紫外分光光度计及荧光分光光度计测量吸收光谱(波长范围:400~1 000 nm)及荧光光谱(波长范围:800~900 nm)。

#### 1.5 评估F127-ICG的抗原吸附能力

制备肿瘤抗原裂解液:4T1细胞在含10%灭活胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基中,置于5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中进行常规培养。将对数生长期的4T1细胞铺至6孔板,每孔5 × 10<sup>5</sup>个细胞,24 h后收集细胞,用PBS清洗1次,用2 mL 0.05 mmol/L ICG溶液重悬细胞,转移至EP管中,808 nm激光(1.0 W/cm<sup>2</sup>)照射10 min,照射过后200 × g离心5 min,弃去沉淀,收集上清的肿瘤抗原裂解液备用。使用Lowry蛋白试剂盒进行蛋白定量。F127-ICG抗原吸附能力评估:取400 μL预先合成的F127-ICG溶液(F127含量20 mg),加入1 mL肿瘤抗原裂解液(蛋白含量400 μg),37 °C作用4 h,然后使用100 000 NMWL超滤膜离心(800 × g, 10 min),去除未结合抗原,获得F127-ICG/抗原,测其粒径Zeta电位,Lowry蛋白试剂盒进行蛋白定量,与原始未孵育的F127-ICG进行性质比较。

#### 1.6 热成像仪检测F127-ICG的光热转换性能

F127-ICG溶液配制成0.05、0.025、0.0125 mmol/L 3个浓度,取1.5 mL以上3个浓度的溶液分别置于EP管中,样品用808 nm激光(1 W/cm<sup>2</sup>, 10 min)辐照。取3份1.5 mL浓度为0.05 mmol/L的F127-ICG溶液,分别在激光功率为0.5、1.0、2.0 W/cm<sup>2</sup>的激光下照射10 min。将0.05 mmol/L F127-ICG溶液在1 W/cm<sup>2</sup>的激光功率下照射10 min,待溶液温度逐渐下降到初始温度时,以相同条件再次照射。实验操作重复进行3次。以上3个实验过程中皆使用热成像仪每30 s记录图像和温度变化。

#### 1.7 Calcein-AM/PI双染法检测F127-ICG的体外光热杀伤作用

将处于对数生长期的4T1细胞铺在24孔板上,每孔1 × 10<sup>5</sup>个细胞,培养24 h后设置以下3个组别:PBS组,F127-ICG组,F127-ICG + 激光组,给药后1 h对F127-ICG + 激光组给予激光照射,照射条件:808 nm激光,照射7 min,功率1 W/cm<sup>2</sup>。照射后继续培养24 h,胰酶消化后收集细胞,用缓冲液清洗细胞2~3次,加入100 μL配置好的Calcein-AM/PI染色工作液,37 °C作用15 min后转移至共聚焦皿中,待细胞沉至底部,在共聚焦荧光显微镜下观察。

#### 1.8 荧光成像观察F127-ICG对LN的靶向作用

体质量为16~20 g的正常BALB/c小鼠随机分为3组(每组5只)。用异氟烷麻醉小鼠,对小鼠双侧背部进行脱毛处理,于小鼠的尾根部分别皮下注射50 μL游离DiR-BOA、F127(DiR-BOA),DiR-BOA含量为10 nmol。使用小动物活体成像系统在不同时间点进行荧光成像,动态监测F127(DiR-BOA)在LN中蓄积和渗透情况。然后取同侧及对侧的腹股沟LN及腋窝LN进行离体器官成像。

#### 1.9 动物实验检测F127-ICG体内抗肿瘤效应

构建双侧肿瘤模型。小鼠的双侧背部进行脱毛,分别在光热治疗前10 d及前7 d在小鼠右侧(原位肿瘤)及左侧(对侧肿瘤)背部皮下接种预先准备好的4T1细胞,注射体积为100 μL,细胞数量分别为2 × 10<sup>5</sup>个及5 × 10<sup>4</sup>个。接种后的小鼠观察成瘤情况,荷瘤10 d后将小鼠随机分为3组:(1)PBS组,每只小鼠瘤内注射50 μL的PBS;(2)F127-ICG组,每只小鼠瘤内注射50 μL F127-ICG(ICG浓度为0.05 mmol/L);(3)F127-ICG + 激光组,小鼠瘤内注射等剂量F127-ICG,1 h后,给予808 nm激光照射7 min,功率为1 W/cm<sup>2</sup>,照射过程中使用红外热成像仪进行温度监测,记录间隔为30 s。给予治疗后开始记录小鼠体质量及对侧肿瘤体积,体积计算公式为:体积(mm<sup>3</sup>) = 0.5 × 长径 × 短径<sup>2</sup>。

