

有机近红外二区荧光探针研究进展

刘嘉慧^{1,2}, 杨燕青³, 马睿³, 施可彬^{3,4*}¹南通市口腔医院, 江苏 南通 226000;²南通市中西医结合医院, 江苏 南通 226000;³北京大学长三角光电科学研究院, 江苏 南通 226000;⁴人工微结构和介观物理国家重点实验室, 北京大学物理学院, 北京 100871

摘要 与可见光区(400~700 nm)和近红外一区(NIR-I, 700~900 nm)荧光成像(FL)相比,近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)荧光成像具有更深的穿透深度、更高的信噪比。开发亮度高、吸收/发射波长长、生物相容性好的 NIR-II 荧光探针一直是 NIR-II 荧光成像领域的一个重要研究方向。有机 NIR-II 荧光探针以其优异的生物相容性和良好的药代动力学特性而备受关注。本文从红移吸收/发射波长、提高荧光量子产率/摩尔吸光系数、改善生物相容性等角度系统总结了近年来花菁类染料、D-A-D 小分子、聚合物点等有机 NIR-II 荧光探针的研究进展,重点介绍了具有代表性的荧光探针在活体 NIR-II 荧光成像中的应用,最后讨论了有机 NIR-II 荧光探针迈向临床应用面临的潜在挑战。

关键词 医用光学; 近红外二区; 荧光探针; 花菁类染料; 有机小分子; 聚集诱导发光; 共轭聚合物

中图分类号 O436 文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230819

1 引言

活体成像技术已经成为生命科学研究、临床前研究和临床实践过程中不可或缺的重要手段。计算机断层扫描(CT)、磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)、单光发射计算机断层扫描(SPECT)等一系列活体成像技术的出现,使得医学观测从传统的解剖影像时代跨入分子影像时代。这些成像手段在疾病的诊断、进展监测和预后等方面发挥着重要作用^[1]。

尽管上述成像技术具有无限穿透深度的强劲优势,但其缺点也十分显著,如空间分辨率有限(MRI、PET)、操作时间长(MRI、CT)、设备价格昂贵(SPECT、CT、MRI、PET)、存在辐射风险(SPECT、CT、MRI、PET)、灵敏度低(CT)。活体荧光成像技术具有时空分辨率高、无电离辐射、灵敏度高优势,已经被广泛应用于活体成像^[2]。然而,生物体内的水、血红蛋白、脂质、黑色素等物质会对可见光区的光子产生较强的吸收效应,并且不同尺寸、成分和形态的生物组织也会对可见光区的光子产生严重的散射效应,从而显著限制了荧光成像在可见光窗口中的穿透深度(约 1 mm)^[3]。

近红外一区(NIR-I, 700~900 nm)活体荧光成像

技术的出现给活体荧光成像带来了根本性的创新。与可见光相比,在近红外区域(700~900 nm),组织对光子的吸收散射较低,而且生物体的自体荧光较弱,因此能够实现较深的组织穿透(约 1~3.5 mm)。目前,NIR-I 荧光成像技术已经被广泛应用于临床实践中,如手术导航指引前哨淋巴结、乳腺癌、卵巢癌等的手术切除。然而,在 NIR-I 区域,生物组织对光子仍有较强的吸收、散射,而且生物体的自体荧光较高,导致活体成像时存在穿透深度小、空间分辨率低和信噪比(SNR)不足等问题。例如,无法检测到术中残留的小肿瘤,无法识别神经和血管等深层组织等问题,这都将导致手术导航的有效性受限^[4]。随着在复杂生理条件下高精度成像需求的不断提高,亟须开发出一种具有更大穿透深度和更高信号背景比的荧光成像技术^[5]。

2009年,Smith等提出了近红外二区(NIR-II)的概念,即波长从1000 nm到1700 nm的区域。近红外二区可进一步细分为 NIR-IIa (1300~1400 nm)和 NIR-IIb (1500~1700 nm)两个子窗口^[6]。近年来,NIR-II 荧光成像技术发展迅猛,已被广泛应用于疾病监测、手术导航、药物筛选等领域^[7-8]。相比于 NIR-I 荧光成像技术,NIR-II 荧光成像技术的穿透深度更大(>10 mm)、信噪比更高(约为 20)、空间分辨率更优

收稿日期: 2023-05-10; 修回日期: 2023-05-28; 录用日期: 2023-05-30; 网络首发日期: 2023-06-15

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0712500)、国家自然科学基金(12204017)、南通市基础科学研究(JC2021014)

通信作者: *kebinshi@pku.edu.cn

(约为3 μm),表现出了巨大的临床转化潜力^[9-11]。

与NIR-I荧光成像相比,NIR-II荧光成像的优势可以从生物体组织与光子的相互作用方面进行解释。激发光激发荧光探针进行荧光成像的过程如下:激发光照射到生物组织表面并发生折射,进入生物体组织中的那部分光子经历严重的被吸收、被散射后到达荧光探针处并激发荧光探针,荧光探针受激发后产生的荧光需要经历生物组织的强吸收和散射作用后才能到达探测器进而被检测到^[12]。值得注意的是,在此过程中一些生物分子、组织会被激发出荧光,即自体荧光。综上可知:生物分子、组织对光子的吸收和散射是影响荧光成像穿透性的关键因素;生物分子、组织受激产生的自体荧光是影响荧光成像信噪比的关键因素。由理论计算模型可知,穿透深度 $\delta=[3\mu_a(\mu_a+\mu'_s)]^{-1/2}$,其中, μ_a 为生物分子、组织的消光系数, μ'_s 为生物分子、组织的散射系数^[13]。这两个参数都有波长依赖性。散射系数 μ'_s 对穿透深度具有决定性影响,这是因为:1)生物分子、组织对光子的吸收作用虽然也会影响穿透深度,但该影响可以通过增加激发光的强度来消除。2) $\mu'_s=\lambda^{-\omega}$ (其中, λ 为波长, $\omega=0.22\sim 1.68$)^[14],随着波长增加,散射系数将急剧降低,穿透深度将显著增大;同时,随着激发波长变长,生物分子、组织受激产生的自体荧光将变弱,尤其是在NIR-IIa、NIR-IIb范围内自体荧光几乎为零,成像信噪比将更高^[15]。

荧光成像的进步离不开探针和探测器的共同进步,随着二区荧光信号探测器(如钢镱砷相机、超导纳米线单光子探测器)的出现,一些应用于NIR-II荧光成像的设备(如NIR-II荧光宏观成像系统、NIR-II宽场显微成像系统、NIR-II扫描/转盘共聚焦荧光成像系统、NIR-II双光子荧光成像系统)被研制、开发出来,甚至实现了商业化^[16-18],为在分子水平、细胞水平、小动物活体以及临床上开展跨层次、多尺度的NIR-II荧光影像研究提供了可能^[19]。自从单壁碳纳米管(SWCNTs)首次被应用于小动物活体NIR-II荧光成像以来^[13,20],开发具有高摩尔吸光系数、高荧光量子产率、稳定性好、生物相容性好的NIR-II荧光探针一直都是NIR-II荧光领域的研究热点。目前,NIR-II荧光探针主要分为有机材料和无机材料两大类^[21-22]。以单壁碳纳米管、量子点、稀土掺杂下转换材料为代表的NIR-II无机荧光探针具有生物相容性较差、无法在体内完成生理代谢、具有较强重金属毒性等弊端,严重制约了其在临床实践中的应用^[15,23-25]。以D-A-D有机小分子、花菁类染料、共轭聚合物等为代表的有机NIR-II荧光探针具有结构明确、生物相容性好、无重金属离子毒性等优点,在临床实践上具有更广阔的应用前景^[26-28]。

本文总结了目前文献报道的有机NIR-II荧光探针的分子结构设计理念 and 生物医学成像应用。下面将按照花菁类染料、D-A-D小分子和共轭聚合物的

分类方式分别介绍有机NIR-II荧光探针的研究进展。

2 花菁类染料

自1856年Williams用喹啉和戊基碘反应首次制备得到花菁类染料以来,花菁类染料以其高摩尔消光系数($>100000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)、高荧光量子产率等优点备受青睐,已被广泛应用于生物成像。该类荧光分子中间为甲川基(CH)_n组成的共轭链,共轭链与两端含有氮/硫/氧的杂环构成一个大共轭体系^[29]。在过去的几十年中,已经有许多具有长波长吸收或发射的花菁类染料被开发研制出来,但由于成像系统的限制,这些花菁类染料没有得到进一步应用和研究。随着NIR-II荧光成像系统的迅猛发展,花菁类染料因具有多种固有优势而在生物医学应用中受到越来越多的关注^[30]。研究表明,适用于高速、高灵敏、超分辨NIR-II荧光成像的花菁类染料具有以下三个优点:1)具有长波长的吸收和荧光发射;2)在生物体内具有较高的NIR-II荧光亮度;3)优异的生物相容性和稳定性^[31]。本节总结归纳了具有NIR-II吸收/发射的花菁类染料的分子设计理念和生物应用场景。

2.1 吸收/发射波长红移策略

激发波长的红移有利于增大穿透深度和提高成像分辨率。目前,实现花菁类染料吸收/发射波长红移的策略主要可以分为以下三类:1)延长有效共轭长度;2)修饰推拉电子体系,如杂原子替换(硫原子置换氧原子)、增强供体单元的供电子能力、杂环改造等;3)构建J-聚集^[31]。

甲川基共轭链是决定花菁类染料光谱性质的主要结构因素,增加甲川基的个数可以有效延长荧光分子的有效共轭长度,进而使其吸收波长和荧光发射波长红移^[32]。然而,由于“菁极限”的限制,当甲川基数量超过一定数目时,分子的光稳定性和荧光量子产率将急剧下降。值得指出的是,两端的杂环结构也会对荧光分子的光谱性质产生显著影响。因此,可以通过对两端杂环进行合理修饰来获得具有长波长吸收/发射的探针^[33]。2017年,Bawendi团队^[32]基于7-二甲氨基基香豆素设计、合成了一系列聚甲基菁染料(Flav1、Flav3、Flav5、Flav7)。他们通过延长分子的有效共轭长度(如增加甲川基的数量)和增强两端杂环的推电子能力(如将“硫原子”置换为“氧原子”或者增加供电子基团二甲胺)实现了吸收和发射波长的红移(吸收波长可从650 nm红移至1026 nm,发射波长从680 nm红移至1045 nm)^[34]。该工作为设计用于具有NIR-II区域吸收和发射的花菁类染料奠定了坚实的基础。表1列举了常见NIR-II荧光探针的光学特性(λ_{abs} 表示吸收波长, λ_{em} 表示发射波长),图1给出了设计长发射波长荧光探针的代表性策略。

表 1 NIR-II 荧光探针的光学特性
Table 1 Optical properties of NIR-II probes

Fluorescent probe	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Quantum yield (QY) (IR26 as the reference, its QY is 0.05%)	Extinction coefficient / ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Ref.
Flav7	1026	1075	0.53%	236000	[32]
BTC980	932	980	0.57%	184000	[34]
BTC982	944	982	0.68%	260000	[34]
BTC1070	1014	1070	0.09%	115000	[34]
IR-PEG	780	920	0.18%	N.A.	[35]
HC1222	1180	1222	0.016%	117320	[33]
HC1376	1312	1376	0.011%	91880	[33]
FD1080-FBS	1046	1080	5.94%	29672	[36]
LZ-1105	1041	1105	0.03%	101000	[37]
5H5	1069	1125	0.08%	34200	[38]
CH1055-PEG	750	1055	0.03%	N.A.	[39]
CH-4T	738	1005	1.08%	N.A.	[40]
CQS1000	830	1000	N.A.	N.A.	[41]
H1-based NPs	820	1100	N.A.	N.A.	[42]
TA1 NPs	680	893	0.08%	22.4	[43]
IR-BEMC6P	725	1028	0.18%	1300	[44]
IR-BGP6	737	1036	N.A.	2400	[44]
IR-FEP	780	1047	0.2%	5700	[45]
IR-FGP	750	1047	0.19%	6400	[44]
IR-E1	830	1071	0.07%	N.A.	[46]
IR-BBEP	741	N.A.	0.04%	4100	[44]
IR-FTAP	733	1048	0.53%	5000	[47]
IR-FP8P	748	1040	0.6%	13000	[44]
BTB NPs	700	890	0.48%	19.6	[48]
BBT NPs	840	N.A.	N.A.	8.2	[48]
L6-PEG ₂₀₀₀	698	1050	0.105%	78000	[49]
FT-TQT@FBS	770	1034	0.2%	N.A.	[21]
Q8Pnap/FBS	80	1050	0.003%	N.A.	[50]
TB1 dots	740	975	0.62%	12100	[51]
L1013 NPs	761	1013	0.96%	9.6	[52]
TT3-oCB NPs	784	N.A.	0.46%	23600	[53]
2TT-oC26B	740	1031	1.15%	N.A.	[54]
TPE-BBT PLNPs	680	950	3.15%	N.A.	[55]
TPA-BT-DPTQ	700	950	0.18%	N.A.	[56]
BETA NPs	869	1084	0.0076%	6180	[57]
L897 NPs	711	897	0.58%	7.03	[58]
TQ-BPN dots	630	810	1.39%	N.A.	[29]
DPTQ-PTZTPE NPs	628	1017	0.22% (IR-820 as the reference, its QY is 4.2% in ethanol)	N.A.	[59]
DPTQ-PTZ NPs	618	1014	0.16% (IR-820 as the reference, its QY is 4.2% in ethanol)	N.A.	[59]
DPTQ-PTZTPA NPs	635	1068	0.29% (IR-820 as the reference, its QY is 4.2% in ethanol)	N.A.	[59]
p-FE	774	1010	1.65%	N.A.	[60]
PDA-I	654	1047	0.17%	N.A.	[61]
PBT NPs	1000	1156	0.01%	37600	[62]

续表

Fluorescent probe	$\lambda_{\text{abs}} / \text{nm}$	$\lambda_{\text{em}} / \text{nm}$	Quantum yield (QY) (IR26 as the reference, its QY is 0.05%)	Extinction coefficient / ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	Ref.
P1-Pdots	923	1095	0.092%	N.A.	[63]
<i>m</i> -PBTQ4F	986	1117	0.32%	N.A.	[63]
PBQ ₄₅ NPs	1060	1150	0.0048%	27.5	[64]
PDFT1032	809	1032	N.A.	N.A.	[65]
TT-3T	640	1070	0.17%	12200	[66]
TTQ-2TC NPs	880	1270	0.03% (IR-1061 as standard in THF, its QY is 1.7%)	6.2	[65]
L1057 NPs	980	1057	0.125%	28000	[67]
P3c Pdots	746	1083	0.17%	N.A.	[68]
pNIR-4	709	1080	0.22%	5730	[69]
IR-TPA Pots	670	950	0.67%	N.A.	[70]

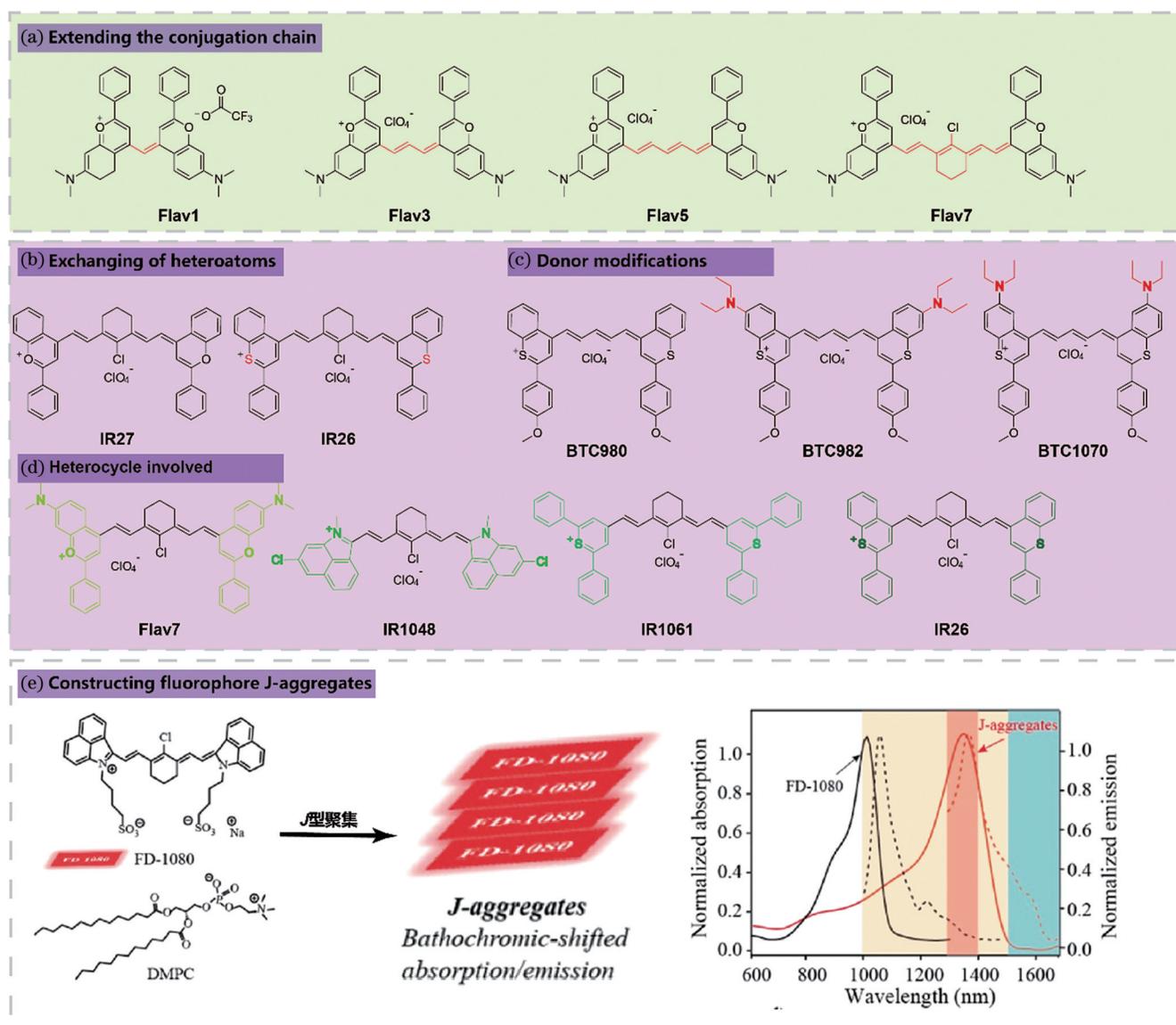


图1 设计具有长发射波长荧光探针的代表性策略。(a)延长共轭长度^[32];(b)杂原子替换^[34];(c)供体单元改造^[34];(d)杂环替代^[33];(e)构建J-聚集体^[71]

Fig. 1 Representative design strategies for fluorescent probes with long emission wavelengths. (a) Extending the conjugation chain^[32]; (b) exchanging of heteroatoms; (c) donor modifications^[34]; (d) heterocycle substitute^[33]; (e) constructing J-aggregates^[71]

