

近红外二区荧光活体生物成像技术研究进展

冯哲^{1,2,3}, 钱骏^{1,2,3*}¹浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江 杭州 310058;²浙江大学光电科学与工程学院光及电磁波研究中心, 浙江 杭州 310058;³浙江大学先进光子学国际研究中心, 浙江 海宁 314400

摘要 近红外二区荧光成像技术是一种大深度、高分辨的光学活体成像手段。相较于可见光(360~760 nm)和近红外一区(760~900 nm)窗口,近红外二区(900~1880 nm, NIR-II)窗口内的组织光吸收明显提升,显著抑制了二维面阵成像中的散射背景,使得成像效果得到改善。围绕着 NIR-II 窗口,研究者们已经开发了多种发光探针、成像系统及诊疗手段,在啮齿类、非人灵长类实验动物上展开实践,并在临床外科手术中初步评估了其应用前景。将从生物组织对可见-近红外波段光子的吸收与散射作用入手,阐述 NIR-II 光学成像的理论机制,简要介绍常见的几类 NIR-II 光学探针,综述现有的几种多模态 NIR-II 成像方式,并对成像引导下的多功能诊疗平台进行讨论,旨在为该领域的进一步发展提供参考,争取早日实现临床转化。

关键词 近红外二区; 活体荧光成像; 多模态光学成像; 多功能诊疗

中图分类号 O43

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0617001

Advances on *in vivo* Fluorescence Bioimaging in the Second Near-Infrared WindowFeng Zhe^{1,2,3}, Qian Jun^{1,2,3*}¹State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China;²Centre for Optical and Electromagnetic Research, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China;³International Research Center for Advanced Photonics, Zhejiang University, Haining, Zhejiang 314400, China

Abstract Near-infrared-II (NIR-II) fluorescence visualization is an *in vivo* optical imaging technique with large imaging depth and high resolution. Compared with visible (360–760 nm) and near-infrared-I (760–900 nm) windows, the light absorption of bio-tissues in the second near-infrared window (900–1880 nm) improves significantly, suppressing the scattering background in two-dimensional array detection, thus remarkably improving imaging quality. Currently, scientists have developed various luminescent probes, imaging systems, and theranostics pathways corresponding to the NIR-II window. The experimental animals cover from rodents to non-human primates. The clinical surgery of human liver tumors guided by NIR-II fluorescence imaging has also been initially evaluated. With light absorption and photon scattering in the visible and near-infrared regions in biological tissues, this study expounds on the mechanism of imaging quality improvement on NIR-II fluorescence imaging. It briefly introduces several typical NIR-II luminophores and reviews the developed multimodal NIR-II optical imaging methods. The

收稿日期: 2021-12-31; 修回日期: 2022-01-20; 录用日期: 2022-01-23

通信作者: *qianjun@zju.edu.cn

multi-functional theranostics platform guided by precious NIR-II optical imaging is also discussed. These aim to provide references for further development and accelerate clinical translation.

Key words the second near-infrared window; *in vivo* fluorescence imaging; multimodal optical imaging; functional theranostics

1 引言

光学成像不存在电离辐射过程且分辨率较高,已被广泛应用于生物医学成像中。科学家们常常对特定的生物组织结构进行特异性标记后,通过荧光成像对生物组织进行精准检测。长久以来,由于光在生物组织中传播受到较大的阻碍,荧光成像被限定在细胞及薄片组织中。在活体层面,科学家们常用拓展到 760~900 nm 的近红外一区(NIR-I)窗口进行成像。然而,在该窗口内,在生物组织中传播的光子仍然受到较强的散射作用,这严重限制了组织荧光成像的成像深度和图像分辨率。2003年,哈佛医学院 Frangioni 教授及麻省理工学院 Bawendi 教授等^[1]预测了大于 1000 nm 光学窗口的大深度成像潜力。2009年,斯坦福大学戴宏杰教授团队^[2]利用单壁碳纳米管实现了首例大于 1000 nm 的近红外活体荧光成像。不久后,1000~1700 nm 作为第二个近红外成像窗口(近红外二区 NIR-II, 又称短波红外波段 SWIR)被大家熟知^[3]。NIR-II 光致发光探针的开发和 NIR-II 荧光活体功能成像的应用成为研究热潮^[4-12]。

截至目前,科学家们已经设计合成了一大批性能优异的 NIR-II 探针。此外,围绕着 NIR-II 组织光学窗口,研究者们开发了多种成像模式,以多维度解析生物结构及功能。本文将立足于 NIR-II 荧光成像技术,从理论机制入手,梳理目前多种光学生物探针的研发现状,深入讨论当下的多种多模态 NIR-II 成像技术,并介绍 NIR-II 荧光成像引导下的复合诊疗平台。

2 近红外二区荧光成像技术

光在生物组织中传播时会受到分子吸收和组织散射的作用,这些干扰会使得部分光子无法按照理想路径传播。在光学成像的过程中,我们往往希望只接收未被干扰的弹道光子,以期获得精准的图像信息。故而,研究生物成分对光子的吸收与散射作用尤为重要。

图 1 给出了多种生物成分,如水分子[如图 1(a)所示]^[13]、血红蛋白[如图 1(b)所示]^[14]、皮下脂肪

[如图 1(c)所示]^[15]、黑色素[如图 1(d)所示]^[16]的吸收光谱。从光谱上看,在 400~600 nm,血红蛋白及氧合血红蛋白的光吸收极强,相较之下,NIR-I 波段内各个组分的光吸收较小,利于光子传播。图 2 给出了血液[如图 2(a)所示]^[14]、皮下脂肪[如图 2(b)所示]^[15]的散射光谱。随着波长的增加,光子散射逐渐下降,这与 Mie 散射和 Rayleigh 散射理论一致。在不同的应用需求驱动下,研究者们也测试了皮肤、颅骨、大脑等组织的光学特性^[17]。在 760~900 nm,即 NIR-I 窗口,光子吸收及散射均较小,利于光子传播。加之在该波段响应的探测器较为成熟(常用硅基探测器),这个窗口已经在生物医学成像及临床术中荧光导航中广泛应用。近年来,研究者们发现,在 NIR-I 区之后的波段,活体成像效果更佳。随后,聂书明教授团队^[3]将大于 1000 nm 的波段称为第二个活体成像窗口,即近红外二区。相较于 NIR-I 的光子,在 NIR-II 窗口内的光子波长更长,在生物组织中受到的散射更小。避开在 1400~1500 nm 的水分子吸光峰后,1000~1400 nm 和 1500~1700 nm 波段的光子在生物组织中传播时衰减长度更大,有利于大深度生物检测。其中 1300~1400 nm 被称为 NIR-IIa 窗口,1500~1700 nm 被称为 NIR-IIb 窗口。此外,生物组织被激发出的自发荧光主要集中在较短的区域(可见光区和 NIR-I 区)。随着波长的增加,生物组织自发荧光造成的背景干扰明显下降,如图 3 所示^[18]。活体近红外二区荧光生物成像效果优异,长期以来,该窗口内的光子散射较小和组织自发荧光极低被视作主要原因。再者,传统的硅基探测器灵敏度较差,常用窄带隙镉镓砷半导体材料作为探测基底进行光子检测。常见的镉镓砷探测器由于磷化镉衬底的阻断,响应范围被限定在 900~1700 nm。又由于 980 nm 附近水分子存在一个光吸收极大值,NIR-II 窗口常被定义在 1000~1700 nm。

最近,浙江大学钱骏教授团队^[19]完善了 NIR-II 窗口的概念。研究发现,适当的组织光吸收可以有效地抑制组织中光程较长的散射光子,显著提升图像的对比度^[19-21],如图 4(a)所示。因而,除了组织光子散射作用随波长增加而降低和生物自发荧光在