#### 1.10 统计学处理

以上主要实验均独立重复3次。采用GraphPad Prism 9软件对实验数据进行统计分析。分别通过Shapiro-Wilk检验及Brown-Forsythe检验来评估数据的正态分布及方差齐性。符合正态分布的计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据之间的比较采用 $t$ 检验,多组数据之间的比较采用One Way ANOVA法,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

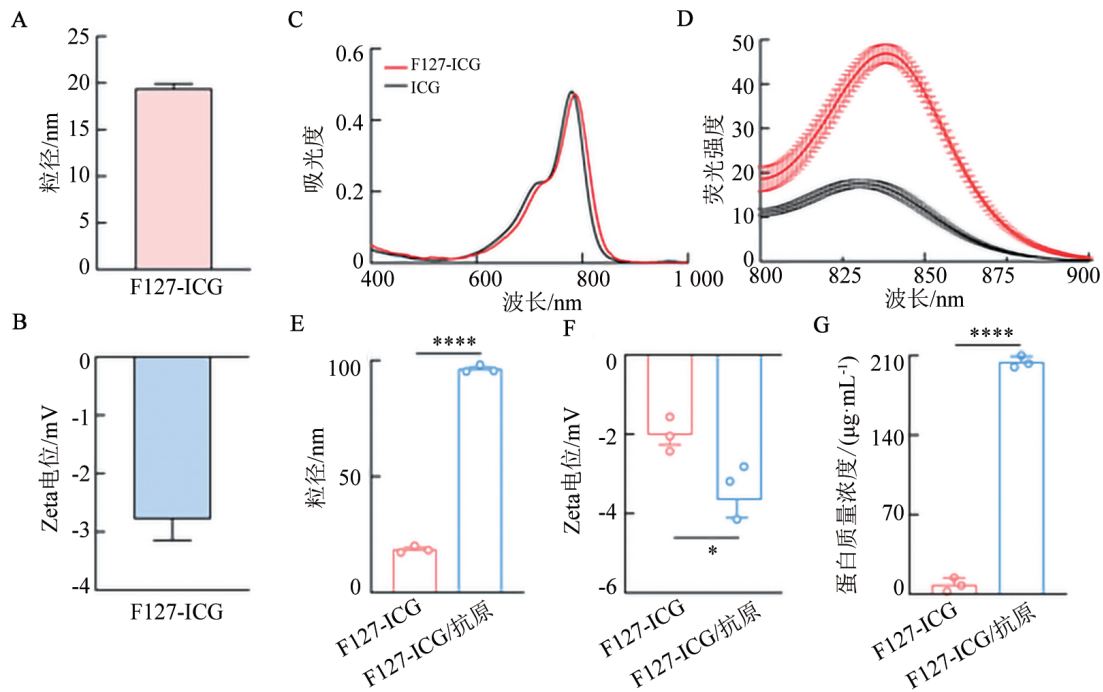
### 2.1 F127-ICG的性质表征及抗原捕获

本研究通过薄膜水化法合成F127-ICG,将两性性的ICG定位在F127胶束的亲疏水交界面(图1A),



进一步通过纳米粒度电位仪测得 F127-ICG 的粒径为  $(19.41 \pm 0.49) \text{ nm}$ , Zeta 电位为  $-(2.78 \pm 0.36) \text{ mV}$  (图 2A、B)。其吸收光谱显示, 游离 ICG 在 780 nm 具有典型的强吸光度 (图 2C)。与游离 ICG 相比, F127-ICG 的吸收光谱发生了从 780 nm 到 786 nm 的轻微红移。值得注意的是, 在 ICG 与 F127-ICG 两样本溶液吸收峰值相同的情况下, F127-ICG 的荧光信号显著

强于游离 ICG, 增加了  $(165.5 \pm 1.48)\%$  (图 2D)。F127-ICG 与经激光照射过的 4T1 乳腺癌细胞裂解产物一起培养, 共培养后 F127-ICG 的粒径及负 Zeta 电位皆增大 ( $P < 0.000 1$ ,  $P < 0.05$ ) (图 2E、F), 表明 F127 胶束成功吸附了肿瘤抗原, 蛋白定量结果显示培养后 F127-ICG 的蛋白含量显著增加 ( $P < 0.000 1$ , 图 2G), 进一步验证了 F127 胶束具有抗原捕获能力。