由于分子间存在着较强的范德瓦耳斯力, 荧光分子在水溶液中容易发生自聚集行为。值得指出的是, 花菁类染料中共轭链上的 π -延伸加剧了分子间的聚集。福祸相依, 具有平面共轭结构的荧光分子极易以头尾相结合的形式在水溶液中定向形成 J -聚集体。与单个荧光分子相比, 通过自组装形成的 J -聚集体可以实现吸收发射波长的红移。因此, 通过自组装技术构建 J -聚集体也是制备更长波长 NIR-II 造影剂的一种常用策略。2019 年, 张凡团队^[71]通过纳米工程技术将 NIR-II 聚甲基菁染料 FD-1080 与 1,2-二甲基吡啶-*sn*-甘油-3-磷酸胆碱(DMPC)自组装制备了具有较高水溶性和稳定性的 FD-1080 J -聚集体, 如图 1(e) 所示。与 FD-1080 相比, FD-1080 J -聚集体的最大吸收峰和发射峰均红移了约 300 nm (吸收波长从 1064 nm 红移至 1360 nm, 发射波长从 1080 nm 红移至 1370 nm), 成功实现了 1500 nm 以上的无创脑血管和下肢血管 NIR-IIb 活体荧光成像。

此外, Sletten 团队^[72]将近红外花菁类染料 IR-140 装入空心介孔二氧化硅纳米颗粒(HMSNs)中, 制备出了具有短波红外吸收和发射的 IR-140 J -聚集体, 成功实现了 980 nm 激光激发下的高分辨 NIR-II 活体荧光成像。范曲立团队^[73]设计制备了一种 J -聚集型的方酸纳米粒子, 该纳米粒子克服了有机分子易聚集和荧光淬灭的缺陷, 增强了 NIR-II 荧光; 同时, 他们将该纳米粒子应用到了 NIR-II 荧光成像指导的光热治疗中。

2.2 荧光量子产率提升策略

提升探针亮度有助于提高成像信噪比。荧光探针吸收/发射波长的红移势必会导致荧光量子产率的降低。与 NIR-I 荧光分子相比, NIR-II 荧光分子的亮度几乎下降了两个数量级。目前, 文献报道的提升 NIR-II 花菁类染料荧光亮度的策略主要可以分为以下三类: 1) 引入空间位阻; 2) 与蛋白形成复合物; 3) 增强分子结构的刚性, 如图 2 所示。

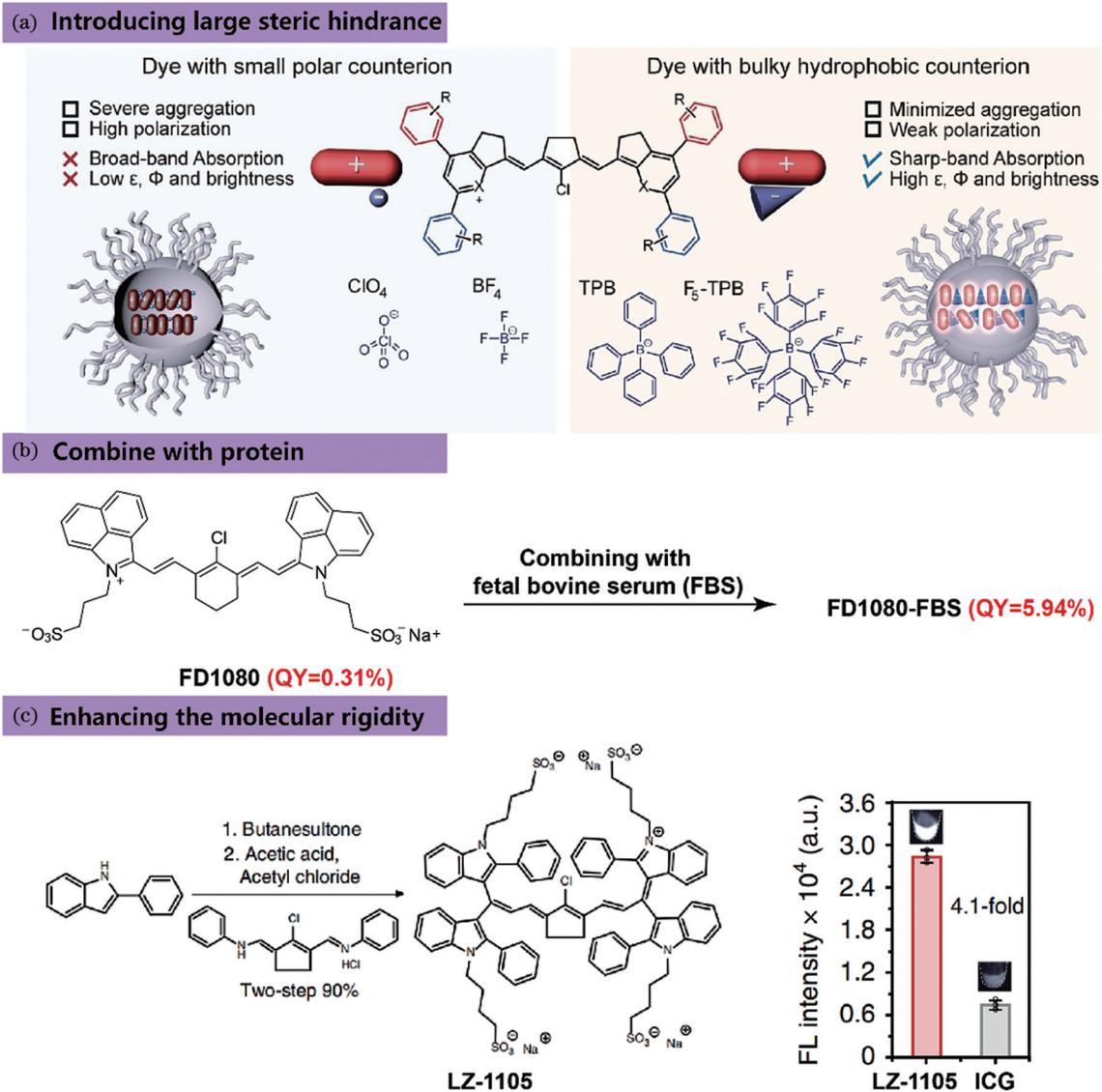


图 2 提高荧光亮度的代表性策略。(a)引入空间位阻^[33];(b)与蛋白质进行自组装^[33];(c)提高分子结构的刚性^[37]

Fig. 2 Representative design strategies to improve fluorescent brightness. (a) Introducing steric hindrance^[33]; (b) self-assembling with protein^[33]; (c) improving the molecular rigidity^[37]

聚集诱导荧光淬灭是导致花菁类染料荧光亮度降低的主要原因之一。因此,引入较大的空间位阻基团是提高花菁类染料的一种实用型策略。如图 2(a)所示,张凡团队^[33]设计开发了一系列长波长的七甲川菁染料,并通过引入反离子配对策略,使用体积庞大的疏水反离子作为空间间隔物来阻止染料的聚集(疏水反离子也可以作为软离子来削弱极化)。研究表明,反离子配对的染料在水溶液中表现出了优秀的光物理性质,与未进行反离子配对的染料相比,荧光强度提升了 13~14 倍。

由于分子内电荷转移的存在,花菁类染料常常受到溶剂极性诱导荧光淬灭的困扰,因此染料在水溶液中的吸收宽化且强度降低,从而导致亮度大大降低。基于超分子相互作用的原理,将花菁类染料与牛血清白蛋白通过自组装技术创建稳定的复合物是提升亮度的一种有效手段。如图 2(b)所示,张凡团队^[36]将 NIR-II(FD-1080)与胎牛血清(FBS)相结合并进行加热制备了 FD-1080-FBS,FD-1080-FBS 在增强染料分子刚性的同时屏蔽了水溶液对荧光分子的不良影响,成功地将荧光量子产率从 0.31% 提升至 5.94%(以 IR26 的荧光量子产率 0.05% 为参考)。与短激发波长(650~980 nm)相比,1064 nm 激发波长可以实现更大的组织穿透深度和更高的空间分辨率。FD-1080-FBS 不仅可以实现无创、高分辨率的后肢深组织血管和脑血管

成像,而且能够动态监测清醒及麻醉状态下小鼠的呼吸情况。

另一种提高荧光分子亮度的方法是通过增强分子结构的刚性以及提高分子的平面性来限制荧光分子的分子间旋转^[74]。如图 2(c)所示,张凡团队^[37]以 2-苯基吡啶等为原料,通过两步反应高产率(90%)合成了最大吸收峰位于 1041 nm、最大荧光发射峰位于 1105 nm 的花菁类染料 LZ-1105。该分子内芳香母核上扭转的吡啶环提供了较大的空间位阻因而提高了荧光量子产率(是吡啶菁绿的 4.1 倍),端基上含有的 4 个磺酸根基团进一步赋予了 LZ-1105 较高的水溶性。LZ-1105 可以与血液中的纤维蛋白原发生特异性结合生成复合物,因而具有较长的血液循环半衰期(约 3.2 h)。基于 LZ-1105 可以实现无损、实时、快速、高分辨的血管动力学研究。

2.3 生物相容性和稳定性提升策略

NIR-II 花菁类染料往往具有较差的水溶性,难以直接应用于活体成像。目前,提高 NIR-II 花菁类染料生物相容性的策略主要可以分为以下两大类:1)通过纳米沉淀法利用两亲性材料包覆疏水荧光分子;2)通过分子工程手段在疏水荧光分子上引入亲水基团^[29]。

如图 3(a)所示,戴宏杰团队^[35]首次将商品化的花

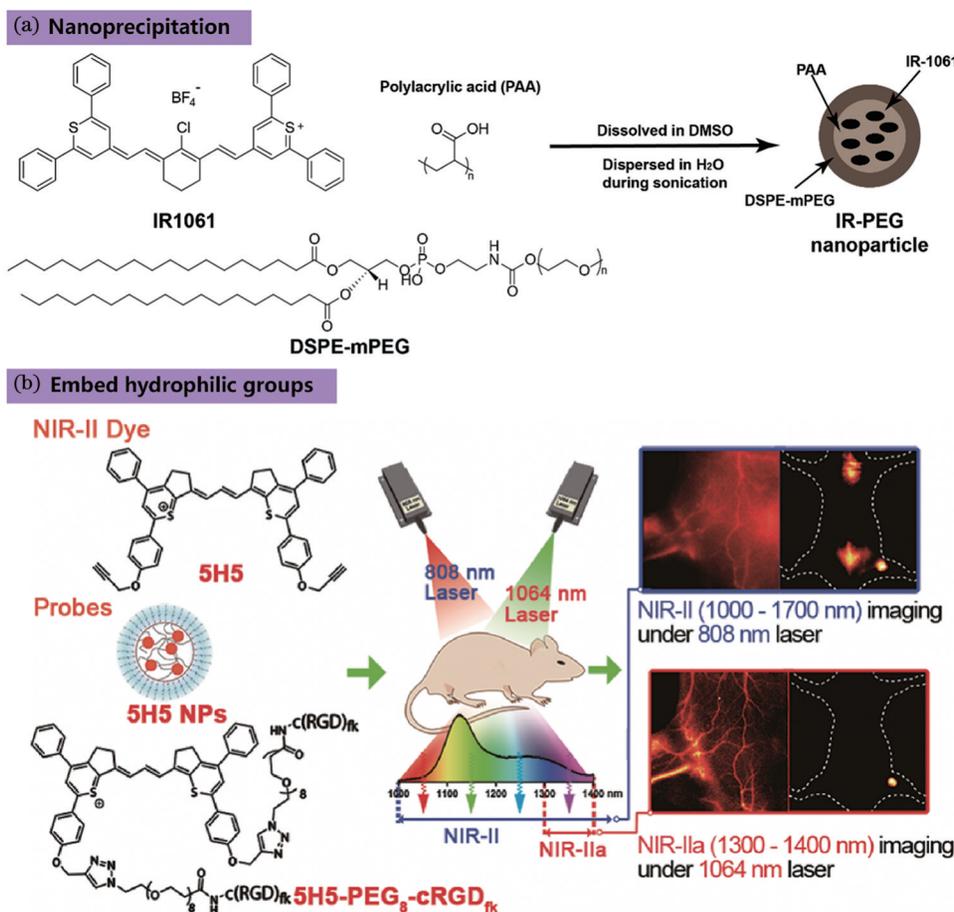


图 3 提高水溶性的代表性策略。(a)纳米沉淀法^[35]; (b)引入亲水基团^[38]

Fig. 3 Representative design strategies to improve water solubility. (a) Nanoprecipitation^[35]; (b) embedding hydrophilic groups^[38]

菁类染料 IR-1061 用于 NIR-II 荧光成像。为了增加 IR-1061 的生物相容性,通过纳米沉淀法将其制成尺寸约为 5.4 nm 的 NIR-II 荧光探针 IR-PEG。由于分子周围环境的改变,与 IR-1064 相比,IR-PEG 的最大吸收峰蓝移了 294 nm,吸收峰发生了明显的宽化和降低,但生物相容性和稳定性却得到了显著提高。通过分子工程手段对 NIR-II 花菁类染料进行磺酸根化或者聚乙二醇化也是提升其生物相容性的一种有效手段。如图 3(b)所示,洪学传团队^[38]设计、制备出了花菁类染料 5H5,为了增加其水溶性从而应用于活体成像,该团队通过点击化学反应实现了 5H5 的聚乙二醇化,同时引入肿瘤靶向单元 RGD 肽链赋予探针肿瘤靶向能力,最终探针可在水中自组装成纳米球 5H5-PEG8-cRGDfk。5H5-PEG8-cRGDfk 可在 1064 nm 激光激发下进行 NIR-IIa 活体荧光成像,并成功实现了靶向整合素的脑胶质瘤成像。与传统 808 nm 激发的 NIR-II 荧光成像相比,其背景干扰更低,精准度更高(318 μm VS 407 μm),成像信噪比更高(6.8 VS 4.0)。

NIR-II 荧光成像技术实现临床转化的最大瓶颈在于目前尚无美国食品药品监督管理局(FDA)批准的 NIR-II 造影剂^[39,75]。目前,FDA 批准用于临床研究的光学造影剂有亚甲基蓝(MB)、吲哚菁绿(ICG)等。值得注意的是,虽然 ICG 属于 NIR-I 荧光材料,其最大荧光发射峰位于 835 nm,但其荧光信号可延伸至 NIR-II 区,在 1500 nm 以上仍旧能够检测到较强的荧光信号。基于 ICG 较高的摩尔吸光系数,2018 年,Bruns 团队^[8]首次将 ICG 应用于 NIR-II 活体荧光成像,并建议将 ICG 作为血管成像的金标准。此后,基于 ICG 的 NIR-II 荧光成像被广泛应用于临床前研究和临床研究,如手术导航、脑血管中血液流速计算、血管重构等^[17-18,76]。基于不同生物应用场景对成像设备的实际使用需求,越来越多的 NIR-II 成像设备被开发出来。2020 年,田捷教授团队^[16]研制出了一种集成可见光和 NIR-I/II 的多通道手术导航系统,首次基于 ICG 进行了手术导航指引人体肝癌切除术,同时联合超声成像在术中实现了对毫米级肝癌病灶及转移灶的识别和清除。研究表明:该技术可以在术中发现其他术前诊断技术(如 MRI、PET、CT)难以发现的毫米级微小病灶和转移灶,显著提高手术切除的准确性。这是 NIR-II 荧光成像技术首次应用于人体实验,对于推动 NIR-II 荧光成像技术在临床上的应用具有十分重要的意义。

3 D-A-D 有机小分子

D-A-D 有机小分子具有化学结构清晰、光学性能可调、代谢特性优异、生物相容性良好等优点,因此成为有机 NIR-II 荧光探针研究的一大热点^[44]。如图 4 所示,戴宏杰团队^[39]首次报道了一种可用于 NIR-II 荧光

成像的水溶性小分子 CH1055-PEG。CH1055-PEG 的最大吸收峰位于 750 nm,最大发射峰位于 1055 nm,其荧光量子产率约为 0.3% (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参照)。在识别淋巴管系统及肿瘤附近的前哨淋巴结时,CH1055-PEG 都表现出了远优于 NIR-I 荧光染料 ICG 的成像性能。此外,CH1055-PEG 还可以无创检测小鼠脑部 4 mm 深度处的脑瘤,最大 T/NT 比值可达到 5.50 ± 0.36 。值得指出的是,CH1055-PEG 可以迅速通过尿液代谢(24 h 能代谢 90%),其代谢水平与 FDA 批准的 ICG 相当,这也是开发可快速代谢有机 NIR-II 荧光探针的先驱工作。随后,CH1055 分子骨架的侧链上被引入靶向单元,并被应用于 FTC-133 甲状腺肿瘤检测、整合素靶向 U87MG 肿瘤成像并指引手术切除、膝关节软骨退变成像和骨关节炎检测、生殖腺和骨骼中卵泡刺激素受体的实时成像等^[77-79]。

3.1 供体/受体单元调控

有机 NIR-II 荧光探针的光致发光机制主要依赖于分子内电荷转移(ICT)过程。当荧光探针从基态被激发到激发态时,电子将从供体转移到受体形成电荷分离器(D^+A^-),然后形成电荷转移状态。因此,可以通过分子工程手段调节供体/受体单元的给/吸电子能力,实现荧光分子最高占据分子轨道(HOMO)和最低未占据分子轨道(LUMO)之间能隙(ΔE_{gap})的调节,进而实现具有不同 NIR-II 吸收和荧光发射的荧光探针^[43,79]。

3.1.1 供体单元调控

供体单元的选择对 D-A-D 结构小分子的光物理属性具有十分重要的影响,不仅可以改变分子的能量带隙,实现荧光分子吸收/发射波长的调节,还会直接影响荧光分子的荧光量子产率^[80]。因此,选择恰当给电子能力的供体单元尤为重要。研究人员已基于强吸电子单元苯并双噻二唑(BBTD)以及具有不同给电子能力的供体单元,构建了一系列性能优异的 NIR-II 荧光分子,如图 5 所示^[42,57]。

基于 CH1055 的分子构架,洪学传团队^[41]通过增强供体单元的供电子能力(如使用噻吩环取代苯环构建荧光分子 Q1),在三苯胺的基础上增加噻吩延长有效共轭长度,构建了荧光分子 Q4^[81]。由于给体单元到受体单元的分子内电荷转移作用,以及 Q1 和 Q4 在 800~1000 nm 较宽的光谱吸收,Q1 和 Q4 的最大荧光发射峰分别位于 1000 nm 和 1100 nm 处,发射边缘可延伸至 1400 nm。与 CH1055 相比,Q1 和 Q4 的能量带隙由 1.49 eV 分别降低至 1.09 eV 和 1.12 eV,最大吸收峰分别红移了 140 nm 和 110 nm。研究人员通过纳米沉淀法制备了能够在水溶液中稳定存在的纳米粒子 Q4 NPs,并将其运用于 U87MG 肿瘤成像检测。此外,研究人员通过点击化学反应将 Q4 与 RM26 肽结合构建了首例具有主动靶向功能的 NIR-II 荧光探针