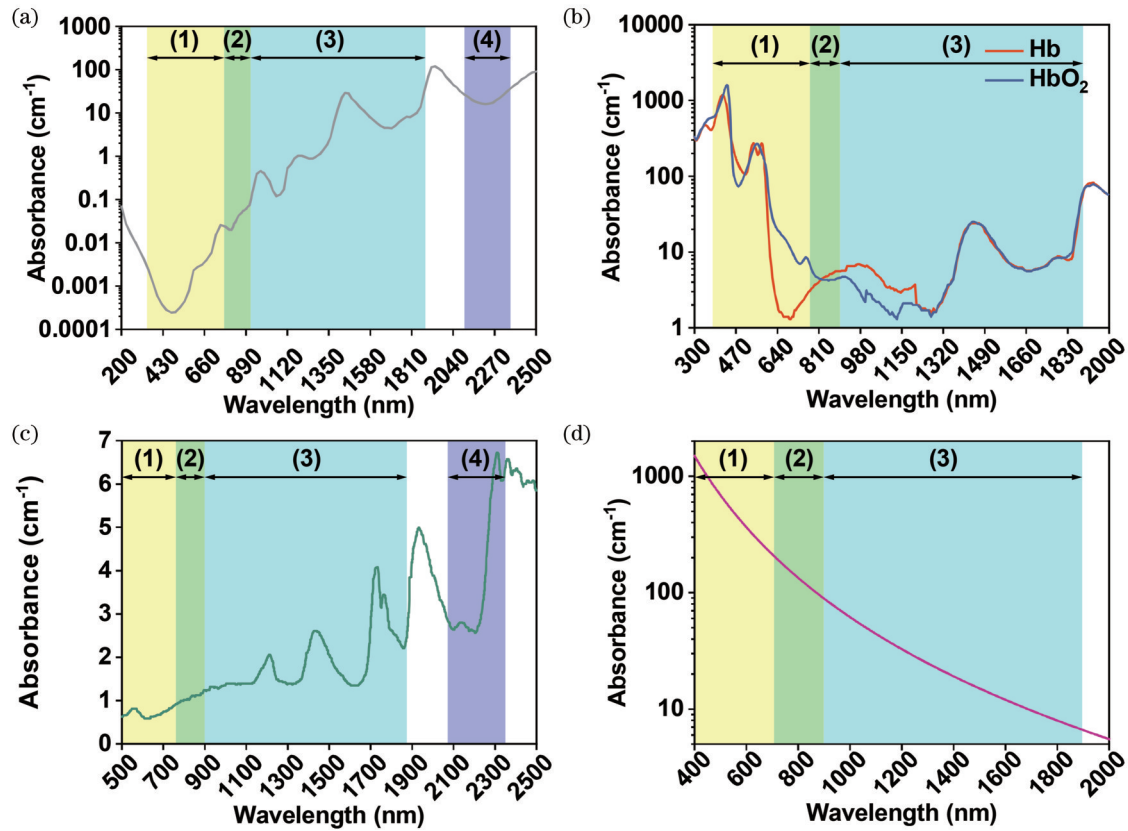


图 1 多种生物成分在可见-近红外波段的光吸收特性。(a)水分子的吸收光谱^[13];(b)血红蛋白/氧合血红蛋白的吸收光谱^[14];(c)皮下脂肪组织的吸收光谱^[15];(d)黑色素的吸收光谱^[16]

Fig. 1 Light absorption properties of several common biological components in the visible and near-infrared regions. (a) Absorption spectrum of water^[13]; (b) absorption spectrum of hemoglobin/oxygenated hemoglobin^[14]; (c) absorption spectrum of subcutaneous adipose tissue^[15]; (d) absorption spectrum of melanin^[16]

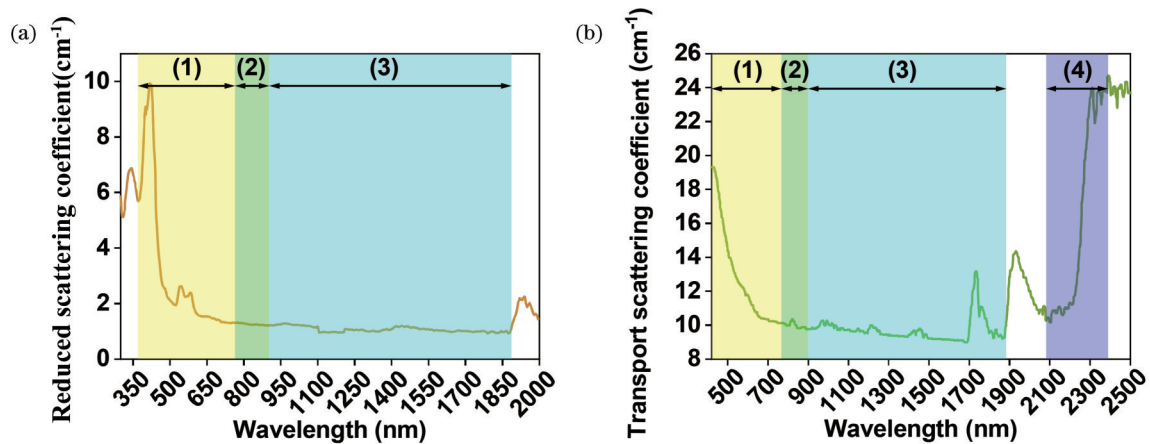


图 2 典型生物组织在可见-近红外波段的光散射特性。(a)血液的散射光谱^[14];(b)皮下脂肪的散射光谱^[15]

Fig. 2 Light scattering characteristics of typical biological tissues in the visible and near-infrared regions. (a) Scattering spectrum of blood^[14]; (b) scattering spectrum of subcutaneous adipose tissue^[15]

NIR-II窗口内的分量极低,生物组织在NIR-II窗口内光吸收较大也是近红外二区成像效果优异的一大重要原因。鉴于水是生物体最主要的成分,该团队根据水分子在可见光及近红外波段的吸收光谱,

将NIR-II窗口定义进一步完善为900~1880 nm,如图4(b)所示。由于水分子在980 nm的极值吸收,故而在900~1000 nm的成像效果并不亚于1000~1100 nm,所以900~1000 nm应被囊括到NIR-II窗

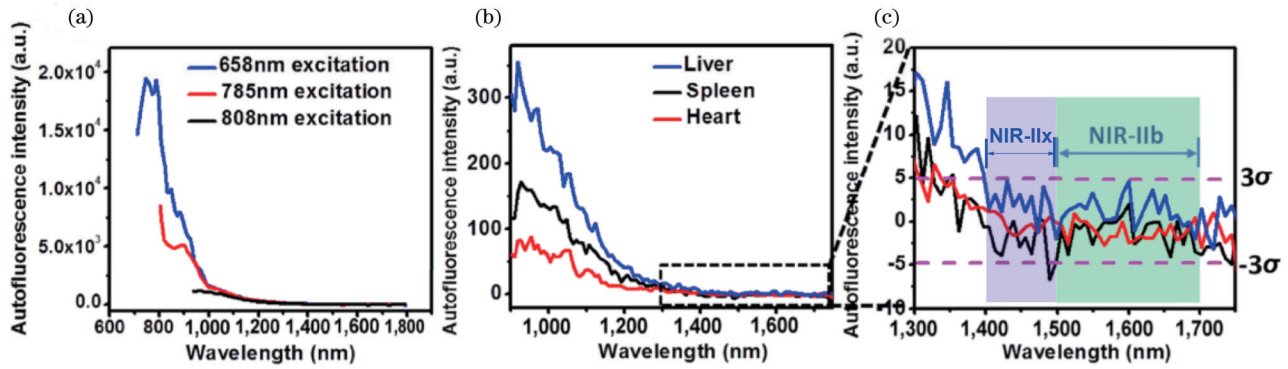


图 3 生物组织在可见-近红外波段的自发荧光特性^[18]。(a)肝脏在不同波长光源激发下的自发荧光光谱;(b)808 nm 光源激发下肝脏、脾脏及心脏的自发荧光光谱;(c)图 3(b)光谱在 1300~1750 nm 的放大

Fig. 3 Spontaneous fluorescence characteristics of biological tissues in the visible and near-infrared regions^[18]. (a) Autofluorescence spectra of liver under the excitation of different wavelength light sources; (b) autofluorescence spectra of liver, spleen, and heart under 808 nm laser excitation; (c) enlarged spectra of Fig. 3 (b) in 1300–1750 nm

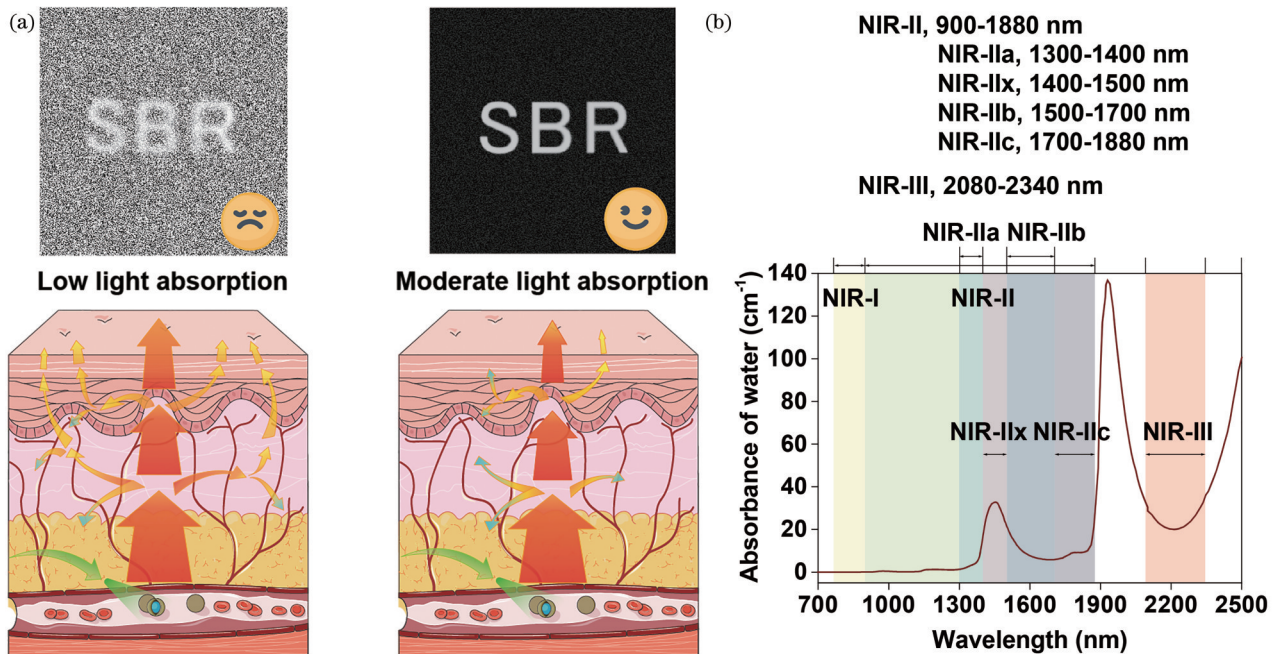


图 4 近红外光学生物成像机制^[19]。(a)光在组织中传播的示意图;(b)水分子吸收光谱及近红外成像窗口定义
Fig. 4 Mechanism of near-infrared optical biological imaging^[19]. (a) Schematic of light propagation in bio-tissue; (b) absorption spectrum of water and the imaging windows in the near-infrared region