A~D: 游离 ICG 及 F127-ICG 的粒径(A)、Zeta 电位(B)、吸收光谱(C)、荧光光谱(D); E~G: F127-ICG 与肿瘤细胞裂解液孵育前后的粒径(E)、Zeta 电位(F)、蛋白含量(G)比较。\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.000 1$ 。

图2 F127-ICG 的性质表征及抗原捕获

## 2.2 F127-ICG 具有光热转换能力并发挥体外光热杀伤作用

F127-ICG 光热转换性能检测结果显示 (图 3A), 在 808 nm 的激光照射下 ( $1 \text{ W/cm}^2$ ), F127-ICG 溶液的峰值温度随着 ICG 浓度的升高而升高。与低浓度相比, 当 ICG 浓度为  $0.05 \text{ mmol/L}$  时, 温度上升更快, 最高温度可达  $60.7 \text{ }^\circ\text{C}$ , 而不含 ICG 的溶液 (PBS 组) 温度基本不变, 没有上升趋势。另外, 在 ICG 浓度不变的情况下, 温度的升高与激光功率也呈正相关 (图 3B)。在被功率为  $2 \text{ W/cm}^2$  的激光照射时, F127-ICG 溶液可产生  $86.7 \text{ }^\circ\text{C}$  的高温。热图像结果 (图 3C) 显示, 随着激光功率与照射时间的增加, F127-ICG 温度逐渐升高。游离 ICG 与 F127-ICG 的光热转换性能对比结果 (图 3D) 显示, 游离 ICG 与 F127-ICG 的首个温度峰值相差不大, 提示 F127 胶束的负载不影响 ICG 的近红外吸收能力, 不会降低 ICG 的光热转换率, 经过 3 个光热循环之后, ICG 溶液的温度下降了  $(10.57 \pm 0.80) \text{ }^\circ\text{C}$ , 而 F127-ICG 溶液温度仅下降

$(2.36 \pm 1.48) \text{ }^\circ\text{C}$ , 说明 F127 胶束可以提高 ICG 的光热稳定性。

Calcein-AM/PI 双染法检测 F127-ICG 体外光热杀伤作用的结果显示 (图 3E), PBS 组及 F127-ICG 组中可观察到明显的 Calcein-AM 绿色荧光信号 (活细胞), 仅有少量的红色荧光信号, 而 F127-ICG + 激光组主要呈现 PI 红色荧光信号 (死细胞), 表明对 4T1 肿瘤细胞产生了有效的杀伤作用。

## 2.3 F127 胶束具有 LN 靶向能力

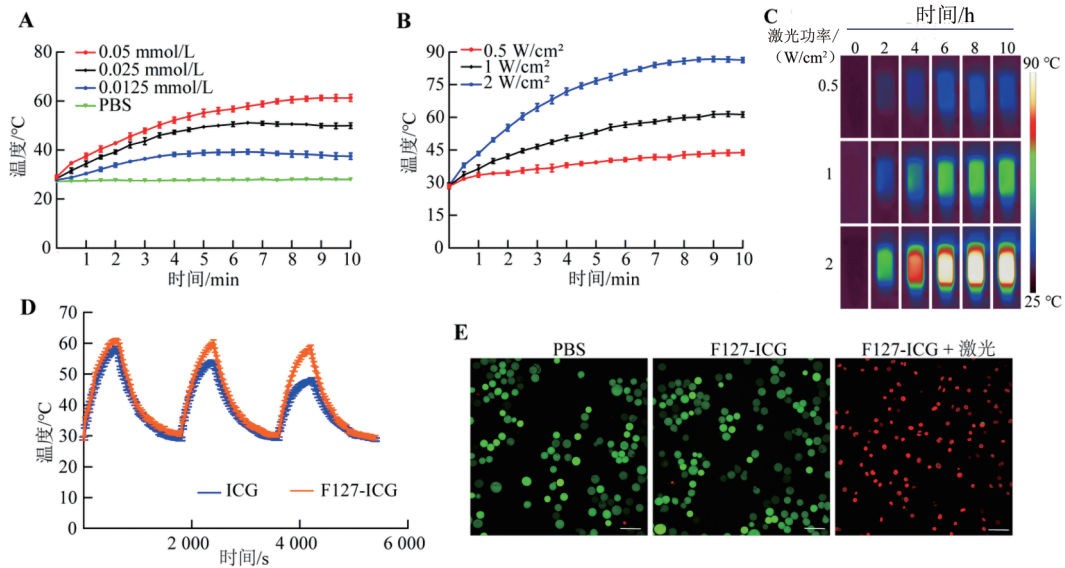
小动物活体成像系统动态监测 DiR-BOA 在体内的分布, 结果显示 (图 4A), 在游离 DiR-BOA 组中, 腹股沟 LN 在 6 h 内没有观察到明显的荧光信号; 在 F127 (DiR-BOA) 胶束组中, 腹股沟 LN 在 3 h 时出现明显荧光信号, 6 h 后荧光信号增强。离体成像及荧光定量结果显示 (图 4B、C), 游离组中 LN 内 DiR-BOA 的蓄积极少, 肉眼未见荧光, 而 F127 (DiR-BOA) 在同侧腹股沟 LN 蓄积明显, 并且在下游 LN (腋窝 LN) 中有强荧光信号。以上结果表明, F127 胶