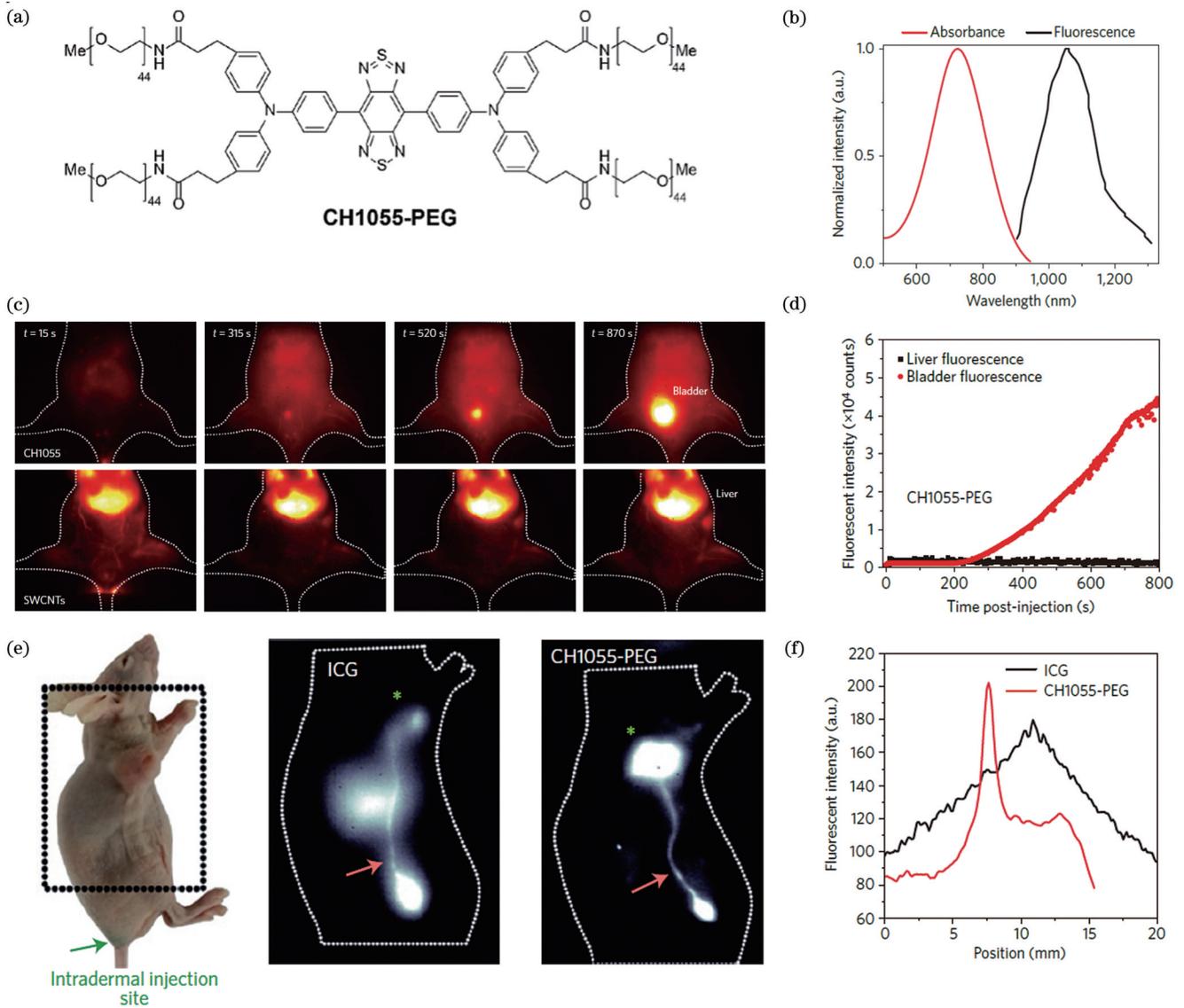


图4 CH1055的物理属性及其生物应用^[39]。(a) CH1055的化学结构式;(b) CH1055-PEG的吸收/发射光谱;(c) CH1055-PEG和单壁碳纳米管在体内的时间分布图(1200长通滤波片,曝光时间100 ms);(d) CH1055-PEG在肝脏和膀胱的荧光信号强度;(e)将ICG和CH1055-PEG分别应用于前哨淋巴结的NIR-I和NIR-II成像;(f)图e中箭头所指截面的荧光强度分布

Fig. 4 Physical properties and biological applications of CH1055^[39]. (a) Chemical structure of CH1055; (b) absorbance and fluorescent emission spectra of CH1055-PEG; (c) temporal profiles of CH1055-PEG and SWCNTs *in vivo* (1200 nm long-pass filter, exposure time of 100 ms); (d) fluorescent signal intensity of both the liver and bladder regions for CH1055-PEG; (e) NIR-II imaging with CH1055-PEG and NIR-I imaging with ICG on lymphatic vessels; (f) fluorescence intensity profiles at cross-section indicated by arrows shown in Fig. 4(e)

SCH1100,并将其成功应用于前列腺癌的活体成像。该种通过调控供体单元给电子能力的手段已被广泛应用于构建 NIR-II 荧光分子,如 H1、H3、IR-FEP、IR-E1、IR-FGP、IR-FTAP 等^[44,46-47,81]。

目前,以 BBTD 为受体单元的 D-A-D 有机小分子的吸收/发射波长仍较短,最大吸收峰绝大多数集中在 700~850 nm,最大发射峰位于 1000~1100 nm。为了进一步增大组织成像的穿透深度,荧光探针的吸收和发射进一步红移势在必行。杨光富团队^[82]提出了一种新型的分子设计策略,即通过调控供体单元的供电子能力(引入强供电子单元二甲胺)以及共轭单元的平面

来调控吸收/发射波长。他们成功设计、合成了最大吸收峰位于 942 nm、最大荧光发射峰位于 1302 nm 的 NIR-II 荧光分子(BBTD-1032)。研究表明, BBTD-1032 在 1500 nm 以上仍能检测到较强荧光信号,非常适用于 NIR-IIb 荧光成像。

3.1.2 受体单元调控

根据前期文献报道,基于 D-A-D 构型的 NIR-II 荧光分子主要以苯并噻二唑(BBTD)作为电子受体单元。由于较强的 ICT 效应,这些分子在水溶液中的荧光量子产率和消光系数都较低,而且这类荧光分子在碱性等严苛条件下不稳定,极大地限制了其生物应

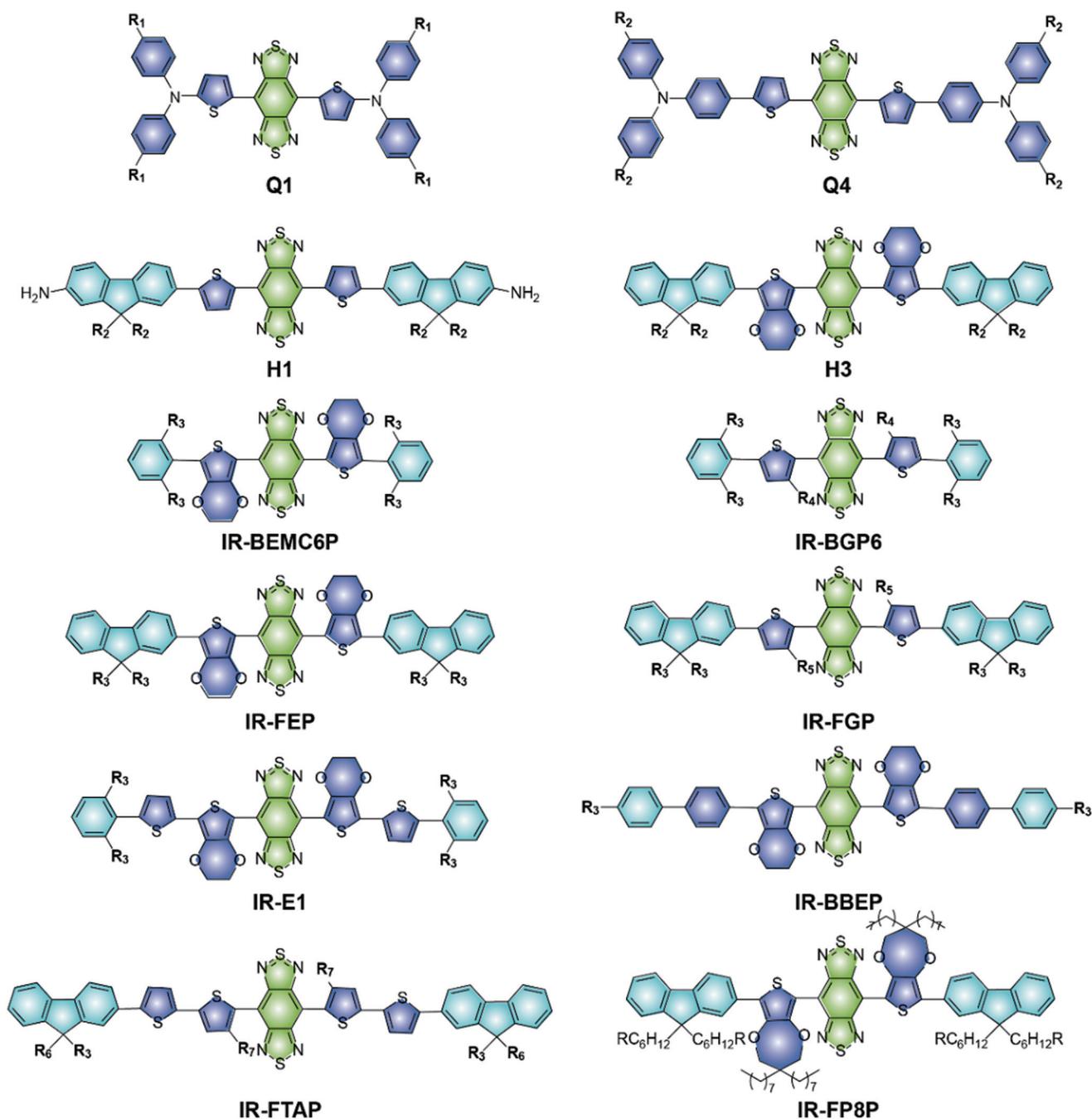


图 5 基于受体单元 BBTd 的有机分子

Fig. 5 Organic small molecules with BBTd as the core

用^[83-84]。针对上述问题,各研究团队设计、开发出了一系列吸电子能力适中、化学稳定性高的新型受体单元,并基于该类受体单元设计了新一代 D-A-D 荧光分子^[85-89],如图 6 所示。

性能优异的 NIR-II 荧光分子应具有较高的有效荧光亮度,即荧光量子产率与激发波长的消光系数的乘积要大。考虑到 ICT 效应的强弱可以通过调节受体单元的缺电子能力来实现,刘杰团队^[48]利用弱缺电子单元([1,2,5]噻二唑[3,4-*f*]苯并三氮唑, TBZ)取代 BBTd,成功构建了可同时用于 NIR-II 荧光成像以及 NIR-I 光声成像的双模态探针

BTB NPs,如图 7(a)所示。与以 BBTd 作为受体单元的探针 BBT NPs 相比, BTB NPs 的质量消光系数($19.6 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)、荧光量子产率(4.8%)都有极大提高(以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考),如图 7(b)、(c)所示。基于 NIR-II 荧光成像和光声成像,本课题组使用 BTB NPs 清晰、无创地观测到了小鼠耳部、下肢、脑部微米级血管的结构。此外,偶联 RGD 肽的 BTB-RGD NPs 能够很好地靶向高表达的整合素,可以更好地在肿瘤部位聚集,更有利于使用荧光成像和光声成像技术对肿瘤组织进行二维或三维显影。

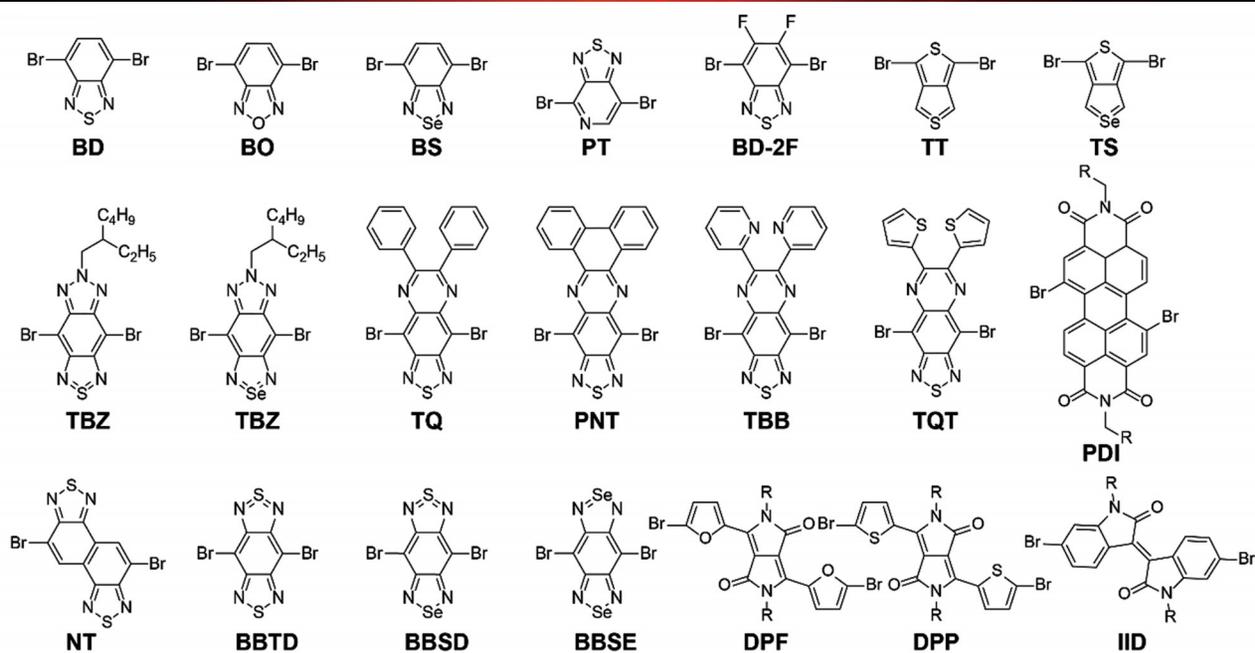


图 6 受体单元的化学结构式

Fig. 6 Chemical structures of acceptor

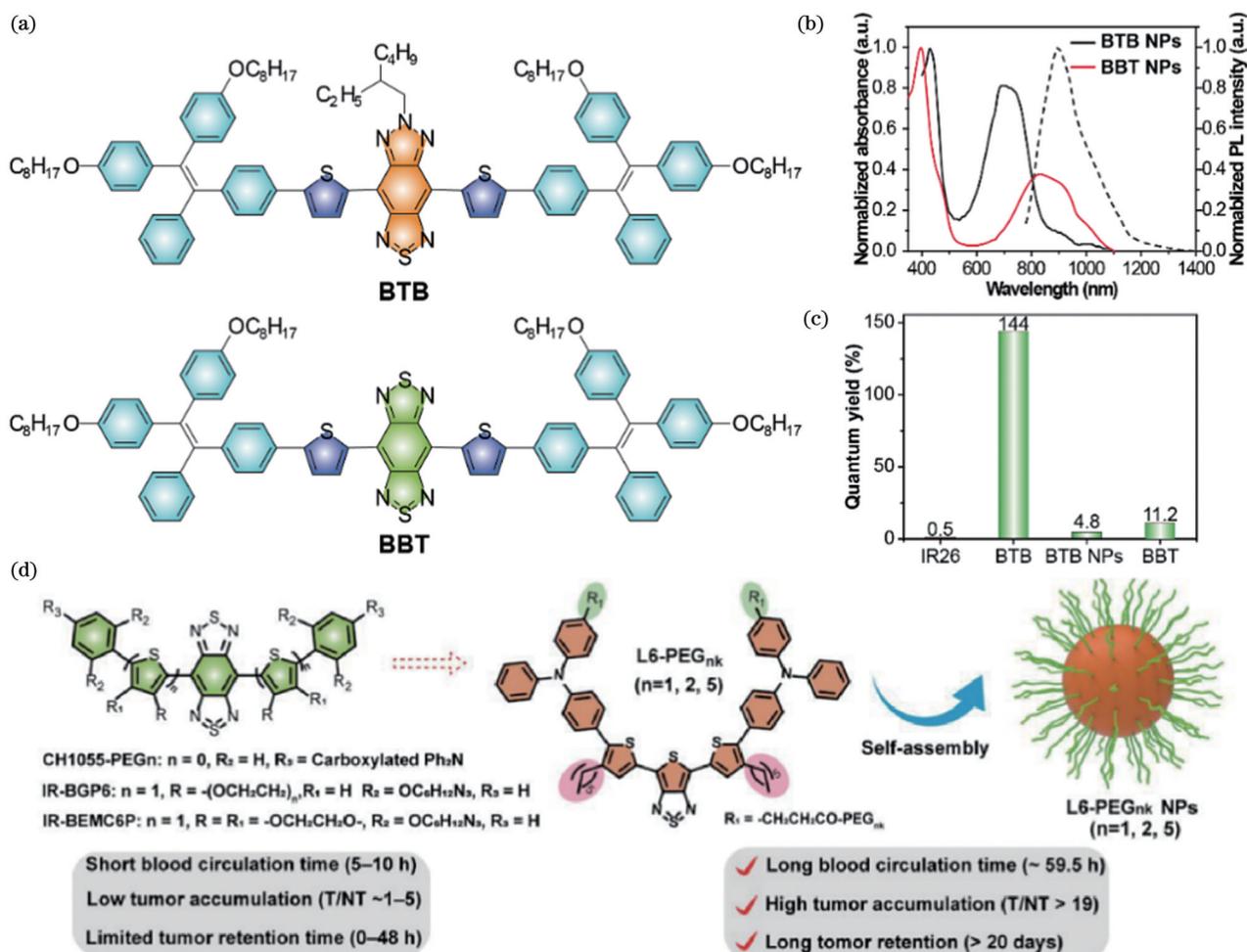


图 7 受体单元改变的代表性 NIR-II 荧光探针。(a) BTB 和 BBT 的化学结构式^[48]；(b) BTB NPs 和 BBT NPs 的吸收/发射光谱^[48]；(c) BTB 和 BBT 在甲苯溶液中的荧光量子产率, BTB NPs 在水溶液中的荧光量子产率^[48]；(d) 自组装 L6-PEG_{nk} 的设计示意图^[49]

Fig. 7 Representative NIR-II fluorescent probes with different acceptors. (a) Chemical structures of BTB and BBT^[48]；(b) absorption and emission spectra of BTB NPs and BBT NPs^[48]；(c) quantum yields of BTB and BBT in toluene, BTB NPs in water;^[48] (d) schematic illustration of the design of self-assembled L6-PEG_{nk} NPs^[49]

洪学传团队^[49]利用噻吩噻二唑(TTD)作为受体单元成功构建了新型NIR-II荧光分子L6,如图7(d)所示。与BBTD相比,TTD中氧原子、氮原子的数量相对较少,在一定程度上可以减少水分子在受体单元周围的聚集,进而可以在一定程度上抑制非辐射跃迁,提高荧光量子产率(2.5%)。探针L6-PEG_{2k}可以自组装成纳米胶束,该纳米胶束具有较高的荧光量子产率和优异的“隐形”性能,不易被网状内皮系统(RES)摄取,在体内表现出了较小的免疫原性、超长的血液循环时间(长达59.5 h)、超高的成像对比度(T/NT比值>19)以及超长的肿瘤滞留时间(>20 d),已被成功应用于手术导航切除皮下U87MG肿瘤和原位脑胶质瘤。