口内。只要荧光探针足够亮,1400~1500 nm 组织光吸收作用可以非常显著地抑制散射背景,因此该波段被定义为 NIR-IIx 窗口。整体来说,1500~1880 nm 范围内,组织的光吸收及光散射作用比较相似。由于晶格匹配的常规镓砷半导体(In_{0.53}Ga_{0.47}As)禁带宽度限制,1700 nm 成为探测的上限波长。故而 1500~1880 nm 被分成两个窗口,其中 1700~1880 nm 被定义为 NIR-IIc 窗口。与 NIR-IIb 窗口相比,NIR-IIc 窗口的光子散射进一步减弱,然而组织光吸收同时也下降,所以在二维面阵

探测成像中,NIR-IIc 窗口的成像性能与 NIR-IIb 窗口类似。如图 4(b)所示,水分子在 1930 nm 附近存在极高的吸收。通过蒙特卡罗模拟,1880~2080 nm 波段会严重损耗信号光子,不利于深度成像,故避之。2080~2340 nm 波段内,组织光散射较低,水的光吸收较为合适,可以视作第三个近红外窗口(NIR-III),并具备比 NIR-II 更高的成像性能。2340 nm 以后,水分子吸光度始终处于极高的水平,不利于活体荧光成像。因而,NIR-III 波段是最后一个未被开发的近红外成像窗口。

3 近红外二区荧光探针概述

为特异地标记感兴趣的生物组织,需要借助多功能的荧光探针。先前的荧光探针的发射波长大多位于 NIR-I 区及可见光波段。随着 NIR-II 成像技术的挖掘,该领域涌现出越来越多的性能优异的成像探针。大体上,这些探针可以分为有机染料和无机纳米颗粒两大类。下面将主要介绍小分子荧光染料、有机荧光纳米探针、量子点光致发光无机纳米探针及稀土离子掺杂光致发光纳米探针等 NIR-II 发光

探针的研究现状,以期为未来临床转化提供参考。

3.1 小分子荧光染料

小分子药物是目前临床诊疗中最常见的一类药物。其具有明确的分子结构和较好的生物代谢性质,具备较高的临床转化潜力。事实上,一些高生物安全性的小分子染料药已经通过了美国食品药品监督管理局(FDA)的认证,并广泛应用于临床。其中,吲哚菁绿[ICG,化学结构如图 5(a)所示]^[22-24]及亚甲基蓝[MB,化学结构如图 5(b)所示]^[25]等作为临床可用的 NIR-I 发射的小分子染料近年来也被发

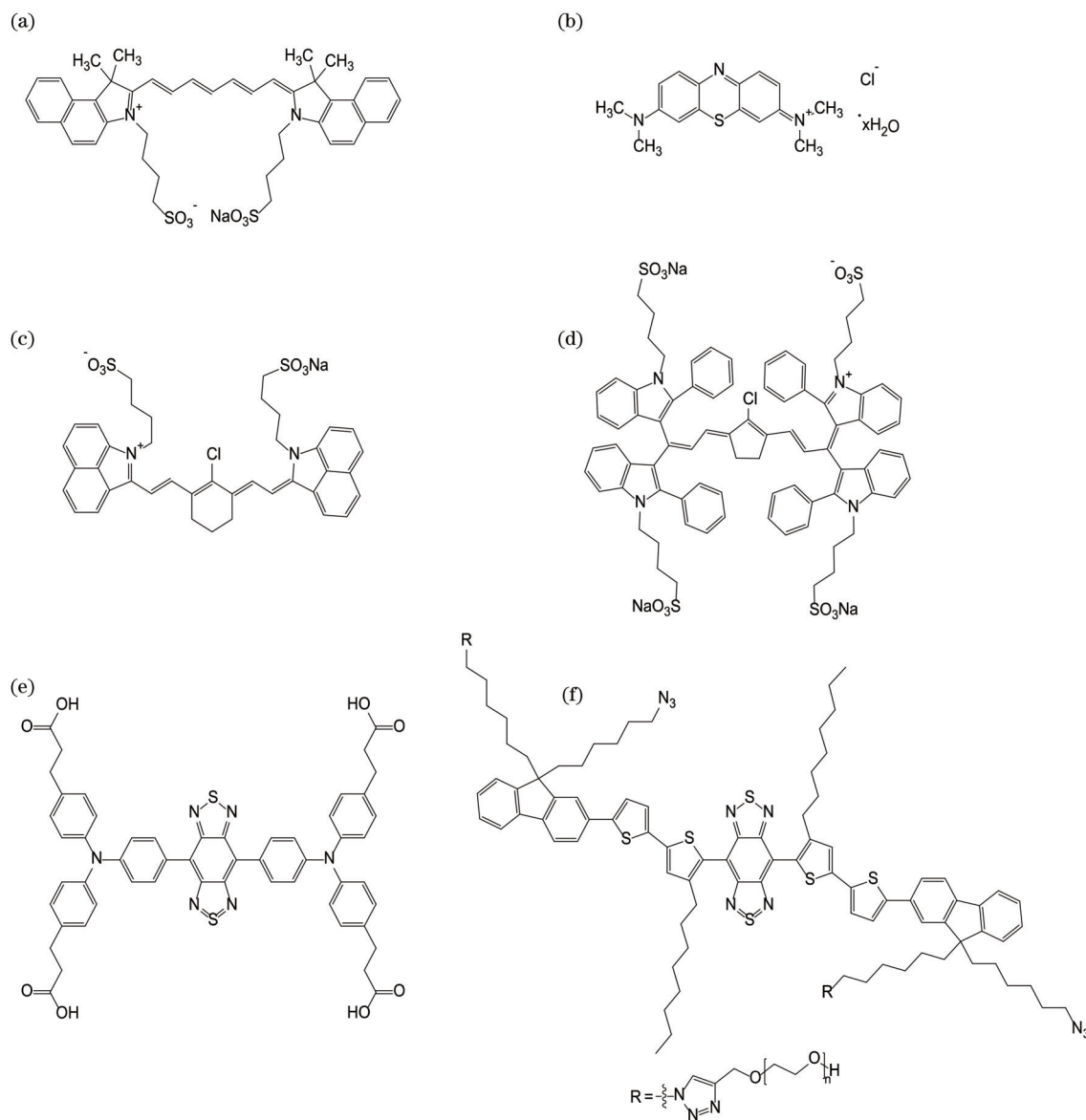


图 5 几种具有 NIR-II 荧光发射的水溶性小分子染料。(a) ICG 的化学结构^[22-24]; (b) MB 的化学结构^[25]; (c)(d) 两种聚次甲基结构的 NIR-II 荧光染料^[29-30]; (e)(f) 两种 D-A-D 结构的 NIR-II 荧光染料^[6, 31]

Fig. 5 Several water-soluble molecular dyes with NIR-II fluorescence. (a) Chemical structure of ICG^[22-24]; (b) chemical structure of MB^[25]; (c)(d) two NIR-II fluorescent dyes with polymethylene structure^[29-30]; (e)(f) two NIR-II fluorescent dyes with D-A-D structure^[6, 31]

现具有较强的 NIR-II 发射。

2018 年,麻省理工学院 Bawendi 教授及 Bruns 教授团队^[23]报道了首个利用 ICG 荧光小分子的尾荧光实现近红外二区荧光成像的案例。由于商用的硅探测器在 900 nm 以上灵敏度较低,其近红外二区发射特性一直没有被研究者关注到。在这个工作中,研究者发现 ICG 具有较强的近红外二区荧光拖尾,且当 ICG 注入血液中后,其 NIR-II 亮度得到进一步提升。随后,钱骏教授、附属邵逸夫医院李恭会教授及附属妇产科医院张丹教授等^[24]通过肌肉注射的方式,有效延长了 ICG 血液循环时间,并利用 NIR-II 宽场荧光显微术实现了穿颅小鼠脑血管成像。除 ICG 外,MB 也被证明具备较好的 NIR-II 荧光发射^[25]。与 ICG 不同的是,MB 可以从肾脏排泄,对临床泌尿系统疾病的诊疗至关重要。钱骏教授同李恭会教授^[25]合作,利用 MB 辅助的 NIR-II 荧光非侵入性功能成像,对活体小鼠的肾脏功能进行精准检测。除了以上两种临床可用的小分子染料,一些商用染料,如新喋啉菁绿(IR-820)、IRdye800CW、IR-12N3 等也被挖掘出近红外二区荧光成像潜力^[26-27]。这些荧光分子都是典型的峰值荧光发射在 NIR-I 区的染料,但由于它们具有较大的摩尔消光系数、较高的荧光量子产率及较强的 NIR-II 发射拖尾,在 NIR-II 区的拖尾信号仍非常强^[28]。这些染料基本上都具备较高的生物安全性和生物可排泄能力,可以适应不同的应用需求,具有较大的转化潜力。