束可经淋巴系统引流至LN。

### 2.4 F127-ICG可通过光热杀伤作用介导小鼠体内原位肿瘤疫苗效应

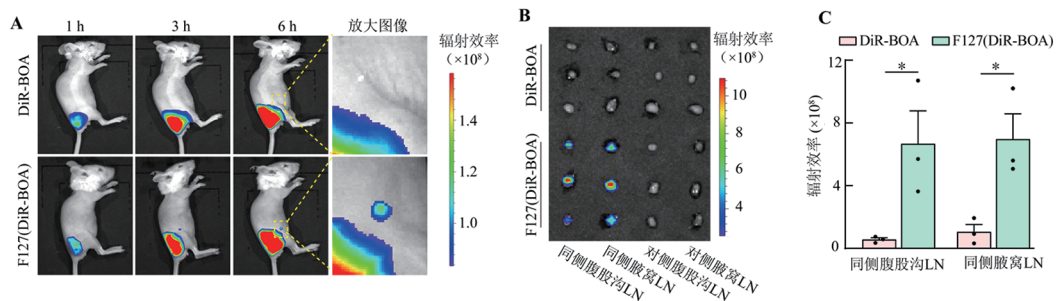
本研究成功构建4T1乳腺癌双侧肿瘤模型(图5A)。将荷瘤小鼠随机分为3组:PBS组、F127-ICG组、F127-ICG+激光组,在808 nm激光照射的过程中,使用红外热像仪动态观察温度变化。结果显示

(图5B、C),局部肿瘤温度可升高至55.6 °C。对侧肿瘤生长曲线显示(图5D),与其他两组相比,F127-ICG+激光组中的对侧肿瘤体积更小( $P < 0.05$ )。对照组与F127-ICG组的对侧肿瘤生长速度无差异。此外,所有治疗组的小鼠体质量都没有明显的减轻(图5E)。以上结果验证了F127-ICG介导的光热治疗能抑制远处肿瘤的生长。



A:不同浓度F127-ICG在1 W/cm<sup>2</sup>功率激光照射下的温度变化曲线图;B、C:不同功率808 nm激光照射下F127-ICG的温度变化曲线图(B)和对应的热红外图像(C);D:1 W/cm<sup>2</sup> 808 nm激光循环光照3次ICG及F127-ICG溶液的温度变化曲线;E:Calcein-AM/PI荧光双染法检测F127-ICG介导的PTT对4T1细胞的杀伤作用(标尺为50 μm)。

图3 F127-ICG的光热转换性能及光热杀伤作用



A:DiR-BOA及F127(DiR-BOA)在小鼠体内荧光成像动态监测;B:离体LN的体外荧光成像;C:同侧腋窝LN和腋窝LN辐射效率的定量分析。\* $P < 0.05$ 。