范曲立团队^[64]以噻吩(T)、三苯胺(TPA)、9,9-二辛基芴(F)为电子供体,以较强吸电子单元噻吩异靛蓝(TIIG)、6,7-双(4-己氧基苯基)-4,9-二(噻吩-2-基)-[1,2,5]噻二偶氮唑[3,4-g]喹恶啉(TTQ)为受体,构建了8种D-A-D构型的有机小分子。研究结果表明,以TTQ为受体单元合成的4种小分子(TTQ-Xs)虽然在吸收光谱上与以TIIG为受体单元合成的4种小分子(TIIG-Xs)相似,但它们的荧光光谱存在较

为明显的差异:TTQ-Xs的荧光强度明显强于TIIG-Xs,而TIIG-Xs几乎没有荧光。值得指出的是,TTQ-F在TTQ-X分子中表现突出,荧光量子产率最高,光稳定性好。为了实现NIR-II的生物成像应用,研究人员通过点击化学反应利用PEG_{5k}对TTQ-F进行修饰,赋予其水溶性,并实现了对小鼠血管、淋巴结、血管出血和胃肠道的体内NIR-II成像。

研发具有高稳定性和吸收/发射红移的新型电子受体,对于设计新一代D-A-D构型的有机小分子至关重要。如图8所示,陈浩团队^[90]设计、合成了一种新型的受体单元6,7-二噻吩基-[1,2,5]噻二唑[3,4-g]喹恶啉(TQT)。与BBTD相比,TQT具有更高的碱稳定性;与TQ相比,TQT具有更强的吸电子能力,更容易使荧光分子的发射光谱红移。此外,TQT还具有更高的耐碱性,能够更好地耐受严苛的合成条件,因而具有更大的结构修饰潜力。陈浩团队以BBTD、TQT为受体单元,配合不同类型的供体单元构建了一系列NIR-II有机小分子,并表征了它们的化学特性。实验数据表明,以TQT为受体单元的D-A-D构型有机小分子在活性氧/氮物质(ROS/RNS)、金属离子、活性

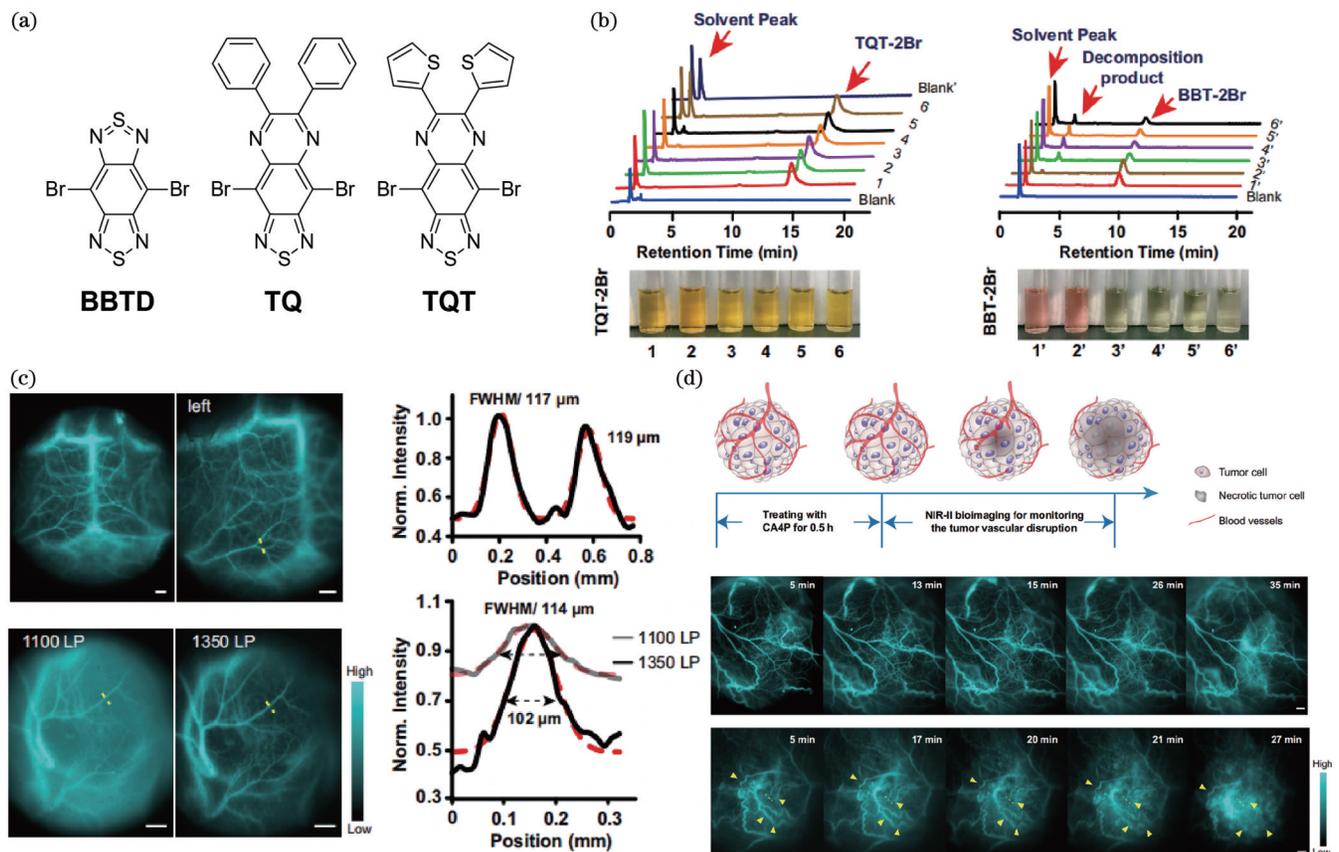


图8 不同受体单元的NIR-II染料的比较^[90]。(a) BBTD、TQ和TQT的化学结构式;(b) TQT和BBTD在不同酸碱度溶液中的高效液相色谱图,以及TQT和BBT在不同酸碱度甲醇(5%DMF, 1 mL)中的明场图;(c) FT-TQT用于大脑血管和肿瘤血管的NIR-II荧光成像;(d)实时监测康普瑞汀磷酸二钠(CA4P)化疗后肿瘤血管的阻断情况

Fig. 8 Comparison of different acceptor NIR-II dyes^[90]. (a) Chemical structures of BBTD, TQ and TQT; (b) HPLC chromatograms of TQT and BBT under various acid-base conditions, and bright-field images of TQT and BBT in MeOH (5% DMF, 1 mL) under various acid-base conditions; (c) *in vivo* NIR-II imaging for the vascular network of brain and tumor with FT-TQT; (d) real-time monitoring of the tumor vascular disruption after treatment with combretastatin A4 phosphate (CA4P)

生物分子以及各种碱性条件下表现出了超高稳定性。值得指出的是, FT-TQT 以其高光/化学稳定性、高度水溶性以及适宜的发射波长 ($\lambda_{\max}=1034\text{ nm}$) 被筛选用于血管成像及药效评估。

3.2 提高荧光量子产率

针对超高时空分辨率 NIR-II 荧光成像的前沿需求, 设计出具有高荧光强度、高光稳定性的荧光染料是近年来染料化学的研究热点。单键或双键周围的分子内运动导致的非辐射弛豫导致荧光量子产率随着波长的增加而降低, 特别是处于低能带隙的 D-A-D 小分子。因此, 设计具有高荧光量子产率的长波长 D-A-D 小分子仍然具有挑战性。目前, 用于提高 D-A-D 小分子荧光量子产率的办法主要有以下 4 种: a) 引入屏蔽单元; b) 抑制扭转分子内电荷转移 (TICT) 态; c) 构建疏水非极性环境; d) 构建具有聚集诱导发光 (AIE) 特性的荧光小分子。

3.2.1 引入屏蔽单元

为了提高 NIR-II 荧光分子在水中的荧光量子产率, 梁永晔团队^[44]将屏蔽单元 (S)、供体单元 (D)、受体单元 (A) 进行排列组合, 并通过分子工程手段对各个单元进行性能优化, 设计出了一系列具有 S-D-A-D-S 构型的高效能 NIR-II 荧光分子, 如图 9(a) 所示。研究表明, 分子骨架中给体单元的空间位阻效应不仅能使分子扭曲, 还能使分子表面的静电电位分布及亲疏水性发生变化, 从而可有效保护受体单元 BBTD, 阻止其与溶剂分子或其他分子发生相互作用。与此同时, 屏蔽单元还对整个分子骨架具有保护作用。这些因素可以大大减弱水分子与荧光团分子之间的相互作用, 有利于荧光团激发态在水相环境中的稳定性, 从而增加辐射跃迁概率, 增强 S-D-A-D-S 型荧光团在水相环境中的荧光量子产率^[45]。

3.2.2 抑制 TICT 态

TICT 是一种在 D-A-D 小分子中常见的光物理现象。在此过程中, 分子的给体或者受体单元逐渐扭转至垂直构型, 使电荷完全分离。该过程会淬灭荧光并大幅降低染料的光稳定性。有效抑制 TICT 的发生能够显著提高荧光基团的荧光强度和光稳定性。如图 9(b) 所示, 洪学传团队^[50]将荧光分子 Q8P 中的 N,N-二烷基氨基取代基转化为季铵盐得到了荧光分子 Q8PNap, 通过强制平面化和限制分子旋转有效抑制了 Q8PNap 中的 TICT。尽管质子化过程使 Q8PNap 蓝移了 150 nm, 但其荧光量子产率得到了大幅提升 (约 10 倍)。

3.2.3 构建疏水非极性环境

D-A-D 小分子与极性水分子的强相互作用导致的非辐射跃迁使得大多数 D-A-D 小分子在水溶液中的荧光量子产率较低 (约为 0.3%~2%)。通过超分子相互作用将具有亲水基团的荧光分子与蛋白或者血清形成稳定的复合物是提高探针亮度的一种有效

手段。形成的荧光分子——蛋白/血清的稳定复合物通常比普通荧光小分子更亮, 因为荧光分子的分子内旋转受到限制, 荧光分子与水溶液之间的分子间相互作用减小, 如图 9(c)、(d) 所示。基于上述策略, 戴宏杰团队^[40]在 CH1055 侧链中引入 4 个磺酸根官能团 (CH-4T), 并将其与血浆蛋白复合, 将荧光量子产率由 0.3% 提高至 11% (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考), 实现了帧速率高达 50 frame/s 的活体血管成像。随后, 这种将 NIR-II 荧光分子与蛋白复合提高荧光量子产率的策略被用于很多分子, 如 H2a-T^[91]、8PNap/FBS^[92]。

此后, 该团队^[60]使用两性亲水包覆材料 (PS-g-PEG) 为荧光分子构建出了类似甲苯的非极性环境, 制备了一种荧光量子产率高达 16.5% (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考) 的纳米荧光探针 (p-FE), 如图 9(e) 所示。p-FE 的最大吸收峰位于 774 nm, 最大荧光峰位于 1010 nm, 其在水中的光谱与有机分子 FE 在甲苯溶液中的光谱相差无几, 这表明 PS-g-PEG 确实为荧光分子创造了一种类似甲苯的非极性环境。利用 p-FE 荧光探针可以实现对小鼠大脑血管的低曝光 (2 ms)、无创、超高速 NIR-II 活体荧光成像。p-FE 的血液循环半衰期约为 16 h, 这将有利于 p-FE 通过 EPR 效应在肿瘤组织中聚集从而实现高信噪比的肿瘤成像 (信噪比可达 12)。

3.2.4 具有 AIE 特性的分子设计

由于强 π - π 堆积相互作用, 传统的 D-A-D 小分子均具有聚集诱导荧光淬灭 (ACQ) 的特性。当用两性亲水包覆材料将其包覆, 形成局部浓度较高的纳米颗粒时, 纳米粒子的荧光量子产率将急剧降低。唐本忠院士团队研发的 AIE 材料刚好克服了这一缺点, 该材料在高浓度和聚集状态时分子发光效率急剧增大^[93-94]。

目前, 构建具有 AIE 特性的 NIR-II 荧光探针的策略主要是在强吸电子的受体单元两侧引入具有 AIE 特性的功能基团, 通过多个 AIE 功能基团调控荧光探针的聚集态性质^[55, 95-96]。刘斌团队^[51, 97]率先以 BBTD 作为受体单元, 以具有 AIE 特性的 N,N-二苯基 1-4-(1, 2, 2-溴三苯乙炔) 苯胺作为给体单元, 制备了荧光量子产率高达 6.2% 的具有 AIE 性质的 NIR-II 荧光探针 TB1, 并利用该探针实现了对小鼠原位脑胶质瘤的 NIR-II 荧光成像, 成像分辨为 38 μm , 信噪比可达 4.4。此后, 唐本忠院士团队^[54, 56, 98-100]、洪学传团队以及刘杰团队^[58, 101]也报道了以苯并双噻二唑为电子受体制备的具有 AIE 性质的 NIR-II 荧光探针, 如图 10 所示。其中, 刘杰团队报道的纳米探针 (L1057 NP) 的荧光光谱可延至 1400 nm, 荧光量子产率可达到 9.9%^[52] (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考)。范曲立团队^[59]基于受体单元 6, 7-二苯基-[1, 2, 5]噻二唑洛 [3, 4-g] 喹啉设计、合成了一系列具有 AIE 特性的 NIR-II 有

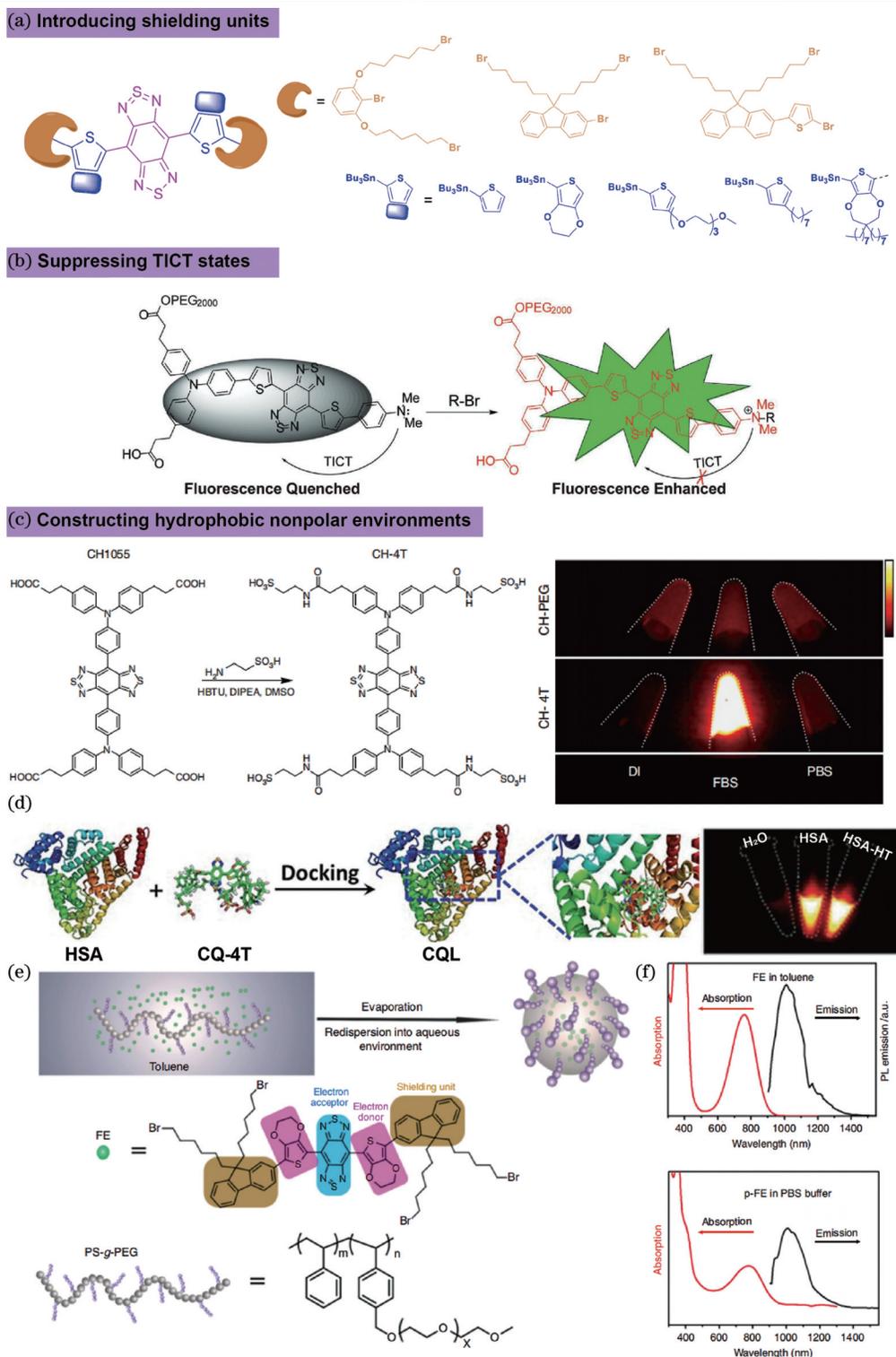


图9 提高荧光量子产率的策略。(a) S-D-A-D-S构型的NIR-II荧光分子设计示意图^[44]；(b)抑制TICT^[50]；(c)CH-4T的化学结构式,以及CH-PEG、CH-4T在去离子水、FBS、PBS中的荧光照片^[40]；(d)构建CQL的示意图,以及CQ-4T在水溶液、HSA、加热HAS溶液中的荧光照片^[40]；(e)构建p-FE纳米粒子示意图,荧光分子FE和两性亲材料PS-g-PEG的分子式^[60]；(f)荧光分子FE在甲苯溶液中的吸收/发射光谱(在808 nm激光激发下)以及纳米粒子p-FE在PBS溶液中的吸收/发射光谱(在808 nm激光激发下)^[60]

Fig. 9 Strategies to increase QY. (a) Schematic illustration of the design of S-D-A-D-S type NIR-II fluorophores^[44]; (b) suppressing the twisted intramolecular charge transfer of fluorophore^[50]; (c) chemical structures of CH-4T, and fluorescence photos of CH-PEG or CH-4T in DI water, FBS, and PBS buffer^[40]; (d) schematic of constructing CQL, and fluorescence photo of CQ-4T in water, HSA, and HSA-HT; (e) scheme of constructing nanoparticle p-FE and chemical structures of FE and the PS-g-PEG polymer^[60]; (f) absorption and emission spectra (excited by an 808 nm laser) of FE in toluene, and absorption and emission spectra (excited by an 808 nm laser) of p-FE in PBS buffer^[60]