尽管如此,但如何延长发射波长并保证较高的荧光强度仍是一个热点话题^[32]。斯坦福大学戴宏杰教授团队、斯坦福大学程震教授团队、武汉大学洪学传教授和肖玉玲教授团队、复旦大学张凡教授团队、南方科技大学梁永晖教授团队等一大批科学家们展开了深入研究^[29, 33-36]。以聚次甲基结构为模型,科学家们开发了许多 NIR-II 荧光分子^[29-30, 37],如图 5(c)和图 5(d)所示,荧光波段、循环时间等性质不断得到改善。2016 年,武汉大学洪学传教授团队与斯坦福大学戴宏杰教授等^[6]开发了具备供体-受体-供体(D-A-D)结构的 NIR-II 有机小分子 CH1055,如图 5(e)所示,最大发射波长为 1055 nm。此后,一系列性能优异的 D-A-D 结构的 NIR-II 小分子染料被开发^[31, 38-41],如图 5(f)所示,并应用于多功能 NIR-II 荧光活体成像中。

3.2 有机荧光纳米探针

很多小分子或聚合物大分子都面临水溶性较

差的问题,需要将其包覆改成纳米颗粒,以转化为水相并在脉管系统中稳定循环。围绕着 NIR-II 窗口,研究者已经开发了一系列优秀的有机纳米发光探针。下面将主要介绍聚集诱导发光纳米探针和有机聚合物纳米探针。

3.2.1 聚集诱导发光纳米颗粒

荧光染料的平面结构使得染料在聚集时大部分能量以非辐射跃迁的形式耗散,荧光强度大幅下降,这便是聚集诱导淬灭(ACQ)效应^[42]。为了避免分子聚集,研究者们提出了一些改良的包覆方案^[43]。2001 年,唐本忠院士团队^[44]提出了聚集诱导发光(AIE)的分子设计概念,之后一系列具有 AIE 特性的荧光分子被设计构建。通过限制分子内部振动和转动,AIE 分子在聚集态的荧光强度显著提升,如图 6 所示^[45]。近年来,AIE 分子的设计及应用开发迅速成为一大研究热点^[46-47]。随着近红外二区窗口的概念提出,具有 NIR-II 发射特性的 AIE 荧光染料也逐渐问世^[48-49]。2018 年,钱骏教授团队与唐本忠院士团队^[50]合作,开发了具有约 810 nm 峰值发射,同时具有 900 nm 以上强发射拖尾的 AIE 分子 TQ-BPN。通过双极性大分子 F-127 的包覆,TQ-BPN dots 被用于近红外二区荧光活体成像,成功实现小鼠全身血管显影和小鼠脑血管大深度造影。自此以后,一大批优秀的具有 NIR-II 强发射的 AIE 探针被开发。受此启发,研究者将高亮度、宽发射光谱的 AIE 荧光探针应用于 NIR-IIb 拖尾荧光活体成像^[51-55]。通过调控分子间的相互作用,控制分子在纳米胶束中的扭曲的分子内电荷转移(TICT)及 AIE 特性,得到长波长近红外强发射的 AIE 纳米探针^[52];又通过将平面块结合到扭曲的骨架中,研究者进一步提升了 AIE 纳米探针的 NIR-IIb 发射能力^[53]。

对于临床转化来说,AIE 探针的生物安全问题至关重要。围绕着 AIE 纳米探针的生物排泄性,钱骏教授团队^[51]展开研究,结果如图 7 所示。利用荧光共振能量转移,研究者发现在生物环境中,包覆在纳米胶束中的长烷基链 AIE 分子相较于无链分子更容易释放。通过活体代谢研究,研究者发现长烷基链 AIE 荧光团与无烷基链 AIE 荧光团在静脉注射入小鼠体内后经肝胆系统的排泄效果有显著差异。除了啮齿类动物,在非人灵长类动物上也明确发现了这样的排泄作用。该发现对未来探究生物可排泄的有机纳米荧光探针意义重大。

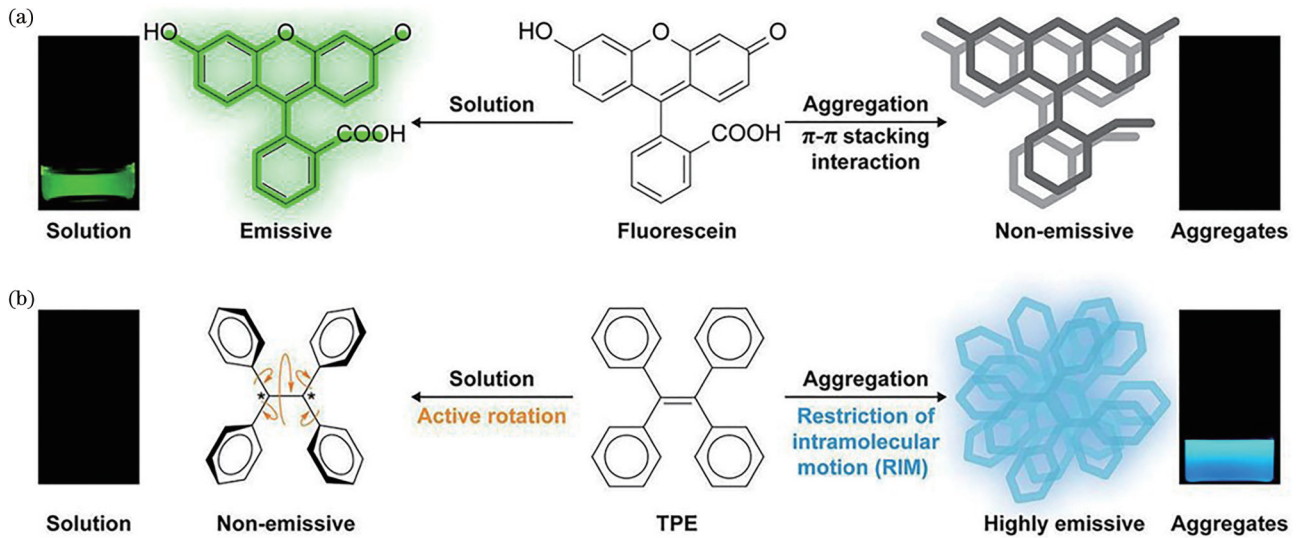


图 6 ACQ 和 AIE 现象的示意图^[45]。(a) 由于 π - π 堆叠, 荧光素 (fluorescein) 在聚集态下的荧光淬灭; (b) 由于分子内运动受限, 四苯乙炔 (TPE) 在聚集态下的荧光增强

Fig. 6 Schematic of ACQ and AIE^[45]. (a) Fluorescence quenching of fluorescein in the aggregate state due to π - π stacking; (b) emission enhancement of tetraphenylethene (TPE) in the aggregate state due to restriction of intramolecular motion (RIM)