图4 F127(DiR-BOA)的LN靶向能力

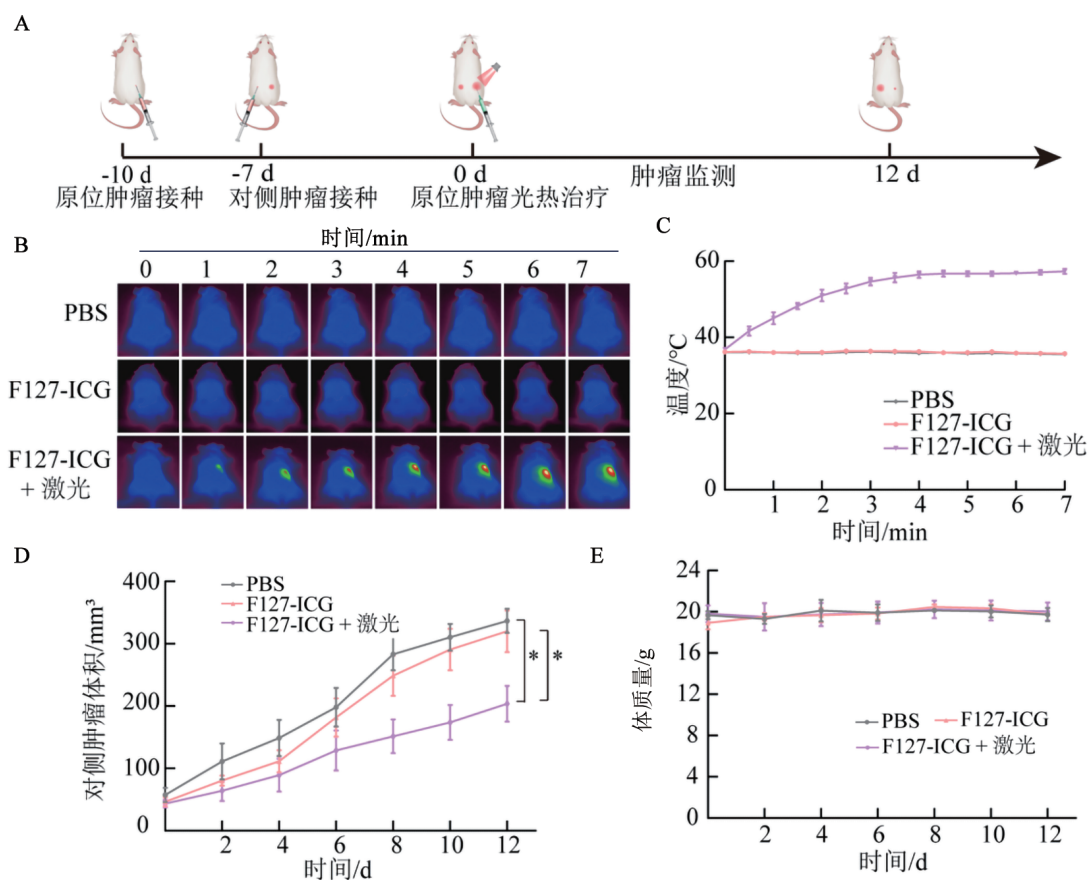
### 3 讨论

近年来肿瘤免疫治疗取得重大进展,改变了实体瘤的治疗前景<sup>[6]</sup>,包括免疫检查点抑制剂疗法、过继性细胞疗法、免疫刺激疗法等,然而肿瘤抗原的丢失往往会导致部分临床治疗失败<sup>[7]</sup>。原位肿瘤疫苗是指通过各种方法诱导肿瘤死亡并释放肿瘤抗原,发挥疫苗效应且产生持久特异性免疫反应的一种疗

法。区别于传统的肿瘤疫苗将多肽、表达肿瘤抗原的基因、肿瘤相关蛋白等由体外导入体内方式,原位肿瘤疫苗具有制备简捷、安全性高、动态突破免疫耐受等优势<sup>[8]</sup>。然而复杂的肿瘤微环境使得免疫反应的激活效率极低,限制了肿瘤原位疫苗的治疗效果<sup>[9]</sup>。一方面,肿瘤微环境处于免疫抑制状态,且缺乏APC及T细胞<sup>[10-11]</sup>。另一方面,仅有的APC在实现了对肿瘤抗原的呈递之后,归巢至LN的过程受到多

方面因素的影响,例如淋巴系统的结构、致密的肿瘤基质形成的物理屏障、趋化因子的影响等,使得免疫反应的启动受到阻碍<sup>[12]</sup>。有文献<sup>[13]</sup>报道,以体外成熟 DC 为主要成分的治疗性疫苗因低 LN 转移反应而影

响肿瘤治疗功效。本研究合成了负载 ICG 的 F127 纳米胶束,通过 ICG 的光热效应消融原位肿瘤组织,同时捕获释放的肿瘤全抗原并迁移至局部 LN,从而增强原位肿瘤疫苗效应。



A: F127-ICG 介导的体内光热治疗肿瘤实验流程图; B: 不同治疗组下 4T1 荷瘤小鼠的红外热图像; C: 808 nm 激光照射下各组的光热温度-时间变化曲线; D、E: 给予不同治疗后各组对侧肿瘤生长曲线(D)及小鼠体质量变化(E)。\* $P < 0.05$ 。