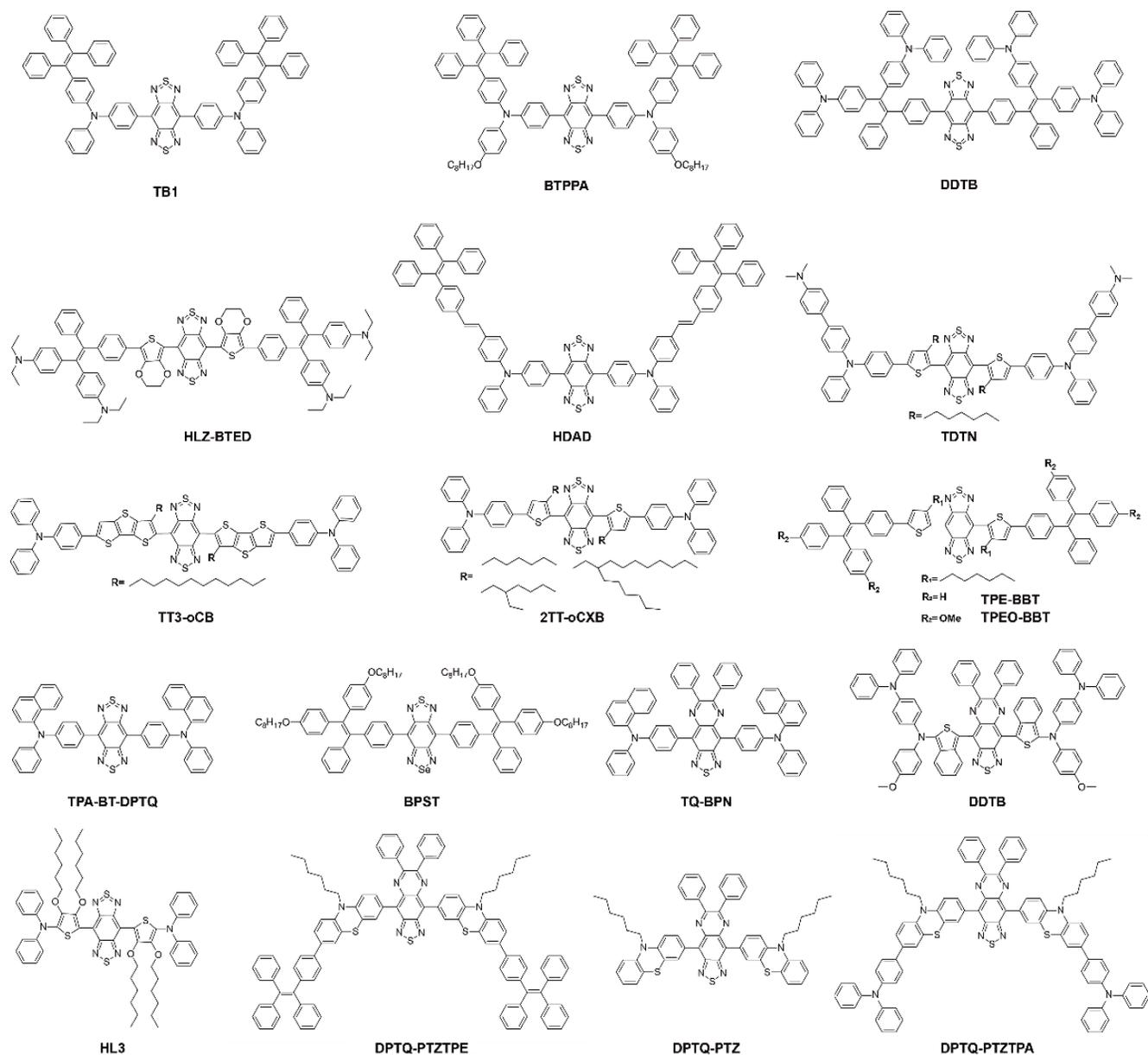


图 10 具有 AIE 特性的 NIR-II 荧光分子的化学结构式

Fig. 10 Chemical structures of NIR-II AIEgens

机小分子 (DPTQ-PTZ、DPTQ-PTZTPE 和 DPTQ-PTZTPA)。他们通过纳米沉淀法,利用 F127 将上述三种有机小分子制备成胶束,三种胶束的荧光量子产率分别为 0.16%、0.22%、0.29% (以 QYIR820 的荧光量子产率 4.2% 作为参考)。将其应用于肿瘤成像,结果显示,给药后 72 h,肿瘤组织相比正常组织的信噪比为 4.2,这一结果说明这三种具有 AIE 特性的 NIR-II 有机小分子在肿瘤成像领域具有广阔的应用前景。

与 NIR-IIa 区域 (1300~1400 nm) 相比, NIR-IIb 区域 (1500~1700 nm) 具有更低的组织自发荧光和更低的光散射,因此被称为活体成像的黄金区域。目前,应用于 NIR-IIb 成像的荧光探针主要以无机纳米 (稀土元素) 颗粒为主,但生物相容性更好、更容易实现临床转化的有机探针还鲜有报道^[6,80],这主要是因为有机荧

光探针在 NIR-IIb 区域的荧光亮度太低,难以达到活体成像的要求。针对上述问题,唐本忠院士团队通过分子工程手段将不同平面程度的单元加入到具有扭曲结构且具有 AIE 特性的 NIR-II 荧光分子中。荧光分子的 AIE 特性可以用来保证较高的荧光量子产率,而加入的平面结构单元不仅可以使探针的吸收/发射发生红移,还可以提升其摩尔吸光系数进而提升亮度,如图 11(a)、(b) 所示^[53]。此后,该团队又通过在分子层次上调控 TICT 效应以及在形态层次调控 AIE 性质,成功合成了既具有长发射波长 (1000~1600 nm) 又具有较高荧光量子产率 (11.5%) 的 NIR-IIb 荧光探针 (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考),并基于该探针实现了血管和肠道、脏器的高分辨成像,如图 11(c)、(d) 所示^[54]。

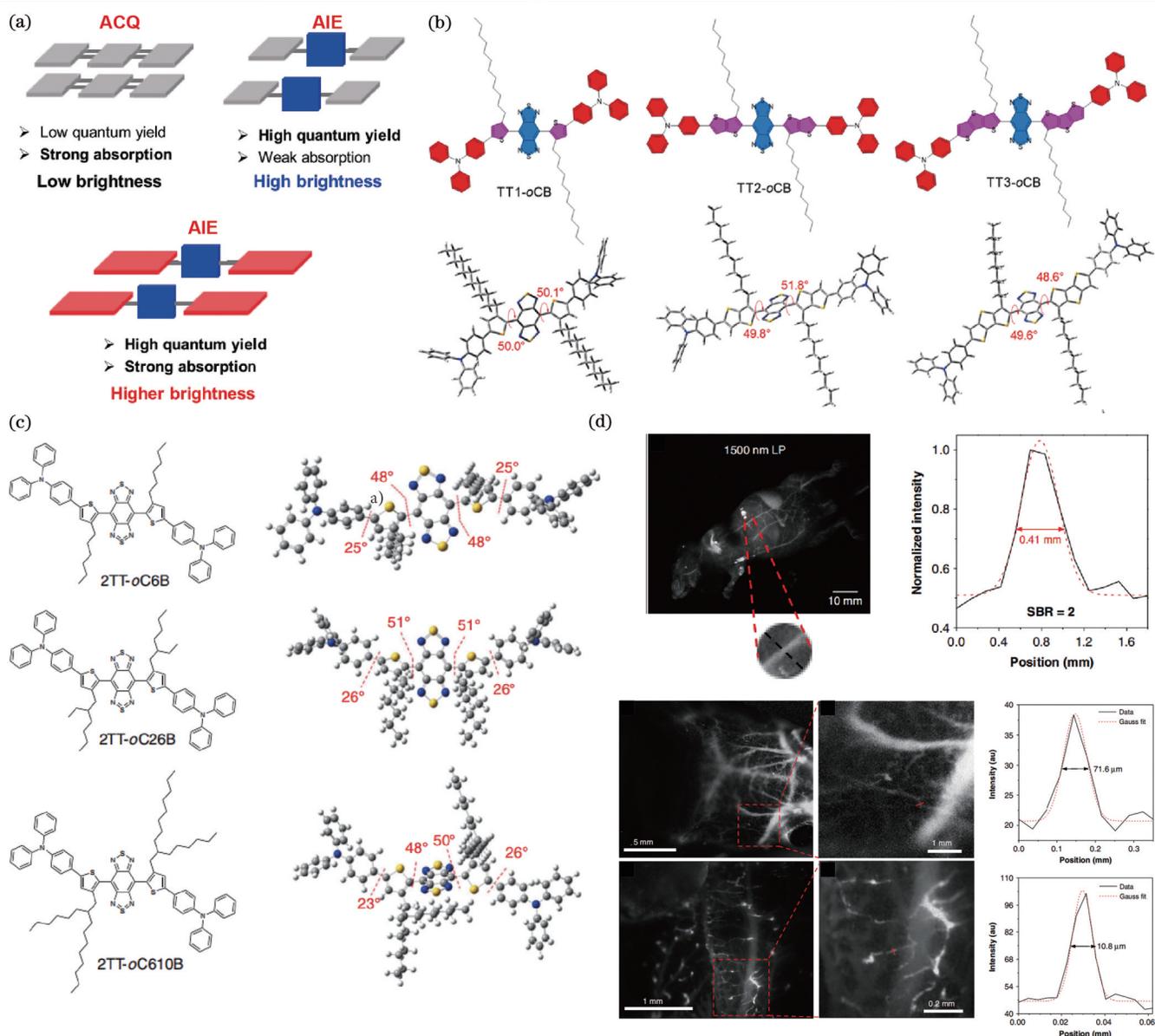


图 11 具有 AIE 特性的代表性小分子。(a) AIE 分子设计示意图^[53]；(b) TT1-oCB、TT2-oCB、TT3-oCB 的分子结构式以及优化的 S_0 态几何图^[53]；(c) 2TT-oC6B、2TT-oC26B、2TT-oC610B 的分子结构式以及优化的 S_0 态几何图^[54]；(d) 活体小鼠的 NIR-II 血管荧光成像^[54]

Fig. 11 Representative small molecules with AIE properties. (a) Schematic illustration for AIE molecular design^[53]; (b) chemical structures and optimized ground state (S_0) geometries of TT1-oCB, TT2-oCB, and TT3-oCB^[53]; (c) chemical structures and optimized ground state (S_0) geometries of 2TT-oC6B, 2TT-oC26B, and 2TT-oC610B; (d) NIR-II fluorescence imaging of vasculature in living mice^[54]

4 有机共轭聚合物

根据荧光亮度公式 $I_{\text{PL}} = \Phi_{\text{PL}} I_0 (1 - 10^{-A})$, 荧光亮度 (I_{PL}) 由荧光量子产率 (Φ_{PL}) 和吸光度 (A) 共同决定^[67]。D-A-D 有机小分子虽然可以通过分子工程技术实现吸收/发射在可见光区至 NIR-II 范围内的调控, 但是该类分子的摩尔吸光系数较低, 导致有效 NIR-II 亮度不高, 不利于其在低激发功率密度激发下深组织穿透成像上的应用^[102]。以 D-A 结构为分子主链的共轭聚合物是一种新型的 NIR-II 荧光材料, 该材料兼具良好的光稳定性和生物相容性。值得指出

的是, 该类荧光探针可以通过增加重复结构单元的数量来提升分子探针的吸光系数进而提升探针的整体亮度^[103-104]。

2014 年, 戴宏杰教授课题组^[61]通过 Stille 反应构建了系列聚合物 (pDA-1、pDA-2、pDA-3、pDA-4)。其中, pDA-1 的分子质量约为 16 kDa (1 Da = 1 u), 荧光量子产率为 1.7%。为了提高聚合物的生物相容性, 他们通过纳米沉淀法将其制备成大小均一、能够在水中均匀分布的纳米颗粒 pDA-PEG, 如图 12(a)~(c) 所示。如图 12(d) 所示, pDA-PEG 的最大吸收峰和最大发射峰分别为 654 nm 和 1047 nm。值得指出的是, 其

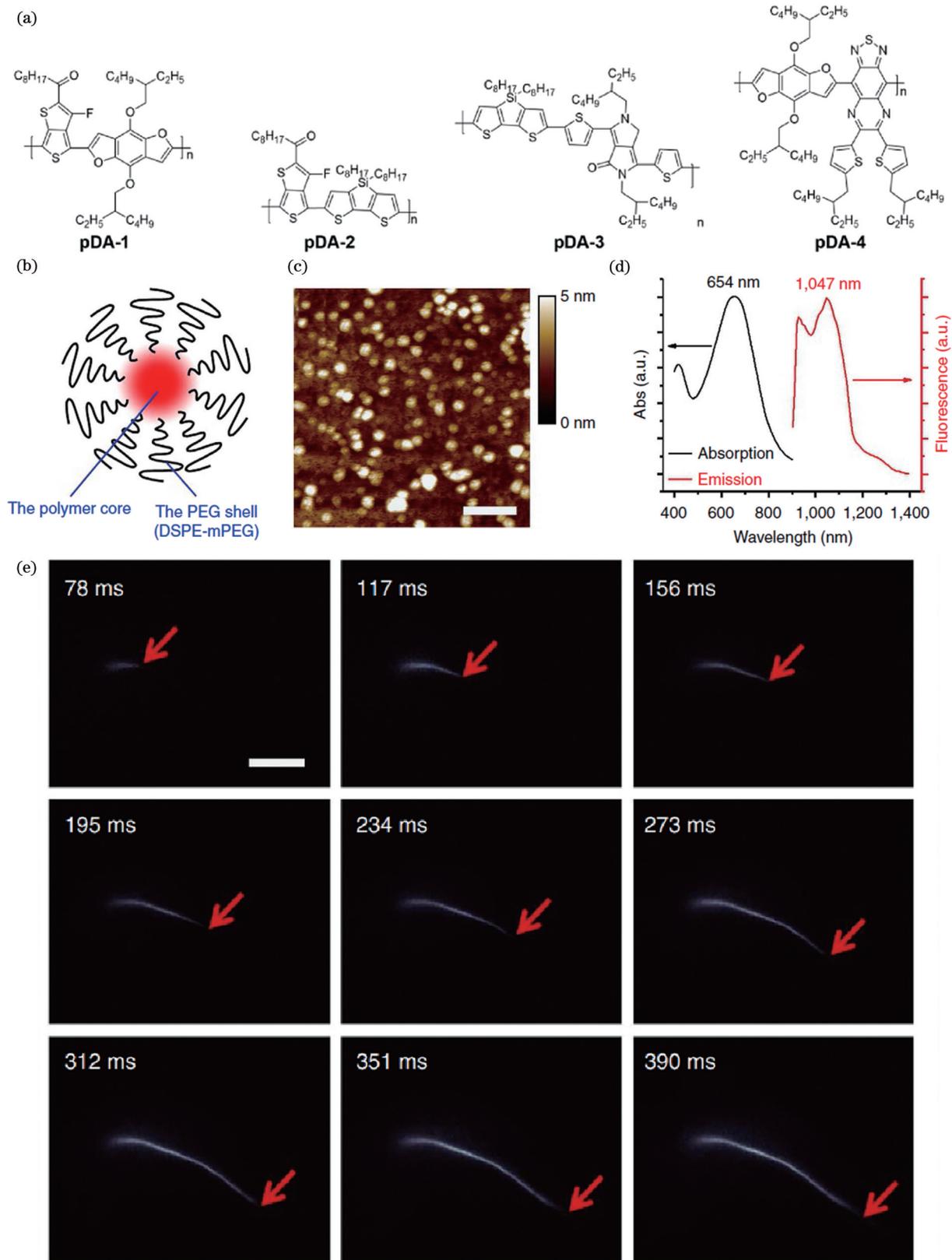


图 12 首个应用于 NIR-II 活体成像的聚合物探针^[61]。(a) pDA-1、pDA-2、pDA-3、pDA-4 的化学结构式；(b) 纳米粒子 pDA-PEG 的结构示意图，包括具有疏水性的聚合物内核和具有亲水性的 PEG 外壳；(c) 纳米粒子 pDA-PEG 的 AFM 表征；(d) 纳米粒子 pDA-PEG 的吸收/发射光谱；(e) 动脉血流的超快 NIR-II 荧光成像

Fig. 12 The first polymer was applied to NIR-II *in vivo* imaging^[61]. (a) Chemical structures of pDA-1, pDA-2, pDA-3 and pDA-4; (b) a schematic of the pDA-PEG nanoparticle showing a hydrophobic polymer core and a hydrophilic PEG shell; (c) a typical AFM image of pDA-PEG nanoparticles deposited on a silicon substrate; (d) absorption and emission spectra of pDA-PEG; (e) ultrafast NIR-II imaging of arterial blood flow

吸收、发射波长具有可调性,通过改变聚合物的受体单元,共轭聚合物最大发射峰位置能够从 1050 nm 红移至 1348 nm。随后,他们将 pDA-PEG 用于活体血管的 NIR-II 荧光成像,与 NIR-I 相比,其可在超低曝光时间下 (20 ms VS 100 ms) 观察到直径小于 10 μm 的毛细血管,并且空间分辨率远高于可见光和 NIR-I 荧光成像。同时,他们利用 pDA-PEG 动态实时跟踪监测了小鼠后肢动脉血流 (25.6 frame/s VS 5.3 frame/s),计算出小鼠下肢血流速度约为 4.36 cm/s,与临床使用的超声成像测得的结果相符 (4~7 cm/s)。这是首次利用有机共轭聚合物作为 NIR-II 荧光探针的研究报道,

如图 12(e) 所示。

2017 年,范曲立团队基于吡咯并吡咯二酮 (DPP) 设计了一种用于 NIR-II 荧光成像的共轭聚合物 PDF-T1032,其最大吸收波长为 832 nm,最大发射波长可至 1032 nm,具有良好的生物相容性及光稳定性。他们借助 NIR-II 活体荧光成像技术,成功地将 PDF-T1032 应用于前哨淋巴结活体检测及肿瘤显影。此后,该团队^[66,105-106]、刘斌团队^[62,107]等又设计合成了一批用于 NIR-II 荧光成像的新型聚合物探针,其荧光光谱可延至 1400 nm,荧光量子产率可达到 1.5%,如图 13 所示^[65,108-111]。