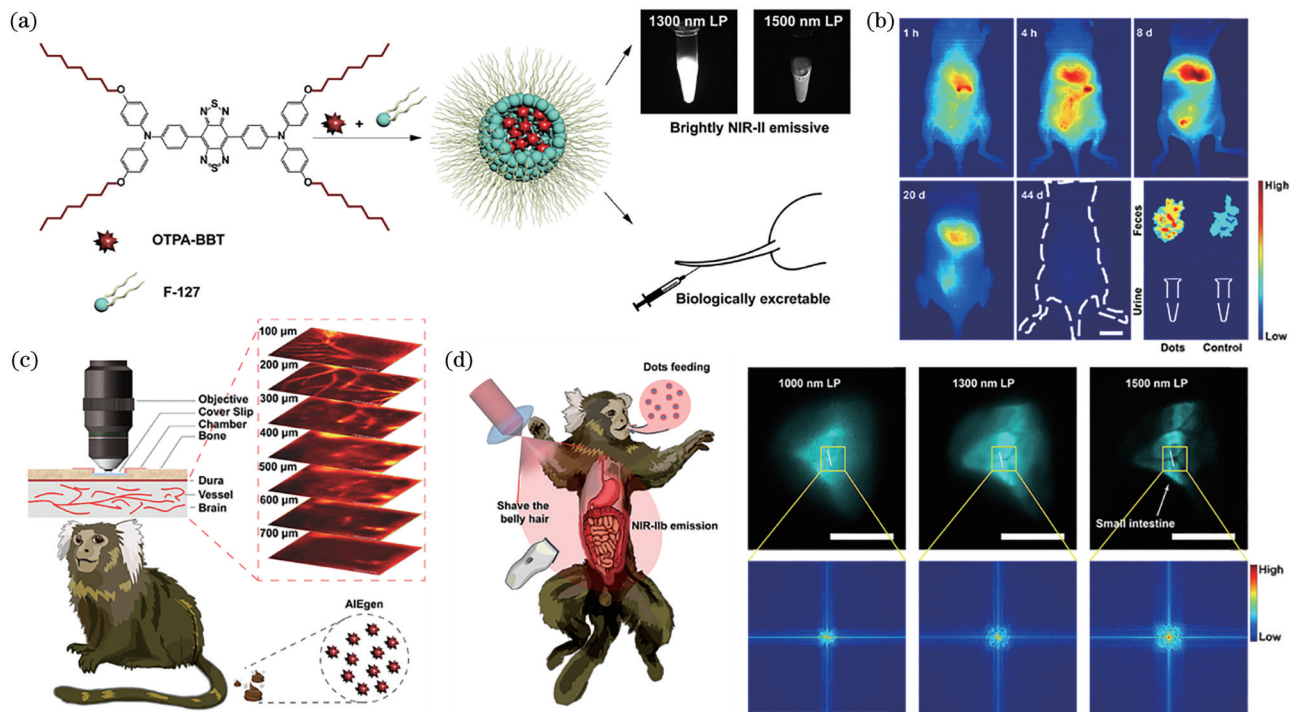


图 7 可排泄的 AIE 探针用于非人灵长类动物大深度荧光成像^[51]。(a) 具有明亮 NIR-II 和 NIR-IIb 发射及生物可排泄性的 OTPA-BBT 纳米颗粒; (b) 静脉注射 OTPA-BBT 纳米颗粒后活体小鼠排泄情况监测, 比例尺为 10 mm; (c) 大深度穿颅 (磨薄) 狨猴 (非人灵长类动物) 脑血管成像; (d) 无创、高空间频率 NIR-IIb 荧光狨猴胃肠道造影, 比例尺为 20 mm

Fig. 7 Excretable AIE fluorophores for deep-penetration fluorescence imaging in non-human primates^[51]. (a) Biologically excretable OTPA-BBT dots with bright NIR-II/NIR-IIb emission; (b) NIR-II fluorescence monitoring of excretion in mice after intravenous injection of OTPA-BBT dots, scale bar is 10 mm; (c) deep cerebrovascular microscopy in the marmosets through thinned skull; (d) noninvasive NIR-IIb fluorescence gastrointestinal imaging in the marmosets with high spatial frequency, scale bar is 20 mm

3.2.2 有机共轭聚合物纳米颗粒

由于有效地增加了共轭链长,许多吸光能力强的长波长近红外半导体共轭聚合物成为 NIR-II 荧光成像的有力候选探针^[56-59]。2014 年,斯坦福大学戴宏杰教授等^[60]开发了第一个 NIR-II 发射的聚合物探针,其最大荧光波长为 1047 nm,如图 8(a)所示。此后,一系列优秀的 NIR-II 半导体共轭聚合物探针被研究者们开发^[61-63]。整合了优异的光热特性,生物兼容性良好的半导体共轭聚合物探针[如图 8(b)所示]已被成功用于 NIR-II 荧光成像引导下的肿瘤光热治疗^[64-68]。

为了改善荧光发射波长红移带来的荧光衰减问题,南京邮电大学范曲立教授团队开发了一系列“quinoid”类聚合物,有效调节了分子内电荷转移效

应,使得聚合物纳米颗粒具有较强的 NIR-II 荧光发射能力^[58]。通过调整受体的比例,范曲立教授团队^[57]开发了一系列性能优异的近红外 II 区聚合物纳米颗粒,实现了成像引导下高效的肿瘤光诊疗。南方科技大学吴长锋教授团队^[69]在聚合物结构中引入 phenothiazine 单元并设计一定的空间位阻减弱 π - π 相互作用,设计出一系列具有 AIE 效应的有机聚合物纳米探针,并利用其优异的发光性能实现了 NIR-IIa 荧光活体成像。吴长锋教授团队与中南大学邹应萍教授团队^[70]合作,提出一种可以有效提升聚合物纳米颗粒 NIR-II 发光效率的氟化策略,实现了活体小鼠无创脑血管定量成像。最近,吴长锋教授团队^[71]开发了具有不同纳米粒径的 NIR-II 聚合物纳米颗粒,并利用该窗口穿透深度大的优势,实现了活体小鼠骨成像。

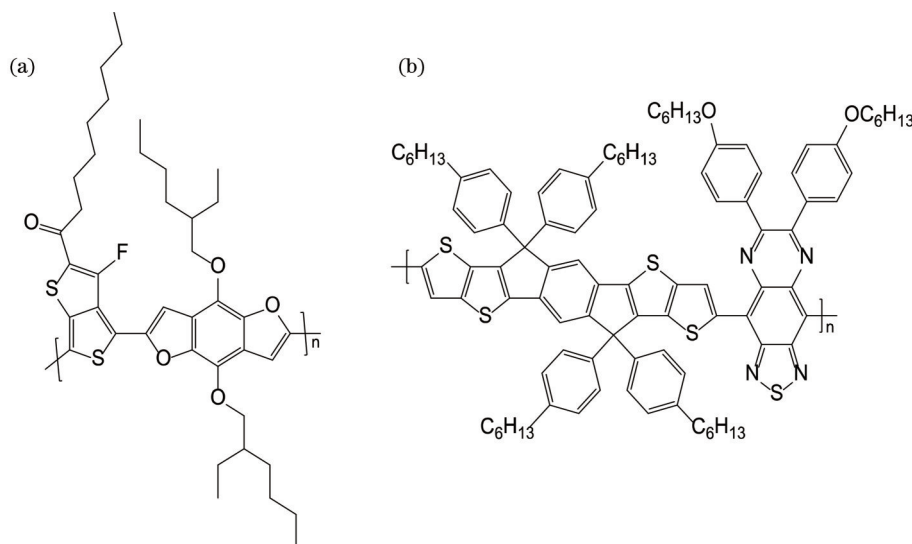


图 8 两种典型的具有 NIR-II 发射特性的有机共轭聚合物。(a) pDA 的化学结构^[60]; (b) L1057 聚合物的化学结构^[64]
Fig. 8 Two typical organic conjugated polymer fluorophores with bright NIR-II emission. (a) Chemical structure of pDA^[60]; (b) chemical structure of L1057 polymer^[64]

3.3 量子点光致发光纳米探针

量子点是一种性能优异的光致发光探针。由于量子限域效应,通过调整其尺寸,可以调谐量子点的激发波长和发射波长。此外,量子点探针具有量子产率高、抗光漂白性能优异、荧光寿命较长、斯托克斯位移较大等优势,已广泛应用于生物医学成像。目前,II-VI 族量子点(如 CdS、CdSe 和 CdTe 等)常用于 NIR-I 生物成像^[72]。为了进一步提高其光学特性以进行 NIR-II 成像,研究者开发了一系列性能优异的量子点探针^[73-74],如图 9 所示。以 PbS 量子点为例,钱骏教授团队^[75]对具有 NIR-II 窗口强发射的 PbS/CdS 量子点进行双层修饰。经修饰后的水相量子点具备较高的生物稳定性和 pH 稳定性。

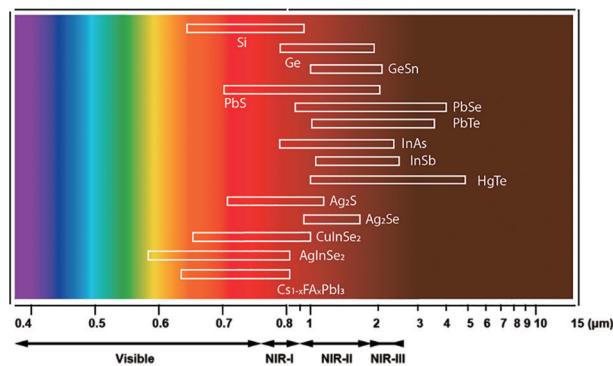


图 9 具有近红外波段发射特性的几种典型半导体量子点^[73]

Fig. 9 Several typical semiconductor quantum dots with near-infrared emission^[73]

利用该探针,研究人员成功实现了对小鼠大深度脑血管及肠胃道造影。斯坦福大学戴宏杰教授团队^[76]合成了以 1600 nm 为中心波长明亮发射的 NIR-IIb 量子点探针,成功对小鼠肿瘤血管系统进行了共聚焦荧光显微成像,成像深度达到 1.2 mm。由于 Pb、Cd 等元素的毒性问题,中科院苏州纳米技术与纳米仿生研究所王强斌教授团队、南开大学庞代文教授团队^[77-85]继续开发了更具生物安全性的量子点纳米探针。例如,王强斌教授团队对 I-VI 族量子点的光学性质进行了精确调控,开发了一系列性能优异的 Ag_2S ^[85]、 Ag_2Se ^[86]、 Ag_2Te ^[87] 量子点等。除此之外,麻省理工学院的 Bawendi 教授团队^[88-89]也开发了无任何重金属元素的 III-V 族量子点,成功将它们用于 NIR-II 生物成像。通过对量子点表面修饰,目前已经实现了多功能的 NIR-II 生物医学成像诊疗检测。