图5 F127-ICG 介导的原位肿瘤疫苗效应

LN 作为重要的免疫器官,是多种免疫激活过程的核心枢纽。具体来说, LN 内迁移性 DC 及驻留 DC 吞噬和呈递肿瘤特异性抗原或肿瘤相关抗原,激活淋巴细胞并触发适应性免疫反应,增强抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞应答<sup>[14]</sup>。值得注意的是,迁移性 DC 直接激活 T 细胞的重要性受到了质疑,研究<sup>[15]</sup>表明, LN 驻留而不是迁移性 DC 在促使 CD8<sup>+</sup> T 细胞活化中起主导作用。促进肿瘤抗原向 LN 的募集,将肿瘤抗原从免疫抑制的环境迁移到免疫功能强大的区域,能最大化实现肿瘤抗原的疫苗效应,提高抗肿瘤免疫反应的激活效率。有研究<sup>[16]</sup>表明, mRNA 肿瘤疫苗的 LN 靶向有利于触发强大的 CD8<sup>+</sup> T 细胞反应。

近年来,可吸附抗原的纳米颗粒被广泛研究, MIN 等<sup>[17]</sup>开发了可以捕获肿瘤细胞突变产生的新抗原、损伤相关分子模式蛋白,以及组蛋白和警报素等多种抗原的纳米颗粒。本研究通过薄膜水化法制备

多功能的纳米胶束,将光热剂 ICG 固定在 F127 聚合物的亲疏水界面中,成功构建了性质稳定的 F127-ICG,荧光强度较游离 ICG 增加了  $(165.5 \pm 1.48)\%$ 。这种荧光增强的现象是由于 F127 胶束形成的亲疏水界面降低了 ICG 在水溶液中因非特异性聚集而导致的荧光自猝灭,屏蔽了分子间的范德瓦耳斯力相互作用,阻碍二聚体形成,使 ICG 在水溶液中能以单体的形式存在<sup>[18]</sup>。研究<sup>[17]</sup>报道,纳米颗粒可以通过疏水作用或离子间的相互作用捕获经过不同方法治疗后释放的肿瘤抗原,通过将抗原提呈至 APC 发挥有效的抗肿瘤免疫作用。本研究体外实验中, F127-ICG 与 4T1 乳腺癌细胞裂解液共孵育后的粒径、负 Zeta 电位以及结合的蛋白量有所增加,证实了 F127-ICG 的抗原捕获能力。PTT 作为癌症的新型疗法,具有高选择性、低毒性以及诱导免疫原性的细胞死亡<sup>[19-20]</sup>,在升高温度直接杀死肿瘤细胞的同时,释放肿瘤特异



性抗原,为F127-ICG的抗原吸附提供了原料。不仅如此,吸附抗原后的F127-ICG大小仍然在100 nm以内,粒径为 $(96.35 \pm 0.92)$  nm, Zeta电位为 $-(4.55 \pm 1.36)$  mV。据报道<sup>[21-22]</sup>,影响物质在组织间质的淋巴引流因素中,粒径与Zeta电位被确定为不可或缺的参数,小于10 nm的物质在体内通过血液循环代谢,大于100 nm的纳米颗粒由于通过间质的扩散和对流减少,不能有效地穿透淋巴管毛细血管,而10~100 nm的物质则直接通过淋巴管回流至LN。细胞外间质中带负Zeta电位的糖胺多糖通过静电排斥作用促进了阴离子Zeta电位的分子间质运输<sup>[23]</sup>。适宜的淋巴系统引流的粒径及Zeta电位赋予了F127-ICG靶向LN的优势。在体内淋巴引流模型中,皮下注射F127(DiR-BOA)后的体内分布以及LN的离体成像结果均证实了F127胶束良好的LN靶向能力。体内双侧肿瘤模型中,继光热治疗消融原位肿瘤后,F127-ICG+激光组的对侧肿瘤生长趋势明显比PBS及F127-ICG组慢,进一步证实吸附抗原的F127-ICG发挥了良好的肿瘤疫苗效应。