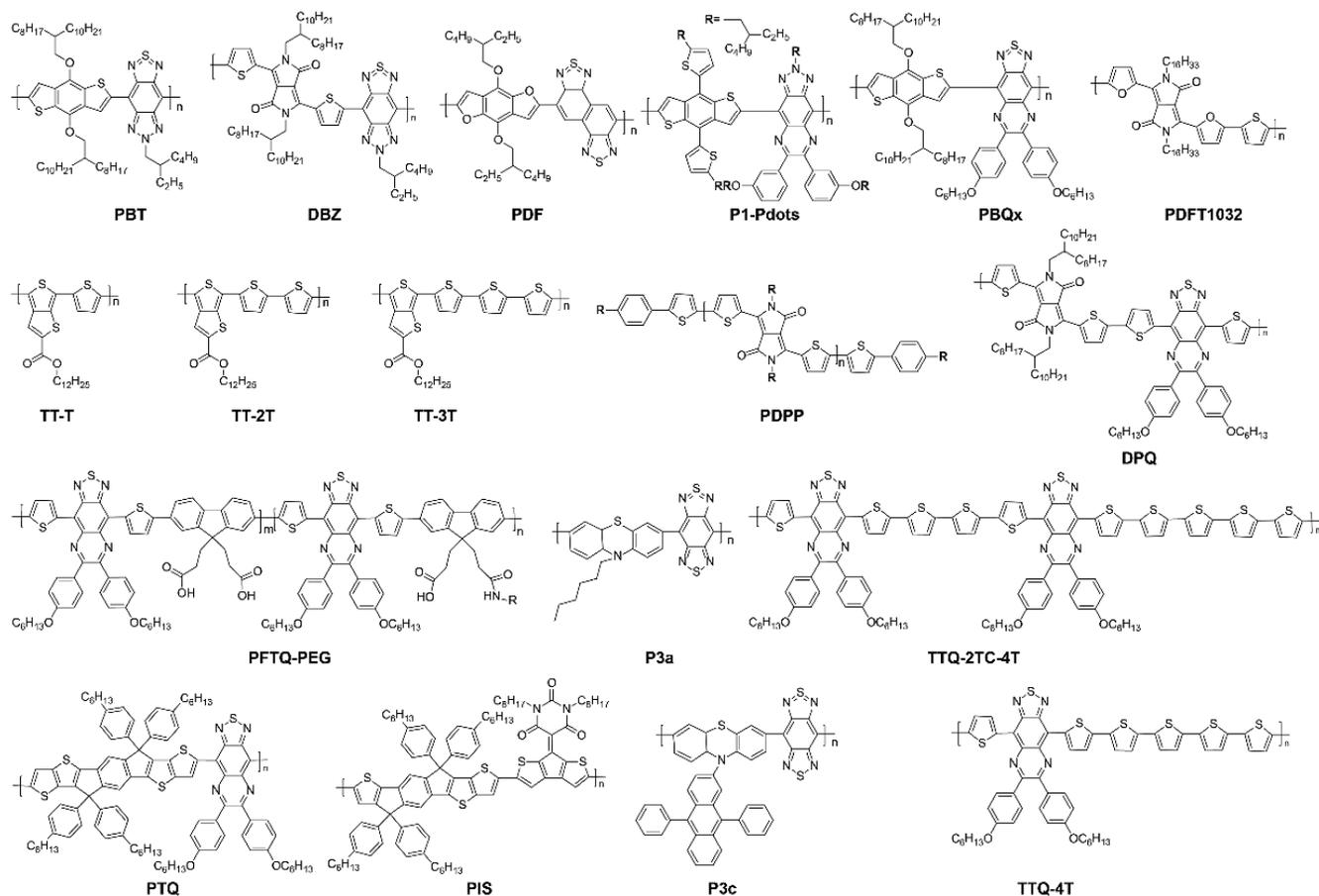


图 13 有机共轭聚合物的化学结构式

Fig. 13 Chemical structures of organic conjugated polymers

共轭聚合物在有机溶液中溶解性差的不足极大地限制了它的生物应用。范曲立团队^[112]设计、开发了一类共轭/非共轭交替共聚物 (CNACPs)。此类 CNACPs 是受体单体苯并双噻二唑 (BBTD) 或 [1,2,5] 噻二唑并 [3,4-G] 喹啉 (TTQ) 与柔性烷基链 (噻吩-2-基) 己烷 (C6) 或 (噻吩-2-基) 癸烷 (C10) 通过 Stille 缩聚合成的,其中 C6 和 C10 是非共轭单体。与 D-A-D 有机小分子相比, CNACPs 可显示出红移 NIR-II 吸收;与传统的有机共轭聚合物相比, CNACPs 可显示出更亮的 NIR-II 荧光成像 (比 BBTD-C10 和 TTQ-C10 聚合物的荧光强度分别增强了 4.1 倍和 2.9 倍)。

提高共轭聚合物的荧光量子产率是保证高信噪比

(SNR) 荧光成像的重要条件。吴长峰团队^[63]通过改变受体单元侧链基团的结构和位置,设计、合成了两个系列的共轭聚合物,并通过氟化作用增强了该系列聚合物的荧光量子产率。其中,经四氟化反应处理得到的聚合物的荧光量子产率提升至 3.2%,其亮度是未经过氟化反应的聚合物的 3 倍,如图 14(a) 所示。这主要是因为氟原子的强疏水性使氟取代的聚合物处于一个更疏水的环境中,减少了聚合物在弯曲折叠过程中因与水发生相互作用而导致的荧光淬灭。同时,通过密度泛函理论 (DFT) 计算发现,氟化作用能够减小分子激发态与基态的结构变化程度,从而减少非辐射跃迁,使荧光量子产率提高。此后,该团队通过活体成像实

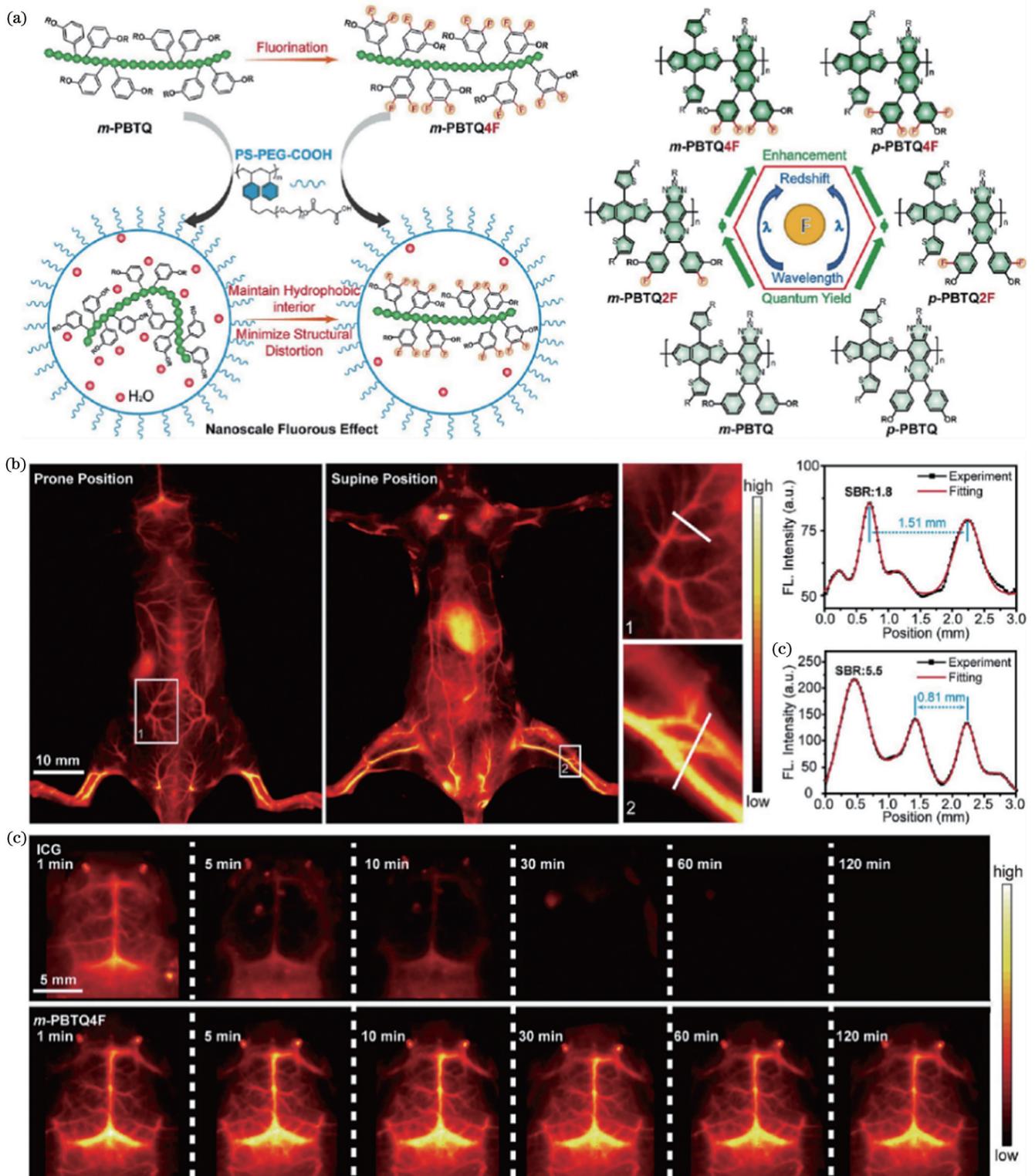


图 14 氟化策略提升荧光量子产率^[63]。(a)保持聚合物内部疏水和最小化结构畸变的纳米级氟效应示意图(氟化使聚合物光谱红移,荧光量子产率提高);(b)C57BL/6小鼠尾静脉注射 100 mL *m*-PBTQ4F (200 μ g/mL)后进行俯卧位和仰卧位 NIR-II 全身荧光成像的结果;(c)C57BL/6小鼠注射 100 mL ICG 或 *m*-PBTQ4F (200 μ g/mL)后 1~120 min (70 mW/cm², 808 nm 激光, 1319 nm LP)进行脑血管 NIR-II 荧光成像的结果

Fig. 14 Fluorination strategy to improve QY^[63]. (a) Schematic illustration of nanoscale fluorous effect to maintain hydrophobic interior and minimize structure distortion of the Pdots (the fluorination redshifts the optical spectra and enhances the fluorescence QY); (b) *in vivo* NIR-II whole-body fluorescence imaging of C57BL/6 mice in prone and supine positions after tail-vein injection of 100 mL *m*-PBTQ4F Pdots (200 μ g/mL); (c) *in vivo* NIR-II fluorescence imaging of cerebral vasculature of C57BL/6 mice injected with 100 mL ICG or *m*-PBTQ4F Pdots (200 μ g/mL) at certain time intervals from 1 to 120 min (70 mW/cm², 808 nm laser, 1319 nm LP filter)

验证了所制备的氟取代聚合物的 NIR-II 荧光成像能力 [如图 14(b)、(c) 所示], 同时成功实现了对活鼠的脑血管成像, 并定量分析了转基因脑瘤的血管形态, 包括血管长度、血管分支和血管对称性等。该工作表明氟化是构建明亮 NIR-II 聚合物探针的一种有效策略^[113-114]。

受热激活延迟荧光 (TADF) 材料具有独特的结构和光学性质。TADF 材料具有高度扭曲的结构, 将其引入到聚合物中可以有效改善因聚集诱导淬灭而导致的荧光亮度不高的现象, 同时 TADF 单元与聚合物链中其他单元的相互作用可能会促使聚合物的发射波长进一步红移。Chan 团队^[115]制备了 4 种类型的 TADF 单体, 并通过 Stille 聚合反应将其与其他供体/受体单元共聚。研究结果显示, 与不含 TADF 单元的对照聚合物相比, 含有 TADF 的聚合物表现出不同程度的红移和荧光强度增加。但并非所有聚合物都能观察到延迟荧光, 这表明荧光量子产率的增加并非归因于延迟荧光。通过理论计算发现, 含有 TADF 集团的聚合物波长红移和量子产率增加实际上是由链间聚集结构 (包括 *J*-聚集体和扭曲的 *H*-聚集体结构) 改变导致的。为了证明它们的体内生物成像能力, Chan 团队进行了全身血管成像和 3D 骨成像。该工作表明了 TADF 单元能够有效提升聚合物探针的亮度, 并为未来高亮度 NIR-II 聚合物的分子设计开辟了一条新途径。

为赋予共轭聚合物 NIR-II 发光的能力, 一般都将其设计成具有刚性的平面结构。共轭聚合物在溶液状态下具有优异的吸收/发射性质, 但当其处于聚集态时 (如纳米颗粒), 由于平面结构分子间强 π - π 相互作用, 荧光会显著淬灭, 即聚集导致淬灭 (ACQ) 现象^[116]。为了解决由 ACQ 效应导致的荧光量子产率低的问题, 吴长峰团队^[68]设计了一系列聚合物, 并提出可用两种荧光增强机制来提高共轭聚合物的荧光量子产率。首先, 基于吩噻嗪的 AIE 特性来减少聚合物在凝聚态的非辐射衰减途径; 其次, 通过不同水平的空间位阻使荧光淬灭最小化, 以进一步增强荧光。制备的聚合物在水溶液中的荧光量子产率约为 1.7%, 与原始聚合物在四氢呋喃 (THF) 溶液中的荧光量子产率相比增强了约 21 倍, 如图 15(a) 所示。如图 5(b) 所示, Chan 团队^[70]通过在聚合物结构上引入抗 ACQ 基团和 AIE 基团设计、制备了三种聚合物 IR-Pttc、IR-TPA、IR-TPE, 并通过纳米沉淀法将其分别制备成了聚合物点 (Pdots)。研究结果表明, IR-Pttc Pdots、IR-TPA Pdots 和 IR-TPE Pdots 的荧光量子产率分别为 4.9%、6.7% 和 14% (以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考)。基于 IR-TPE Pdots 的高荧光量子产率, 该团队使用 IR-TPE Pdots 对小鼠进行了体内无创血管结构荧光成像和长期肿瘤监测, 并通过绘制不同旋转角度的全身荧光图像, 构建了深部组织的三维肿瘤模型。

唐本忠团队提出了改善共轭聚合物亮度的“结构

平面扭曲化”分子设计策略, 并将平面聚合物的平面单元与 AIE 聚合物的扭曲单元相结合, 制备出了一种新型聚合物——平面扭曲聚合物。该类聚合物既具有平面聚合物高摩尔吸光系数的优点, 又具有 AIE 聚合物高荧光量子产率的特性。该团队巧妙地利用烷基链位置不同产生的位阻效应不同设计出了三种聚合物, 如图 15(c)、(d) 所示^[69]。聚合物 pNIR-1 具有平面结构 (二面角接近 0°), 为典型的 ACQ 分子, 具有较高的摩尔消光系数 ($\epsilon = 7.17 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ @ 870 nm), 但荧光量子产率接近 0, 因此 pNIR-1 的有效亮度几乎为 0。聚合物 pNIR-2 具有扭曲结构, 为典型的 AIE 分子, 具有较高的荧光量子产率 (3.2%), 但其摩尔吸光系数较低 ($3.26 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 有效亮度为 104。聚合物 pNIR-3 为平面扭曲聚合物, 具有 AIE 特性, 这说明在聚集态下该扭曲结构可以有效抑制分子间 π - π 相互作用。聚合物 pNIR-3 既具有高的荧光量子产率 (2.24%), 又具有高的摩尔吸光系数 ($5.73 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 从而可以达到较高的有效亮度 (128)。有效亮度的提高证明了该设计策略的可行性。由于聚合物 pNIR-3 的发射波长在 1300 nm 以上, 属于 NIR-IIa 范围 (1300~1400 nm), 因此他们进行了 NIR-IIa 小鼠活体荧光成像, 以及 NIR-IIa 荧光指导的精准手术导航, 如图 15(e) 所示。

NIR-II 荧光探针在近红外区通常具有一定的吸收, 因此可作为诊疗试剂同时用于 NIR-II 荧光成像和光热治疗^[117]。刘杰团队^[67]开发了一种新型的共轭聚合物纳米探针 (L1057 NPs) 并将其作为诊疗试剂。与文献中常采用强缺电子单元 (如苯并双噻二唑, BBTD) 作为受体单元来设计 NIR-II 共轭聚合物的策略不同, 该工作利用共轭聚合物共轭长度大的优势, 只采用缺电子能力较弱的单元作为受体即可实现吸收和发射的红移。L1057 NPs 在 980 nm 处的消光系数为 $18 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; 同时, 其绝大部分发射光谱均在 NIR-II (发射峰值为 1057 nm), 且在 NIR-II 范围内具有较高的荧光量子产率 (1.25%, 以 IR26 的荧光量子产率 0.5% 为参考)。由于具有较高的 NIR-II 亮度, L1057 NPs 在较低的激光功率密度 (25 mW/cm^2) 下即可实现 NIR-II 荧光成像; 同时, L1057 NPs 在 980 nm 处较高的最大允许曝光量 (MPE) 和优异的光热转换效率, 使其可在更安全的激光功率密度 (720 mW/cm^2) 下进行肿瘤光热治疗, 如图 16(a)~(c) 所示。此后, 该团队通过增加聚合物的重复单位数, 实现了共轭聚合物荧光亮度和光热性能的同时提升^[64]。他们基于受体单元 TTQ 构建了具有不同重复结构单元的聚合物, 并通过纳米沉淀法将其包被成能够在水溶液中稳定存在的纳米粒子 PBQ_x NPs ($x=3, 5, 8, 11, 45$), 如图 16(d)、(e) 所示。研究结果表明, PBQ45 NPs 的荧光亮度不仅比 PBQ5 NPs 高 5 倍, 而且其光热性能是 PBQ3 NPs 的 6.7 倍。

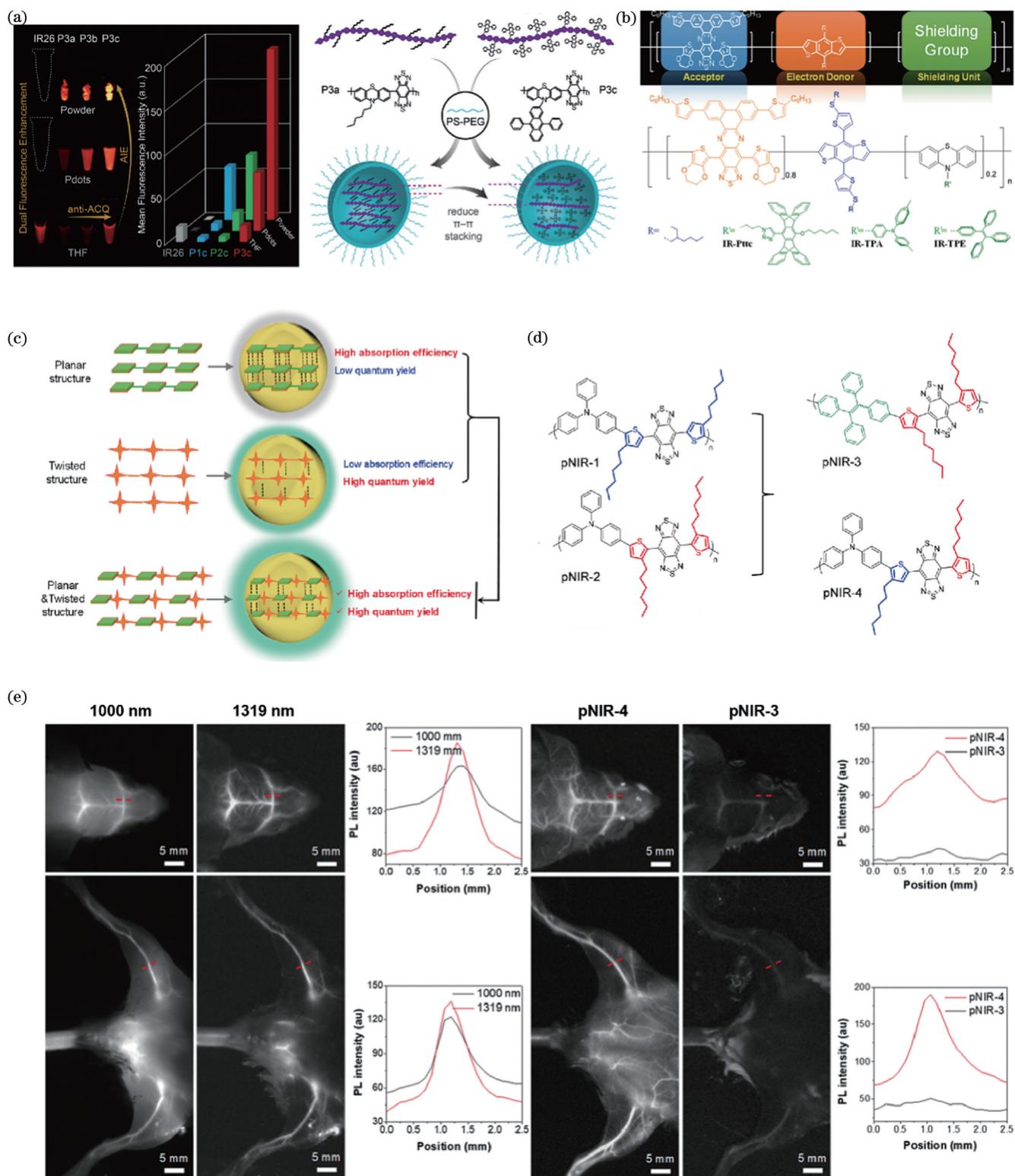


图 15 具有 AIE 特性的代表性聚合物。(a) 不同状态下 IR26 和聚合物的荧光图像 (左图), 聚合物点制备流程示意图 (右图)^[68]; (b) 三种聚合物的分子设计示意图^[70]; (c) 高亮度 SPN 的分子设计原理示意图^[69]; (d) pNIR-1、pNIR-2、pNIR-3、pNIR-4 的化学结构式^[69]; (e) 不同波长滤光片下大脑血管和后肢血管的 NIR-II 荧光成像 (左图), 基于 pNIR-4 和 pNIR-3 的 NIR-IIa 荧光成像质量对比 (右图)^[69]