3.4 稀土离子掺杂光致发光纳米探针

稀土元素即镧系元素。由于丰富的能级分布及多重电子跃迁,稀土掺杂纳米颗粒具备独特的上转换和下转换发光特性。对于下转换发光来说,吸

收了短波长光子的能量后,通过非辐射跃迁损失部分能量,然后发射出长波长的光子,实现大斯托克斯位移发光。大多数稀土离子掺杂的纳米探针具有较窄的吸收光谱和发射光谱。以不同的离子为发光中心,可以得到不同波长的光致发光。例如,掺杂 Nd^{3+} 、 Ho^{3+} 、 Pr^{3+} 、 Tm^{3+} 、 Er^{3+} 的氟化物纳米探针分别在 1060、1185、1310、1475、1525 nm 处具有发射带,如图 10 所示^[90-91]。稀土掺杂纳米探针的光稳定性较强,已广泛应用于生物医学成像中^[92-93]。近年来,以 Er^{3+} 离子为发光中心的下转换 NIR-II 发光纳米探针被大量开发。然而,由于稀土离子的吸收截面较小,且 f-f 轨道间存在宇称禁戒,其下转换发光效率较低。如何有效增强稀土纳米探针 NIR-II 下转换发射强度成为一大研究热门。为了增强稀土纳米探针的发射强度,苏州大学李桢教授、福州大学宋继彬教授、哈尔滨工业大学陈冠英教授、美国纽约州立大学布法罗分校 Prasad 教授等^[94-98]将一些大吸收的染料作为敏化剂以提升纳米颗粒整体的发光强度。此外,通过 Ce^{3+} 掺杂,斯坦福大学戴宏杰教授团队^[93]抑制了上转换途径,使得 Er^{3+} 在 NIR-

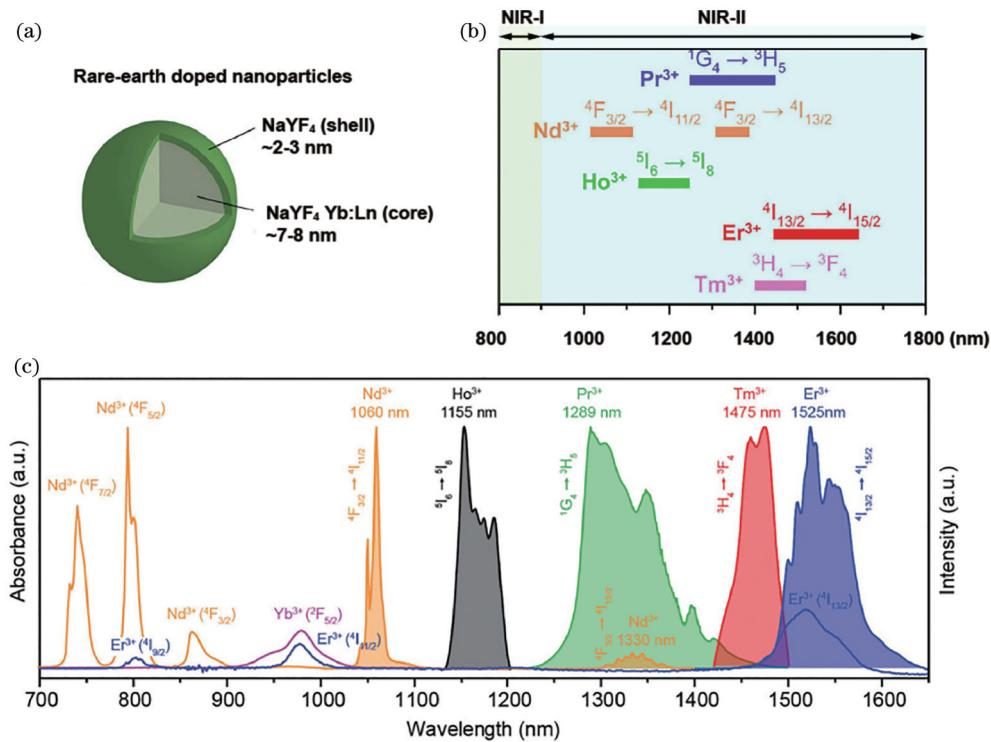


图 10 具有近红外波段发射特性的稀土离子掺杂光致发光纳米颗粒。(a)以 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Ln}$ 为核,以 NaYF_4 为壳的典型结构^[90]; (b)几种典型的近红外稀土离子发光的波长范围^[90]; (c)几种典型近红外稀土离子的吸收光谱和发射光谱^[91]

Fig. 10 Rare-earth doped photoluminescence nanoparticles with near-infrared spectral emission properties. (a) Typical structure of the nanoparticles with $\text{NaYF}_4:\text{Yb}:\text{Ln}$ as core and NaYF_4 as shell^[90]; (b) emission band of several typical near-infrared rare-earth ions^[90]; (c) absorption and emission spectra of several typical near-infrared rare-earth ions^[91]

II窗口的下转换发射提升了9倍。此后,戴宏杰教授团队^[7]构建了下转换增强的 α 相稀土纳米探针,并通过 Zn^{2+} 掺杂进一步提升了下转换发光效率。湖南师范大学曾松军教授、香港理工大学郝建波教授等^[99-101]开发了一系列聚丙烯酸改性的稀土离子掺杂NIR-II发光探针,并实现了活体大深度多功能成像。吉林大学刘晓敏教授团队与钱骏教授团队^[102]合作,开发了自敏化的 Er^{3+} 离子掺杂纳米探针,大大降低了反向能量转移损耗,实现了NIR-IIb小鼠活体高分辨率穿颅脑血管显微成像和大深度生理动态成像。斯坦福大学程震教授团队与深圳大学屈军乐教授团队^[103]的一项工作表明,聚乙二醇包覆的稀土离子掺杂纳米发光探针具有自发的骨骼标记能力,在NIR-II窗口内,利用该探针可以实现大深度高性能小鼠骨成像。程震教授与武汉大学中南医院喻爱喜教授^[104]合作,合成了可排泄的稀土离子掺杂光致发光纳米颗粒,具有高度的临床转化意义。复旦大学张凡教授团队^[10, 105-110]围绕着NIR-II区发射的稀土离子掺杂发光探针,开发了一系列性能优异的多模态成像手段,对生物信息进行深度解析。

4 活体多模态荧光功能成像

借助于性能优异的NIR-II发光探针,可以高质量地显示大深度活体生物信息。基于NIR-II组织光学窗口的光学成像已在各个领域有着突出的效

果。然而,在一些应用场景中,单模态的成像常常不能满足操作者需求。目前,多种NIR-II窗口多模态的生物荧光功能成像技术被开发。接下来本文将围绕从宏观成像到微观成像、从宽场激发显微成像到扫描激发显微成像、从单通道到多通道活体功能成像三方面展开综述。

4.1 从宏观成像到微观成像

一般使用在近红外波段增透的摄影镜头来完成常规的近红外荧光成像。本文称这种系统为近红外宏观成像系统,其放大倍数通常 ≤ 1 ,适合小鼠全身及器官成像。当观察一些细微结构,如毛细血管或细胞分布时,则需要进一步增大放大倍数,实现显微成像。相较于NIR-I窗口,NIR-II窗口内的光子散射更弱,组织光吸收更强,且生物自发荧光较低,适合大深度高对比度造影。在NIR-II窗口内,组织光吸收的提升又可以进一步抑制散射光子及非焦面信号形成的成像背景,从而提升宽场激发显微术的光学切片能力。图11给出了经典的NIR-II荧光宏观及显微成像系统^[19]。通过挑选适配的显微物镜,NIR-II荧光宽场显微成像已经实现了从 $5\times$ 到 $70\times$ 的高质量显微造影,细节不断得到放大。最近,钱骏教授团队与舜宇光学集团有限公司合作开发了第一台商用正置NIR-II荧光宽场显微镜(NIR II-MS),实现了NIR-II荧光显微成像系统的国产化,推进了NIR-II荧光成像技术的普及与转化。

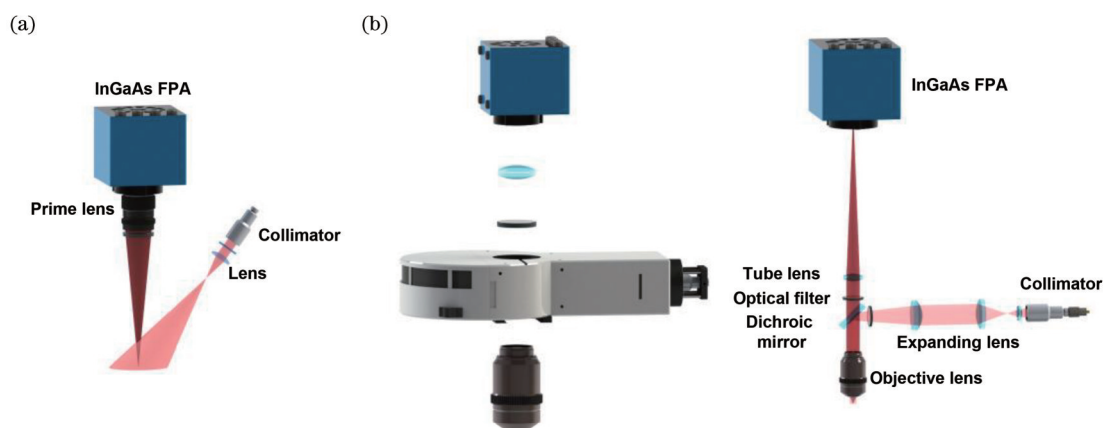


图 11 典型的面阵探测 NIR-II 荧光活体成像系统^[19]。(a)宏观活体 NIR-II 荧光成像系统;(b)宽场显微活体 NIR-II 荧光成像系统

Fig. 11 Typical NIR-II fluorescence *in vivo* imaging system based on the InGaAs array detector^[19]. (a) Macro NIR-II fluorescence *in vivo* imaging system; (b) wide-field NIR-II fluorescence *in vivo* microscopic imaging system