综上所述,PTT清除原位肿瘤并释放肿瘤抗原,协同F127胶束的抗原吸附及LN靶向特性,产生有效的抗肿瘤免疫反应抑制远位肿瘤生长,从而将PTT触发的局部治疗扩展至全身治疗。鉴于肿瘤的异质性,通过单一的“选择”抗原刺激免疫反应的传统策略往往达不到预期的治疗效果<sup>[24]</sup>。与传统方法相比,本研究的新策略具有以下优势:具有广谱抗原表位的肿瘤原位疫苗,有利于个性化医疗,不受个体差异影响;将抗原主动递送至LN,解决了肿瘤组织缺乏APC的劣势,避开了APC迁移时受到的众多限制;纳米配方中仅有的两种成分F127及ICG均为FDA批准的材料,具有良好的生物相容性,为快速的临床转化提供了基础。此外,肿瘤的发生发展离不开肿瘤细胞的免疫逃避机制,例如调节性T细胞(Treg细胞)的浸润<sup>[12]</sup>及抑制性检查受体的高表达<sup>[25]</sup>,使用免疫检查点抑制剂可打破局部免疫耐受微环境,但是对肿瘤复发及转移的抑制作用并不理想<sup>[26]</sup>。本研究中设计的F127胶束,可实现光热剂ICG和免疫佐剂的共包裹,包含佐剂的肿瘤疫苗靶向LN,实现DC激活及阻止T细胞抑制,协同提高免疫治疗的有效性,为免疫佐剂的联合治疗提供优质的肿瘤纳米疫苗平台。然而,F127-ICG纳米胶束也存在一些局限性,例如,近红外激光的光穿透深度受限,不能对体内深部的肿瘤进行治疗。通过内窥镜技术的联合应用,偶联肿瘤靶标等方式使得F127胶束可作用于非体表肿瘤,实现

具有肿瘤特异性靶向能力的精准医疗。但是,内窥镜使用的技术要求、肿瘤靶标的有限选择及脱靶效应、高成本等问题仍需解决。本研究开发的兼具光诱导抗原吸附性、淋巴结靶向功能的多功能纳米平台需要进一步的加强探索,将局部光热治疗和肿瘤靶向治疗有序结合,为增强个性化肿瘤原位疫苗效应提供更合理有效的纳米载体。

## [参 考 文 献]

- [1] WANG C, XU Y H, XU H Z, *et al.* PD-L1 blockade TAM-dependently potentiates mild photothermal therapy against triple-negative breast cancer[J/OL]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 476[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38082443/>. DOI: 10.1186/s12951-023-02240-3.
- [2] KOLARIKOVA M, HOSIKOVA B, DILENKO H, *et al.* Photodynamic therapy: innovative approaches for antibacterial and anticancer treatments[J]. *Med Res Rev*, 2023, 43(4): 717-774 DOI: 10.1002/med.21935.
- [3] DUAN X P, CHAN C, GUO N N, *et al.* Photodynamic therapy mediated by nontoxic core-shell nanoparticles synergizes with immune checkpoint blockade to elicit antitumor immunity and antimetastatic effect on breast cancer[J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(51): 16686-16695. DOI: 10.1021/jacs.6b09538.
- [4] LI Y, ZHANG K Y, WU Y, *et al.* Antigen capture and immune modulation by bacterial outer membrane vesicles as *in situ* vaccine for cancer immunotherapy post-photothermal therapy[J/OL]. *Small*, 2022, 18(14): e2107461[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35152555/>. DOI: 10.1002/smll.202107461.
- [5] ZHANG G, CHENG W J, YANG N, *et al.* Peptide-decorated artificial erythrocyte microvesicles endowed with lymph node targeting function for drug delivery[J/OL]. *Adv Ther*, 2023, 6(6): 2200236[2025-09-16]. <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/>. DOI: 10.1002/adtp.202200236.
- [6] ZHAO W, JIN L J, CHEN P, *et al.* Colorectal cancer immunotherapy-recent progress and future directions[J/OL]. *Cancer Lett*, 2022, 545: 215816[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35810989/>. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.215816.
- [7] GUEDAN S, RUELLA M, JUNE C H. Emerging cellular therapies for cancer[J]. *Annu Rev Immunol*, 2019, 37: 145-171. DOI: 10.1146/annurev-immunol-042718-041407.
- [8] SAXENA M, VAN DER BURG S H, MELIEF C J M, *et al.* Therapeutic cancer vaccines[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(6): 360-378. DOI: 10.1038/s41568-021-00346-0.
- [9] NAJIBI A J, SHIH T Y, ZHANG D K Y, *et al.* Targeting tumor extracellular matrix activates the tumor-draining lymph nodes[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2022, 71(12): 2957-2968. DOI: 10.1007/s00262-022-03212.
- [10] HUBER V, CAMISASCHI C, BERZI A, *et al.* Cancer acidity: an ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation[J]. *Semin Cancer Biol*, 2017, 43: 74-89. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.03.001.
- [11] TERRY S, BUART S, CHOUAIB S. Hypoxic stress-induced tumor and immune plasticity, suppression, and impact on tumor