Fig. 15 Representative polymers with AIE properties. (a) Fluorescence images of IR26 and Pdots in different states (left), illustration of the formation of Pdots (right)^[68]; (b) molecular design of three semiconducting polymers^[70]; (c) schematic illustration of the molecular design philosophy of highly bright SPN^[69]; (d) chemical structures of pNIR-1, pNIR-2, pNIR-3 and pNIR-4^[69]; (e) NIR-II fluorescent imaging of blood vessels in the cerebral cortex and hindlimb under different LP filters (left), comparison of NIR-IIa fluorescent imaging quality between pNIR-4 and pNIR-3 nanoparticles (right)^[69]

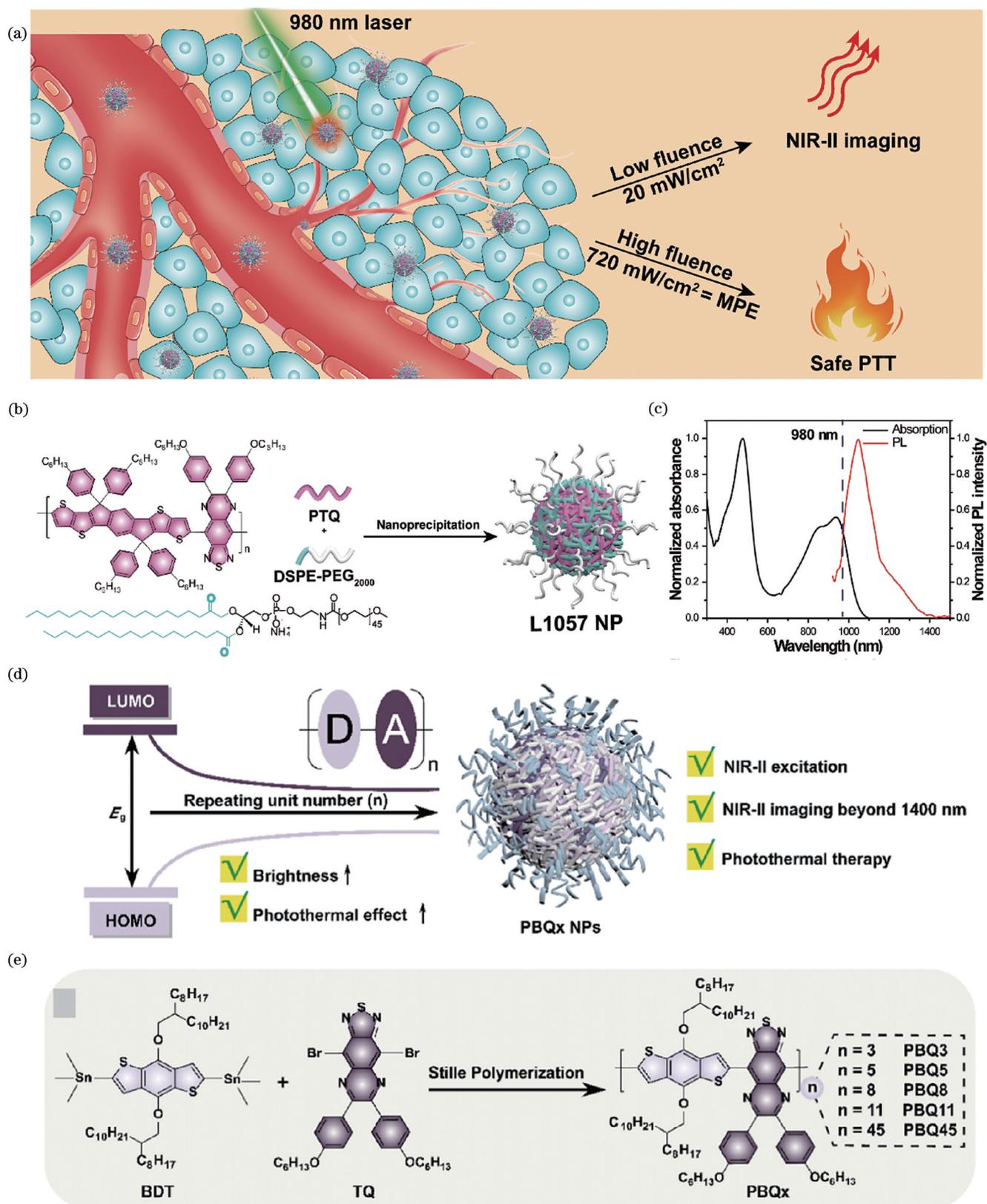


图 16 用于诊疗一体化的代表性聚合物。(a) L1057 NPs 作为治疗药物的示意图^[67]；(b) PTQ 和 DSPE-PEG₂₀₀₀ 的化学结构式以及 L1057 NPs 制备示意图^[67]；(c) L1057 NPs 在水溶液中的归一化吸收和发射光谱^[67]；(d) 重复结构单元数量对聚合物诊疗探针光疗性能影响的示意图^[64]；(e) PBQ_x 的合成路径^[64]

Fig. 16 Representative polymers for the integration of diagnosis and treatment. (a) Schematic illustration of L1057 NPs as a theranostic agent^[67]；(b) chemical structures of PTQ and DSPE-PEG₂₀₀₀ and a schematic illustration of the preparation of L1057 NPs^[67]；(c) normalized absorption and emission spectra of L1057 NPs in water^[67]；(d) schematic illustration of the effect of the repeating unit number on the phototheranostic performance of semiconducting polymer probe^[64]；(e) synthetic route to PBQ_x^[64]

5 结束语

NIR-II 荧光成像已被广泛应用于基础科学研究和临床前实践。有机 NIR-II 荧光探针因具有优异的生物相容性、良好的合成再现性以及极高的化学可修饰性而极易实现临床转化。到目前为止,国内外已经开发出了一系列性能优异的 NIR-II 荧光探针,并基于这些探针实现了高信噪比、高时空分辨率的活体成像。然而,目前文献报道的绝大多数有机 NIR-II 荧光探针还不够完善,在临床应用上存在一定的局限性。为了扩大 NIR-II 荧光探针的生物应用,实现真正意义上的临床化,必须克服以下挑战:

1) 开发可经肝脏或肾脏代谢的探针,以解决探针的长期安全性问题。若要实现有机 NIR-II 荧光探针的临床化,探针的长期生物安全性是需要解决的首要问题。显在或者是潜在的生物毒性极大地限制了其临床转化的步伐。虽然在过去的十几年里,科研工作者已经开发出了诸多有机 NIR-II 荧光探针,但目前仍没有一例被批准应用于临床研究。设计可经肾脏或者肝脏代谢的探针是降低其生物毒性的一个重要策略。研究表明,尺寸在 5 nm 以下的纳米探针可以通过肾脏代谢。

2) 开发内源性 NIR-II 荧光蛋白,以实现长期生物监测。目前被开发出来的有机 NIR-II 荧光探针都是通过化学合成手段制备的,属于外源性探针。该类探针不具备生物遗传性,在体内的存留时间较短,不适合进行长期、动态的生理过程(如基因表达、细胞增殖、细胞分化)观测。与外源性探针相比,内源性荧光蛋白具有更高的生物相容性,更适合用于生理过程的长期监测。这主要得益于荧光蛋白可以被基因编码到细胞内并传递给子细胞,其在受激时产生的荧光信号可以随着细胞的增殖而增强(而不是减弱)。

3) NIR-II 荧光成像系统的开发和优化。近年来,诸多高灵敏度 NIR-II 光电探测器(如铟镓砷相机、光电倍增管、超导纳米线等)被研制出来并实现了量产,这主要得益于制冷散热技术以及芯片制备工艺的进步。与此同时,许多 NIR-II 成像设备也被设计、开发出来,并逐步走出实验室,开始产业化。尽管成像设备取得了长足进步,但要实现临床转化仍有许多重要问题需要进一步解决。生理/病理过程充满了复杂性和动态变化,需要从不同的空间和时间尺度上对其进行评估。因此,需要开发出新的 NIR-II 成像监测技术,实现多源生理、病理信号的多重实时动态监测。亟待开发出 NIR-II 实时多通道成像系统、NIR-II 活体内窥镜成像系统以及 NIR-II 荧光成像与其他成像技术(如 MRI、CT 等)相结合的双/多模态成像系统,加快推进 NIR-II 荧光成像技术的临床应用。

参 考 文 献

- [1] Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 580-589.
- [2] Li Z Q, Zaid W, Hartzler T, et al. Indocyanine green-assisted dental imaging in the first and second near-infrared windows as compared with X-ray imaging[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2019, 1448(1): 42-51.
- [3] Li C Y, Wang Q B. Challenges and opportunities for intravital near-infrared fluorescence imaging technology in the second transparency window[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(10): 9654-9659.
- [4] Miao Q Q, Pu K Y. Organic semiconducting agents for deep-tissue molecular imaging: second near-infrared fluorescence, self-luminescence, and photoacoustics[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(49): e1801778.
- [5] Ding F, Zhan Y B, Lu X J, et al. Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(19): 4370-4380.
- [6] Diao S, Blackburn J L, Hong G S, et al. Fluorescence imaging *in vivo* at wavelengths beyond 1500 nm[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2015, 54(49): 14758-14762.
- [7] Starosolski Z, Bhavane R, Ghaghada K B, et al. Indocyanine green fluorescence in second near-infrared (NIR-II) window[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187563.
- [8] Carr J A, Franke D, Caram J R, et al. Shortwave infrared fluorescence imaging with the clinically approved near-infrared dye indocyanine green[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(17): 4465-4470.
- [9] Zhu S J, Tian R, Antaris A L, et al. Near-infrared-II molecular dyes for cancer imaging and surgery[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(24): e1900321.
- [10] Robinson J T, Hong G S, Liang Y Y, et al. *In vivo* fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134(25): 10664-10669.
- [11] Hong G S, Diao S, Chang J L, et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window[J]. *Nature Photonics*, 2014, 8(9): 723-730.
- [12] Wang Z H, She M Y, Chen J A, et al. Rational modulation strategies to improve bioimaging applications for organic NIR-II fluorophores[J]. *Advanced Optical Materials*, 2022, 10(2): 2101634.
- [13] Welsher K, Sherlock S P, Dai H J. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(22): 8943-8948.
- [14] He S Q, Song J, Qu J L, et al. Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores: design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(12): 4258-4278.
- [15] Kenry, Duan Y K, Liu B. Recent advances of optical imaging in the second near-infrared window[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(47): e1802394.
- [16] Hu Z H, Fang C, Li B, et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2020, 4(3): 259-271.
- [17] Cai Z C, Zhu L, Wang M Q, et al. NIR-II fluorescence microscopic imaging of cortical vasculature in non-human primates[J]. *Theranostics*, 2020, 10(9): 4265-4276.
- [18] Zhang H Q, Zhu L, Gao D S, et al. Imaging the deep spinal cord microvascular structure and function with high-speed NIR-II fluorescence microscopy[J]. *Small Methods*, 2022, 6(8): e2200155.

- [19] 高露, 高贝贝, 王富. 超分辨显微成像技术在活体大脑成像中的应用[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007301.
Gao L, Gao B B, Wang F. Applications of super-resolution microscopy techniques in living brain imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007301.
- [20] Hong G S, Lee J C, Robinson J T, et al. Multifunctional *in vivo* vascular imaging using near-infrared II fluorescence[J]. Nature Medicine, 2012, 18(12): 1841-1846.
- [21] Su Y B, Yu B, Wang S, et al. NIR-II bioimaging of small organic molecule[J]. Biomaterials, 2021, 271: 120717.
- [22] Ding F, Fan Y, Sun Y, et al. Beyond 1000 nm emission wavelength: recent advances in organic and inorganic emitters for deep-tissue molecular imaging[J]. Advanced Healthcare Materials, 2019, 8(14): 1900260.
- [23] Tan Y H, Liu P Y, Li D X, et al. NIR-II aggregation-induced emission luminogens for tumor phototheranostics[J]. Biosensors, 2022, 12(1): 46.
- [24] 王瑞荣, 崔丹丹, 石玉娇. 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[J]. 中国激光, 2022, 49(20): 2007204.
Wang R R, Cui D D, Shi Y J. Photosensitive AgBr@PLGA nanoprobe for near infrared two-region tumor-specific photoacoustic imaging[J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(20): 2007204.
- [25] 韦族武, 杨森, 吴名, 等. 近红外二区荧光手术导航探针研究进展[J]. 中国激光, 2022, 49(5): 0502102.
Wei Z W, Yang S, Wu M, et al. Recent progress in near-infrared-II fluorescence imaging probes for fluorescence surgical navigation [J]. Chinese Journal of Lasers, 2022, 49(5): 0502102.
- [26] Wang Y F, Zhang W S, Sun P F, et al. A novel multimodal NIR-II nanoprobe for the detection of metastatic lymph nodes and targeting chemo-photothermal therapy in oral squamous cell carcinoma[J]. Theranostics, 2019, 9(2): 391-404.
- [27] Yin B L, Qin Q Q, Li Z, et al. Tongue cancer tailored photosensitizers for NIR-II fluorescence imaging guided precise treatment[J]. Nano Today, 2022, 45: 101550.
- [28] Li M, Li Z, Yu D N, et al. Quinoid conjugated polymer nanoparticles with NIR-II absorption peak toward efficient photothermal therapy[J]. Chemistry, 2023, 29(14): e202202930.
- [29] Lei Z H, Zhang F. Molecular engineering of NIR-II fluorophores for improved biomedical detection[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2021, 60(30): 16294-16308.
- [30] Zhu S J, Hu Z B, Tian R, et al. Repurposing cyanine NIR-I dyes accelerates clinical translation of near-infrared-II (NIR-II) bioimaging[J]. Advanced Materials, 2018, 30(34): 1802546.
- [31] Zhao X, Zhang F, Lei Z H. The pursuit of polymethine fluorophores with NIR-II emission and high brightness for *in vivo* applications[J]. Chemical Science, 2022, 13(38): 11280-11293.
- [32] Cosco E D, Caram J R, Bruns O T, et al. Flavylium polymethine fluorophores for near- and shortwave infrared imaging[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2017, 56(42): 13126-13129.
- [33] Yang Y, Sun C X, Wang S F, et al. Counterion-paired bright heptamethine fluorophores with NIR-II excitation and emission enable multiplexed biomedical imaging[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2022, 61(24): e202117436.
- [34] Wang S F, Fan Y, Li D D, et al. Anti-quenching NIR-II molecular fluorophores for *in vivo* high-contrast imaging and pH sensing[J]. Nature Communications, 2019, 10: 1058.
- [35] Tao Z M, Hong G S, Shinji C, et al. Biological imaging using nanoparticles of small organic molecules with fluorescence emission at wavelengths longer than 1000 nm[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2013, 52(49): 13002-13006.
- [36] Li B H, Lu L F, Zhao M Y, et al. An efficient 1064 nm NIR-II excitation fluorescent molecular dye for deep-tissue high-resolution dynamic bioimaging[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2018, 57(25): 7483-7487.
- [37] Li B H, Zhao M Y, Feng L S, et al. Organic NIR-II molecule with long blood half-life for *in vivo* dynamic vascular imaging[J]. Nature Communications, 2020, 11: 3102.
- [38] Ding B B, Xiao Y L, Zhou H, et al. Polymethine thiopyrylium fluorophores with absorption beyond 1000 nm for biological imaging in the second near-infrared subwindow[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(4): 2049-2059.
- [39] Antaris A L, Chen H, Cheng K, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging[J]. Nature Materials, 2016, 15(2): 235-242.
- [40] Antaris A L, Chen H, Diao S, et al. A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging [J]. Nature Communications, 2017, 8: 15269.
- [41] Shou K Q, Qu C R, Sun Y, et al. Multifunctional biomedical imaging in physiological and pathological conditions using a NIR-II probe[J]. Advanced Functional Materials, 2017, 27(23): 1700995.
- [42] Zhang R P, Xu Y L, Zhang Y, et al. Rational design of a multifunctional molecular dye for dual-modal NIR-II/photoacoustic imaging and photothermal therapy[J]. Chemical Science, 2019, 10(36): 8348-8353.
- [43] Guo B, Huang Z M, Shi Q, et al. Organic small molecule based photothermal agents with molecular rotors for malignant breast cancer therapy[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(5): 1907093.
- [44] Yang Q L, Ma H L, Liang Y Y, et al. Rational design of high brightness NIR-II organic dyes with S-D-A-D-S structure[J]. Accounts of Materials Research, 2021, 2(3): 170-183.
- [45] Tian R, Ma H L, Yang Q L, et al. Rational design of a super-contrast NIR-II fluorophore affords high-performance NIR-II molecular imaging guided microsurgery[J]. Chemical Science, 2019, 10(1): 326-332.
- [46] Zhang X D, Wang H S, Antaris A L, et al. Traumatic brain injury imaging in the second near-infrared window with a molecular fluorophore[J]. Advanced Materials, 2016, 28(32): 6872-6879.
- [47] Yang Q L, Hu Z B, Zhu S J, et al. Donor engineering for NIR-II molecular fluorophores with enhanced fluorescent performance[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(5): 1715-1724.
- [48] Li Y X, Zhou H L, Bi R Z, et al. Acceptor engineering of small-molecule fluorophores for NIR-II fluorescence and photoacoustic imaging[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(48): 9951-9960.
- [49] Li Y, Gao J F, Wang S P, et al. Self-assembled NIR-II fluorophores with ultralong blood circulation for cancer imaging and image-guided surgery[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2022, 65(3): 2078-2090.
- [50] Qu C R, Xiao Y L, Zhou H, et al. Quaternary ammonium salt based NIR-II probes for *in vivo* imaging[J]. Advanced Optical Materials, 2019, 7(15): 1900229.
- [51] Sheng Z H, Guo B, Hu D H, et al. Bright aggregation-induced-emission dots for targeted synergetic NIR-II fluorescence and NIR-I photoacoustic imaging of orthotopic brain tumors[J]. Advanced Materials, 2018, 30: e1800766.
- [52] Wu W, Yang Y Q, Yang Y, et al. An organic NIR-II nanofluorophore with aggregation-induced emission characteristics for *in vivo* fluorescence imaging[J]. International Journal of Nanomedicine, 2019, 14: 3571-3582.
- [53] Liu S J, Chen R Z, Zhang J Q, et al. Incorporation of planar blocks into twisted skeletons: boosting brightness of fluorophores for bioimaging beyond 1500 nanometer[J]. ACS Nano, 2020, 14(10): 14228-14239.
- [54] Li Y Y, Cai Z C, Liu S J, et al. Design of AIEgens for near-infrared IIb imaging through structural modulation at molecular and morphological levels[J]. Nature Communications, 2020, 11: 1255.
- [55] Shen H C, Sun F Y, Zhu X Y, et al. Rational design of NIR-II