肿瘤的高渗透长滞留(EPR)效应使得纳米颗粒易富集并标记在肿瘤部位。利用NIR-II宏观大深度造影,目前已实现原位及皮下肿瘤的精准确

测,利于后期肿瘤光治疗及可视化引导肿瘤切除手术。宽场荧光显微成像技术使得研究者可以进一步对肿瘤微环境进行检测,如监测肿瘤的EPR效

应^[50]。如图 12(a)所示,具有强 NIR-II 发射的纳米颗粒静脉注射入荷瘤小鼠 24 h 后,在肿瘤组织处出现明显的渗漏和富集。此外,在新生肿瘤处的富集效果明显强于原肿瘤。

大视场小鼠脑血管成像可以较好地显示脑血管丰富的脉管结构,辅助操作者诊断脑损伤等^[111-112]。利用高速 NIR-II 成像系统,可以评估较大脉管的血流速度^[93, 113]。同时,解析脑血管显微结构意义重大。现目前,NIR-II 荧光显微成像可以用于精准定位毛细血管,精准、持续检测微米级血管血液流速,并适用于大深度脑血管造影。图 12(b)展示了肌肉注射了临床认证的造影剂 ICG 后,小鼠颅下约 850 μm 深

度内,不同深度的脑血管结构信息^[24];图 12(c)展示了 NIR-II 荧光脑血管显微成像对 MCAO 模型建立后的血管结构改变的检测^[26];图 12(d)展示了显微镜下对小鼠大脑毛细血管血液流速的定量分析^[50]。除了啮齿类动物^[114],NIR-II 荧光宽场显微成像技术同样可以对非人灵长类动物的脑血管结构进行大深度造影。如图 7(c)所示,借助 NIR-II 发光探针在长波长处明亮的荧光发射,不需要将颅骨完全移除,只需适当磨薄即可对猕猴进行高质量、大深度脑血管结构成像^[51];此外,在磨薄颅骨的前提下,研究者实现了对猕猴脑血管血流速度的定量评估,并对光诱导脑血管栓进行了精准检测^[51]。

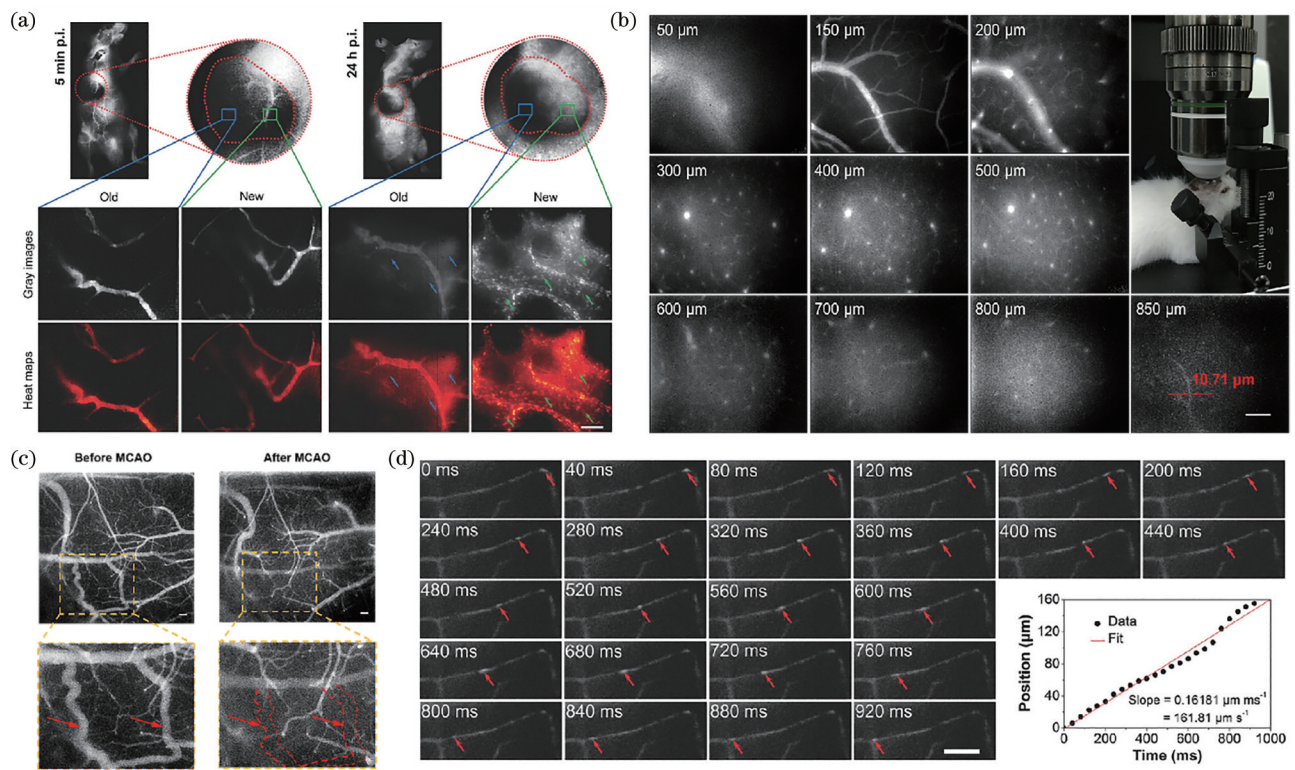


图 12 宽场显微活体 NIR-II 荧光功能成像。(a) 小鼠肿瘤血管 NIR-II 荧光显微成像,比例尺为 $100 \mu\text{m}$ ^[50]; (b) ICG 辅助 NIR-II 荧光脑血管显微成像,比例尺为 $100 \mu\text{m}$ ^[24]; (c) MCAO 线栓模型建立前后脑血管结构变化,比例尺为 $100 \mu\text{m}$ ^[26]; (d) 小鼠脑血管血流监测,比例尺为 $50 \mu\text{m}$ ^[50]

Fig. 12 Wide-field NIR-II fluorescence functional *in vivo* microscopic imaging. (a) NIR-II fluorescence microscopic imaging of tumor vessel, scale bar is $100 \mu\text{m}$ ^[50]; (b) ICG-assisted NIR-II fluorescence microscopic cerebral vasculature imaging, scale bar is $100 \mu\text{m}$ ^[24]; (c) structural changes of brain blood vessels in one mouse before and after the MCAO model establishment, scale bar is $100 \mu\text{m}$ ^[26]; (d) blood flow rate monitoring in the mouse brain, scale bar is $50 \mu\text{m}$ ^[50]

在生物学及临床研究中,对组织切片的检测至关重要。NIR-II 宽场显微成像技术的发光波长较常规成像技术更长,通常来说,激发光波长也会更长,故而组织的自发荧光会大大降低。得益于优质的成像效果,NIR-II 宽场荧光显微术在组织成像中也有所应用^[115]。此外,借助 NIR-II 波段的组织穿透

能力,研究者可以直接对组织块进行光学断层造影。该技术获得的信息与病理切片的数据可以形成良性互补,具有较好的临床转化前景。

4.2 从宽场激发显微成像到扫描激发显微成像

在宽场激发显微成像中,宽光束均匀地照射在样品上,在焦平面上下的荧光探针同时被激发。这

些光子在组织中传播时,不免会掺杂在有用信号中被一并收集。最终,荧光图像上会呈现出较强的背景干扰,影响操作者对细微结构的精准鉴别。光片显微术是一种可以有效降低非焦面信号干扰的光学切片成像技术。利用正交的面激发及面探测,光片显微术激发的区域可以和焦面匹配,致使焦面外的探针无法被有效激发,因此这种成像方式可以有效地抑制成像背景。此外,光片显微成像技术可以有效降低光损伤。斯坦福大学戴宏杰教授团队^[116]将光片显微镜与 NIR-II 窗口相结合,开发了大深度 NIR-II 光片显微成像技术。由于 NIR-II 光子在生物组织中的散射作用和吸收作用,激发和探测性能分别得到了提升。为了在高散射组织中实现光学断层能力,研究者开发了结构照明的 NIR-II 光片显微术,进一步抑制了成像背景并显著提升了空间分辨率^[117]。然而,由于要通过平面照明光对样品的焦面进行激发,光片显微术通常对生物组织的透明度有较高的要求。