- heterogeneity[J/OL]. *Front Immunol*, 2017, 8: 1625[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29225600/>. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01625.
- [12] YOU S Y, LI S Q, ZENG L S, *et al.* Lymphatic-localized Treg-mregDC crosstalk limits antigen trafficking and restrains anti-tumor immunity[J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(8): 1415-1433. e12. DOI: 10.1016/j.ccell.2024.06.014.
- [13] ADEMA G J, DE VRIES I J M, PUNT C J, *et al.* Migration of dendritic cell based cancer vaccines: *in vivo* veritas [J]. *Curr Opin Immunol*, 2005, 17(2): 170-174. DOI: 10.1016/j.coi.2005.01.004.
- [14] LI S X, BENNETT Z T, SUMER B D, *et al.* Nano-immune-engineering approaches to advance cancer immunotherapy: lessons from ultra-pH-sensitive nanoparticles[J]. *Acc Chem Res*, 2020, 53(11): 2546-2557. DOI: 10.1021/acs.accounts.0c00475.
- [15] GASTEIGER G, ATAIDE M, KASTENMÜLLER W. Lymph node—an organ for T-cell activation and pathogen defense[J]. *Immunol Rev*, 2016, 271(1): 200-220. DOI: 10.1111/imr.12399.
- [16] CHEN J J, YE Z F, HUANG C F, *et al.* Lipid nanoparticle-mediated lymph node-targeting delivery of mRNA cancer vaccine elicits robust CD8<sup>+</sup> T cell response[J/OL]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(34): e2207841119[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35969778/>. DOI: 10.1073/pnas.2207841119.
- [17] MIN Y Z, ROCHE K C, TIAN S M, *et al.* Antigen-capturing nanoparticles improve the abscopal effect and cancer immunotherapy [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(9): 877-882. DOI: 10.1038/nnano.2017.113.
- [18] CHENG W J, WU X B, YU S, *et al.* Biomimetic nanoplatform with selectively positioned indocyanine green for accurate sentinel lymph node imaging[J]. *Nanoscale*, 2023, 15(47): 19168-19179. DOI: 10.1039/D3NR03149G.
- [19] MA W, SUN R, TANG L G, *et al.* Bioactivable STING nanoagonists to synergize NIR- II mild photothermal therapy primed robust and long-term anticancer immunity[J/OL]. *Adv Mater*, 2023, 35(48): e2303149[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37691545/>. DOI: 10.1002/adma.202303149.
- [20] KONG C Q, CHEN X C. Combined photodynamic and photothermal therapy and immunotherapy for cancer treatment: a review[J]. *Int J Nanomed*, 2022, 17: 6427-6446. DOI: 10.2147/ijn.s388996.
- [21] NAKAMURA T, KAWAI M, SATO Y, *et al.* The effect of size and charge of lipid nanoparticles prepared by microfluidic mixing on their lymph node transitivity and distribution[J]. *Mol Pharm*, 2020, 17(3): 944-953. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01182.
- [22] SCHUDEL A, FRANCIS D M, THOMAS S N. Material design for lymph node drug delivery[J]. *Nat Rev Mater*, 2019, 4(6): 415-428. DOI: 10.1038/s41578-019-0110-7.
- [23] WANG Y, WANG H. Lymph node targeting for immunotherapy[J/OL]. *Immunooncol Technol*, 2023, 20: 100395[2025-09-16]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37719676/>. DOI: 10.1016/j.iotech.2023.100395.
- [24] MELIEF C J M, VAN HALL T, ARENS R, *et al.* Therapeutic cancer vaccines[J]. *J Clin Investig*, 2015, 125(9): 3401-3412. DOI: 10.1172/jci80009.
- [25] LIN M J, SVENSSON-ARVELUND J, LUBITZ G S, *et al.* Cancer vaccines: the next immunotherapy frontier[J]. *Nat Cancer*, 2022, 3(8): 911-926. DOI: 10.1038/s43018-022-00418-6.
- [26] HWANG W L, NIEMIERKO A, HWANG K L, *et al.* Clinical outcomes in patients with metastatic lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors and thoracic radiotherapy[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(2): 253-255. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.3808.

[收稿日期] 2025-02-08

[修回日期] 2025-09-26

[本文编辑] 邢一凡, 黄静怡