- AI-Egens with ultrahigh quantum yields for photo- and chemiluminescence imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(33): 15391-15402.
- [56] Yan D Y, Wang M, Wu Q, et al. Multimodal imaging-guided photothermal immunotherapy based on a versatile NIR-II aggregation-induced emission luminogen[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2022, 61(27): e202202614.
- [57] Chen S Y, Pan Y H, Chen K, et al. Increasing molecular planarity through donor/side-chain engineering for improved NIR-IIa fluorescence imaging and NIR-II photothermal therapy under 1064 nm[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2023, 62(6): e202215372.
- [58] Wu W, Yang Y Q, Yang Y, et al. Molecular engineering of an organic NIR-II fluorophore with aggregation-induced emission characteristics for *in vivo* imaging[J]. *Small*, 2019, 15(20): e1805549.
- [59] Li S, Yin C F, Wang R N, et al. Second near-infrared aggregation-induced emission fluorophores with phenothiazine derivatives as the donor and 6, 7-diphenyl-[1, 2, 5]thiadiazolo[3, 4-g]quinoxaline as the acceptor for *in vivo* imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2020, 12(18): 20281-20286.
- [60] Wan H, Yue J Y, Zhu S J, et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 1171.
- [61] Hong G S, Zou Y P, Antaris A L, et al. Ultrafast fluorescence imaging *in vivo* with conjugated polymer fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4206.
- [62] Guo B, Feng Z, Hu D H, et al. Precise deciphering of brain vasculatures and microscopic tumors with dual NIR-II fluorescence and photoacoustic imaging[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(30): e1902504.
- [63] Liu Y, Liu J F, Chen D D, et al. Fluorination enhances NIR-II fluorescence of polymer dots for quantitative brain tumor imaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(47): 21049-21057.
- [64] Zhou H L, Lu Z Y, Zhang Y H, et al. Simultaneous enhancement of the long-wavelength NIR-II brightness and photothermal performance of semiconducting polymer nanoparticles[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(7): 8705-8717.
- [65] Song X W, Lu X M, Sun B, et al. Conjugated polymer nanoparticles with absorption beyond 1000 nm for NIR-II fluorescence imaging system guided NIR-II photothermal therapy[J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2020, 2(10): 4171-4179.
- [66] Zhang W S, Huang T, Li J W, et al. 1300 nm absorption two-acceptor semiconducting polymer nanoparticles for NIR-II photoacoustic imaging system guided NIR-II photothermal therapy [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(18): 16311-16319.
- [67] Yang Y Q, Fan X X, Li L, et al. Semiconducting polymer nanoparticles as theranostic system for near-infrared-II fluorescence imaging and photothermal therapy under safe laser fluence[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2509-2521.
- [68] Zhang Z, Fang X F, Liu Z H, et al. Semiconducting polymer dots with dual-enhanced NIR-IIa fluorescence for through-skull mouse-brain imaging[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2020, 59(9): 3691-3698.
- [69] Liu S J, Ou H L, Li Y Y, et al. Planar and twisted molecular structure leads to the high brightness of semiconducting polymer nanoparticles for NIR-IIa fluorescence imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(35): 15146-15156.
- [70] Li Y X, Su S P, Yang C H, et al. Molecular design of ultrabright semiconducting polymer dots with high NIR-II fluorescence for 3D tumor mapping[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(24): 2100993.
- [71] Sun C X, Li B H, Zhao M Y, et al. *J*-aggregates of cyanine dye for NIR-II *in vivo* dynamic vascular imaging beyond 1500 nm[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(49): 19221-19225.
- [72] Chen W, Cheng C A, Cosco E D, et al. Shortwave infrared imaging with *J*-aggregates stabilized in hollow mesoporous silica nanoparticles[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(32): 12475-12480.
- [73] Sun P F, Wu Q, Sun X L, et al. *J*-aggregate squaraine nanoparticles with bright NIR-II fluorescence for imaging guided photothermal therapy[J]. *Chemical Communications*, 2018, 54(95): 13395-13398.
- [74] Lei Z H, Sun C X, Pei P, et al. Stable, wavelength-tunable fluorescent dyes in the NIR-II region for *in vivo* high-contrast bioimaging and multiplexed biosensing[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2019, 58(24): 8166-8171.
- [75] 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.
- [76] Feng Z, Yu X M, Jiang M X, et al. Excretable IR-820 for *in vivo* NIR-II fluorescence cerebrovascular imaging and photothermal therapy of subcutaneous tumor[J]. *Theranostics*, 2019, 9(19): 5706-5719.
- [77] Cheng K, Chen H, Jenkins C H, et al. Synthesis, characterization, and biomedical applications of a targeted dual-modal near-infrared-II fluorescence and photoacoustic imaging nanoprobe[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(12): 12276-12291.
- [78] Ding F, Li C L, Xu Y L, et al. PEGylation regulates self-assembled small-molecule dye-based probes from single molecule to nanoparticle size for multifunctional NIR-II bioimaging[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(23): e1800973.
- [79] Yi W R, Zhou H, Li A G, et al. A NIR-II fluorescent probe for articular cartilage degeneration imaging and osteoarthritis detection [J]. *Biomaterials Science*, 2019, 7(3): 1043-1051.
- [80] Mu J, Xiao M, Shi Y, et al. The chemistry of organic contrast agents in the NIR-II window[J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2022, 61(14): e202114722.
- [81] Ding F, Chen S, Zhang W S, et al. UPAR targeted molecular imaging of cancers with small molecule-based probes[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2017, 25(20): 5179-5184.
- [82] Ye F Y, Huang W J, Li C L, et al. Near-infrared fluorescence/photoacoustic agent with an intensifying optical performance for imaging-guided effective photothermal therapy[J]. *Advanced Therapeutics*, 2020, 3(12): 2000170.
- [83] Zhou B, Hu Z B, Jiang Y R, et al. Theoretical exploitation of acceptors based on benzobis(thiadiazole) and derivatives for organic NIR-II fluorophores[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018, 20(30): 19759-19767.
- [84] Zhang W S, Chen S Y, Ye S A, et al. Enhancing NIR-II phosphorescence through phosphorescence resonance energy transfer for tumor-hypoxia imaging[J]. *ACS Materials Letters*, 2023, 5(1): 116-124.
- [85] Shi W H, Diao S C, Liang T T, et al. A renal-clearable PEGylated semiconducting oligomer for the NIR-II fluorescence imaging of tumor[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2022, 5(10): 4965-4971.
- [86] Zhou X B, Zhang K, Yang C J, et al. Ultrabright and highly polarity-sensitive NIR-I/NIR-II fluorophores for the tracking of lipid droplets and staging of fatty liver disease[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, 32(12): 2109929.
- [87] Li S L, Deng X Q, Cheng H, et al. Bright near-infrared π -conjugated oligomer nanoparticles for deep-brain three-photon microscopy excited at the 1700 nm window *in vivo*[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(8): 12480-12487.
- [88] Li Y X, Zha M L, Yang G A, et al. NIR-II fluorescent brightness

- promoted by “ring fusion” for the detection of intestinal inflammation[J]. *Chemistry-A European Journal*, 2021, 27(51): 13085-13091.
- [89] Li Q Q, Liu Y S, Zhao B S, et al. A single-molecular ruthenium (ii) complex-based NIR-II fluorophore for enhanced chemophotothermal therapy[J]. *Chemical Communications*, 2022, 58(45): 6546-6549.
- [90] Ji A Y, Lou H Y, Qu C R, et al. Acceptor engineering for NIR-II dyes with high photochemical and biomedical performance[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 3815.
- [91] Zeng X D, Xiao Y L, Lin J C, et al. Near-infrared II dye-protein complex for biomedical imaging and imaging-guided photothermal therapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(18): e1800589.
- [92] Gao S, Wei G G, Zhang S H, et al. Albumin tailoring fluorescence and photothermal conversion effect of near-infrared-II fluorophore with aggregation-induced emission characteristics[J]. *Nature Communications*, 2019, 10: 2206.
- [93] Yin S, Song J W, Liu D F, et al. NIR-II AIEgens with photodynamic effect for advanced theranostics[J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6649.
- [94] Wu W B, Mao D, Xu S D, et al. Polymerization-enhanced photosensitization[J]. *Chem*, 2018, 4(8): 1937-1951.
- [95] Qu Q J, Zhang Z Y, Guo X Y, et al. Novel multifunctional NIR-II aggregation-induced emission nanoparticles-assisted intraoperative identification and elimination of residual tumor[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2022, 20(1): 143.
- [96] Liu J, Chen C, Ji S L, et al. Long wavelength excitable near-infrared fluorescent nanoparticles with aggregation-induced emission characteristics for image-guided tumor resection[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(4): 2782-2789.
- [97] Yu W B, Guo B, Zhang H Q, et al. NIR-II fluorescence *in vivo* confocal microscopy with aggregation-induced emission dots[J]. *Science Bulletin*, 2019, 64(6): 410-416.
- [98] Li Y Y, He M B, Liu Z M, et al. A simple strategy for the efficient design of mitochondria-targeting NIR-II phototheranostics[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2023, 11(12): 2700-2705.
- [99] Alifu N, Zebibula A, Qi J, et al. Single-molecular near-infrared-II theranostic systems: ultrastable aggregation-induced emission nanoparticles for long-term tracing and efficient photothermal therapy[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 11282-11293.
- [100] Li Y, Liu Y F, Li Q Q, et al. Novel NIR-II organic fluorophores for bioimaging beyond 1550 nm[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(10): 2621-2626.
- [101] Xu P F, Kang F, Yang W D, et al. Molecular engineering of a high quantum yield NIR-II molecular fluorophore with aggregation-induced emission (AIE) characteristics for *in vivo* imaging[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(8): 5084-5090.
- [102] Chen Y, Yu H L, Wang Y S, et al. Thiadiazoloquinoxaline derivative-based NIR-II organic molecules for NIR-II fluorescence imaging and photothermal therapy[J]. *Biomaterials Science*, 2022, 10(11): 2772-2788.
- [103] Wei Q D, Xu D S, Li T Y, et al. Recent advances of NIR-II emissive semiconducting polymer dots for *in vivo* tumor fluorescence imaging and theranostics[J]. *Biosensors*, 2022, 12(12): 1126.
- [104] Wang Y X, Feng L H, Wang S. Conjugated polymer nanoparticles for imaging, cell activity regulation, and therapy[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(5): 1806818.
- [105] Li J, Jiang R C, Wang Q, et al. Semiconducting polymer nanotheranostics for NIR-II/photoacoustic imaging-guided photothermal initiated nitric oxide/photothermal therapy[J]. *Biomaterials*, 2019, 217: 119304.
- [106] Tang Y F, Li Y Y, Lu X M, et al. Bio-erasable intermolecular donor - acceptor interaction of organic semiconducting nanoprobe for activatable NIR-II fluorescence imaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(10): 1807376.
- [107] Wang S W, Liu J E, Feng G X, et al. NIR-II excitable conjugated polymer dots with bright NIR-I emission for deep *in vivo* two-photon brain imaging through intact skull[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(15): 1808365.
- [108] Sun P F, Jiang X Y, Sun B, et al. Electron-acceptor density adjustments for preparation conjugated polymers with NIR-II absorption and brighter NIR-II fluorescence and 1064 nm active photothermal/gas therapy[J]. *Biomaterials*, 2022, 280: 121319.
- [109] Yang G Z, Wang Y, Zhou S, et al. Water-dispersed semiconducting polymer for NIR-II fluorescence imaging and NIR-II laser-triggered photothermal therapy[J]. *Dyes and Pigments*, 2023, 210: 110960.
- [110] Dai Y N, Zhang F, Chen K, et al. An activatable phototheranostic nanoplatfor for tumor specific NIR-II fluorescence imaging and synergistic NIR-II photothermal-chemodynamic therapy[J]. *Small*, 2023, 19(22): e2206053.
- [111] Zhang W S, Sun X L, Huang T, et al. 1300 nm absorption two-acceptor semiconducting polymer nanoparticles for NIR-II photoacoustic imaging system guided NIR-II photothermal therapy[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(64): 9487-9490.
- [112] Sun P F, Yang Z L, Qu F, et al. Conjugated/nonconjugated alternating copolymers for enhanced NIR-II fluorescence imaging and NIR-II photothermal-ferrotherapy[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2022, 10(47): 9830-9837.
- [113] Ma N, Liu Y, Chen D D, et al. *In vivo* imaging of exosomes labeled with NIR-II polymer dots in liver-injured mice[J]. *Biomacromolecules*, 2022, 23(11): 4825-4833.
- [114] Peng L, Liu Y, Zhang J, et al. Surface plasmon-enhanced NIR-II fluorescence in a multilayer nanoprobe for through-skull mouse brain imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2022, 14(34): 38575-38583.
- [115] Hsu K F, Su S P, Lu H F, et al. TADF-based NIR-II semiconducting polymer dots for *in vivo* 3D bone imaging[J]. *Chemical Science*, 2022, 13(34): 10074-10081.
- [116] Ma G C, Liu Z K, Zhu C G, et al. H₂O₂-responsive NIR-II AIE nanobomb for carbon monoxide boosting low-temperature photothermal therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2022, 61(36): e202207213.
- [117] Wang Q, Xia B, Xu J Z, et al. Biocompatible small organic molecule phototheranostics for NIR-II fluorescence/photoacoustic imaging and simultaneous photodynamic/photothermal combination therapy[J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2019, 3(4): 650-655.

Research Progress of Organic NIR-II Fluorescent Probes

Liu Jiahui^{1,2}, Yang Yanqing³, Ma Rui³, Shi Kebin^{3,4*}

¹Nantong Stomatological Hospital, Nantong 226000, Jiangsu, China;

²Nantong Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Nantong 226000, Jiangsu, China;

³Peking University Yangtze Delta Institute of Optoelectronics, Nantong 226000, Jiangsu, China;

⁴State Key Laboratory For Artificial Microstructure and Mesoscopic Physics, School of Physics, Peking University, Beijing 100871, China

Abstractive

Significance Various biological imaging modalities have become essential tools in life science research, preclinical research, and clinical practice. The emergence of enormous *in vivo* imaging technologies such as computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET), and single-beam emission computed tomography (SPECT) plays a significant role in disease diagnosis, progression monitoring, and prognosis, bringing the possibility of molecular imaging into medical observation.

Although they have unlimited penetration depth, the above techniques suffer from disadvantages such as limited spatial resolution, long operation times, and low sensitivity. Additionally, the equipment is often very expensive and induces radiation. On the other hand, as a radiation-free technique, fluorescence imaging has been widely used for *in vivo* imaging due to its high spatiotemporal resolution and labeling specificity. However, the performance of FL imaging is deteriorated by the strong absorption, scattering, and autofluorescence of biological tissues in the visible (400–700 nm) or NIR-I (700–900 nm) regions and shows unsatisfactory penetration depth, spatial resolution and signal-to-noise ratio (SNR), limiting its further application in *in vivo* imaging.

FL in the second near-infrared region (NIR-II, 1000–1700 nm), on the contrary, shows appealing advantages due to its deeper penetration depth (>10 mm), improved spatial resolution (about 3 μm), and higher signal-to-noise ratio (about 20), unveiling great clinical translation. Since single-walled carbon nanotubes (SWNTs) were first applied to NIR-II fluorescence imaging in small animals, the development of NIR-II fluorescent probes with high molar absorbance coefficients, high fluorescence quantum yields, good stability, and good biocompatibility has been a research hotspot. In the past decade, NIR-II fluorescent probes were primarily classified into two categories: organic and inorganic probes. The NIR-II inorganic fluorescent probes (e.g., single-walled carbon nanotubes, quantum dots, and rare earth doped conversion materials) have strong heavy metal toxicity, are typically poor in biocompatibility, and have difficulty completing physiological metabolism *in vivo*, limiting their potential applications in clinical practice. On the other side, organic NIR-II fluorescent probes are free of heavy metal ions and have clear structures as well as better biocompatibility, making them more suitable and promising for clinical translation. Some representative examples are D-A-D small molecules, cyanine dyes, and conjugated polymers. Hence, to guide the future development of this field more rationally, it is important and necessary to summarize the molecular structure design concepts and biomedical imaging applications of organic NIR-II fluorescent probes.

Progress In this review, we systematically summarize the molecular structure design concepts and biomedical imaging applications of organic NIR-II fluorescent probes reported in the current literatures. The research progress of organic NIR-II fluorescent probes is classified into cyanine dyes, D-A-D organic small molecules, and conjugated polymers.

First, the molecular design strategies of cyanine dyes with NIR-II emission wavelengths are summarized in terms of red-shifting absorption/emission wavelength, improving fluorescence quantum yield, enhancing biocompatibility, and chemical stability, respectively. Up to now, the reasonable and result-oriented design strategies to achieve cyanine dyes with NIR-II emission wavelengths primarily include: 1) extending the effective conjugation system, 2) modifying the donor and acceptor units, and 3) constructing fluorophore *J*-polymer. The strategies to enhance the fluorescence brightness primarily include: 1) introducing spatial site resistance, 2) forming complexes with proteins, and 3) enhancing the rigidity of molecular structures. The effective strategies to improve biocompatibility primarily include: 1) encapsulating hydrophobic fluorescent molecules by nanoprecipitation using amphiphilic materials and 2) introducing hydrophilic groups on hydrophobic fluorescent molecules utilizing molecular engineering.

Second, the development process of D-A-D small molecules in terms of donor/acceptor unit modulation and fluorescence quantum efficiency enhancement is also presented. In 2016, Dai's team reported for the first time that the water-soluble small molecule CH1055-PEG could be used for NIR-II fluorescence imaging. Since then, a series of small molecules with NIR-II emission have been designed by modulating the electron-giving/absorbing ability of donor/acceptor units. Moreover, strategies have been proposed to enhance fluorescence quantum efficiency, such as by introducing shielding units, suppressing TICT states, constructing hydrophobic nonpolar environments, and building fluorescent small molecules with AIE properties.

Subsequently, we summarize the molecular design strategies of organic conjugated polymers with high brightness and further discuss their applications in bioimaging, primarily including tumor imaging, dynamic angiography, and photothermal therapy.

Finally, the issues and challenges that need to be addressed to identify the clinical translation of NIR-II fluorescence imaging

techniques are discussed.

Conclusions and Prospects NIR-II fluorescence imaging has been widely used in basic scientific research and preclinical practice. Organic NIR-II fluorescent probes are highly amenable to clinical translation due to their excellent biocompatibility, good synthetic reproducibility, and extremely high chemical modifiability. To date, a series of NIR-II fluorescent probes with excellent performance have been developed and applied for *in vivo* imaging with a high signal-to-noise ratio, deep-tissue penetrating ability, and high spatial and temporal resolution. However, most organic NIR-II fluorescent probes reported in the literatures are not yet well established and have limitations in clinical applications. To expand the biological applications of NIR-II fluorescent probes and to achieve true clinical translation, the following challenges must be overcome: 1) the development of liver/kidney metabolizable probes to address long-term probe safety; 2) the development of endogenous NIR-II fluorescent proteins for long-term biomonitoring; and 3) the development and optimization of NIR-II fluorescent imaging systems.

Key words medical optics; the second near-infrared window; fluorescent probes; cyanine dyes; organic small molecules; aggregation-induced luminescence; conjugated polymers