在激光扫描荧光共聚焦显微镜中,将激发光束聚焦在样品表面,并在焦平面的共轭面上放置针孔,可以有效滤除非焦面的信号。将共聚焦扫描显微成像与 NIR-II 窗口相结合,可以对脉管结构进行高信背比成像。随着 NIR-II 共聚焦显微成像的发展,研究样本从离体组织转为活体组织^[118]。图 13(a)展示的是倒置 NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统和对小鼠尾静脉注射荧光团后局部卵巢的共聚焦成像效果^[119];图 13(b)展示的是 AIE 纳米探针标记的小鼠脑血管三维成像示意图^[118]。为了适应大动物的 NIR-II 荧光显微成像研究,钱骏教授团队同奚望、Roe 教授团队^[120]合作,开发了一套多维可调节的激光扫描 NIR-II 荧光共聚焦显微成像系统,成功实现了非人灵长类(恒河猴)脑血管显影,如图 13(c)所示。

除了共聚焦扫描显微术外,利用非线性光学效应,也可以实现背景抑制^[121-123]。由于非线性的光强依赖,双光子/多光子过程通常具有有限域性,只有在功率密度足够强的焦点附近才会发出双光子/多光子荧光。随着非线性效应阶数的增加,这种有限域性也会随之提升。综合分析组织光子吸收与散射,研究者发现 NIR-II 光具有更长的衰减长度^[124],因而将双光子/多光子的激发光波长和荧光波长均选定在这个窗口,成像深度可以得到显著提升。最近,钱骏教授团队搭建了 NIR-II 脉冲光激发且 NIR-II 荧

光探测的双光子荧光成像系统,并与武汉理工大学张明曦教授团队^[125]合作,实现了激发和探测都在 NIR-II 窗口内的双光子荧光成像,如图 14 所示。由于目前商用的 NIR-II 点探测器的探测效率较差,在 NIR-II 波段的组织光吸收可以降低面探测时的背景干扰,因此研究者们开发了基于 InGaAs 相机面探测的 NIR-II 双光子荧光成像系统,并利用该系统实现了小鼠穿颅脑血管显微造影,如图 14(b)所示。

4.3 从单通道到多通道活体功能成像

NIR-II 荧光成像使得复杂的生物结构变得可视化,然而单通道的模式常常不能满足应用需求,例如,在器官或组织间交互的研究中,常常需要对多个目标进行特异性标记;在临床术中显影时,常常需要对目标病灶与周围组织进行严格区分等。此时,多个造影通道可以为操作者提供多路生物信息,对复杂交互的结构进行精准定位。利用光谱对成像通道进行区分是一种常见的多通道成像方式,也即多波段(多色)成像;利用染料不同的发光寿命也可以对不同标记的目标进行多通道成像;此外,除了荧光(光致发光)成像,其他光学成像模式也可以作为不同的通道对生物信息进行补充。

4.3.1 多波段功能成像

每种染料均具有特异的能级分布,在光谱上呈现出不同的激发强度和荧光强度。通过挑选合适的激发谱带和荧光谱带,可以分别对目标染料分子发光进行放大/抑制或选择/滤除。在激发光模块中,可以通过在宽谱光源前放置窄带滤光片或直接选择不同波长特征的光源调控激发波长;在探测模块中,加入波长选择滤光片即可对收集通道进行选择。NIR-II 成像是了解活体生理变化或结构特性的有力途径。本质上来说,NIR-II 窗口的拓展又为荧光成像增加了一个可用的带宽。利用多路激发光或荧光的多通道 NIR-II 造影,可以获得更精确更详细的生物信息^[113, 126-127]。稀土离子掺杂纳米颗粒具有窄带的吸收和发射特性,在进行特异性激发和选择性荧光接收时,各个通道之间干扰较小,因而是进行多通道造影的有力候选探针。首都师范大学周晶教授团队^[128]利用两种分别在 730 nm 和 980 nm 激发下 NIR-II 发光的稀土掺杂纳米颗粒进行胃和肝脏的多通道造影。慕尼黑亥姆霍兹中心的 Bruns 及加利福尼亚大学 Sletten 团队^[129]开发了可调谐 NIR-II 发射的 flavylum polymethine 染料,再

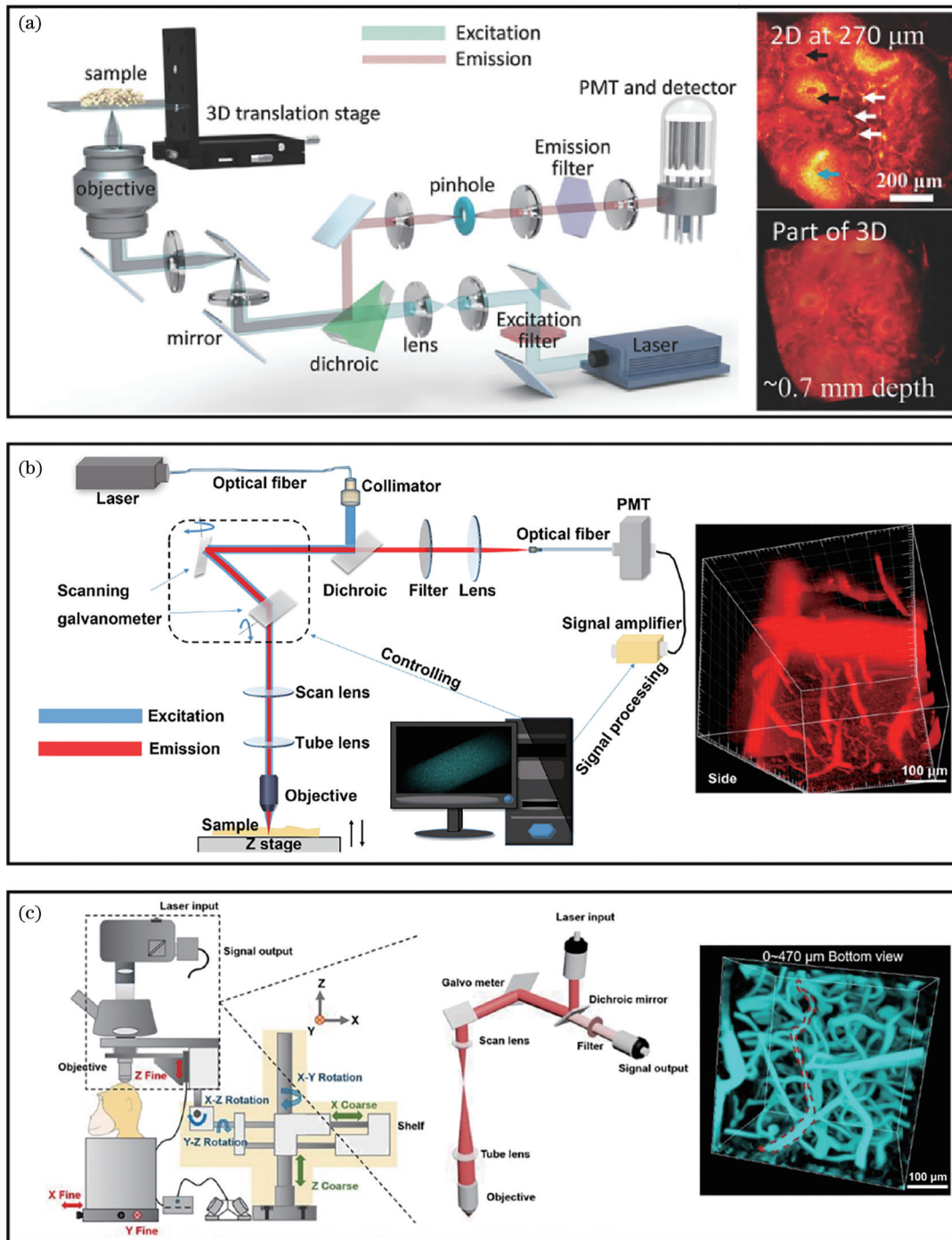


图 13 激光共聚焦扫描显微 NIR-II 荧光成像。(a) 倒置共聚焦显微成像系统和小鼠部分卵巢成像^[119]；(b) 正置共聚焦显微成像系统和小鼠脑血管 3D 成像^[118]；(c) 多维可调节大动物正置共聚焦显微成像系统和猕猴脑血管 3D 成像^[120]

Fig. 13 Laser scanning confocal NIR-II fluorescence microscopy. (a) Inverted confocal microscopy imaging system and partial ovarian imaging in mice^[119]; (b) upright confocal microscope imaging system and the 3D imaging of mouse brain vessel^[118]; (c) multi-direction adjustable upright confocal microscope imaging system suitable for large animals and the 3D imaging of monkey brain vessel^[120]

结合 ICG, 利用 785, 980, 1064 nm 光源, 分别对小鼠体内的三种染料进行激发, 实现了三通道活体示踪, 如图 15(a) 所示。此后, 他们又陆续合成了多种 NIR-II 发射的 Chromenylum Polymethine 染料, 实

现了高速四通道活体成像^[130]。美国国立卫生院陈元教授(现新加坡国立大学教授)、南方科技大学梁永晔教授、武汉理工大学张明曦教授及吉林大学朱守俊教授等^[131]合作, 利用两种不同波段发射的

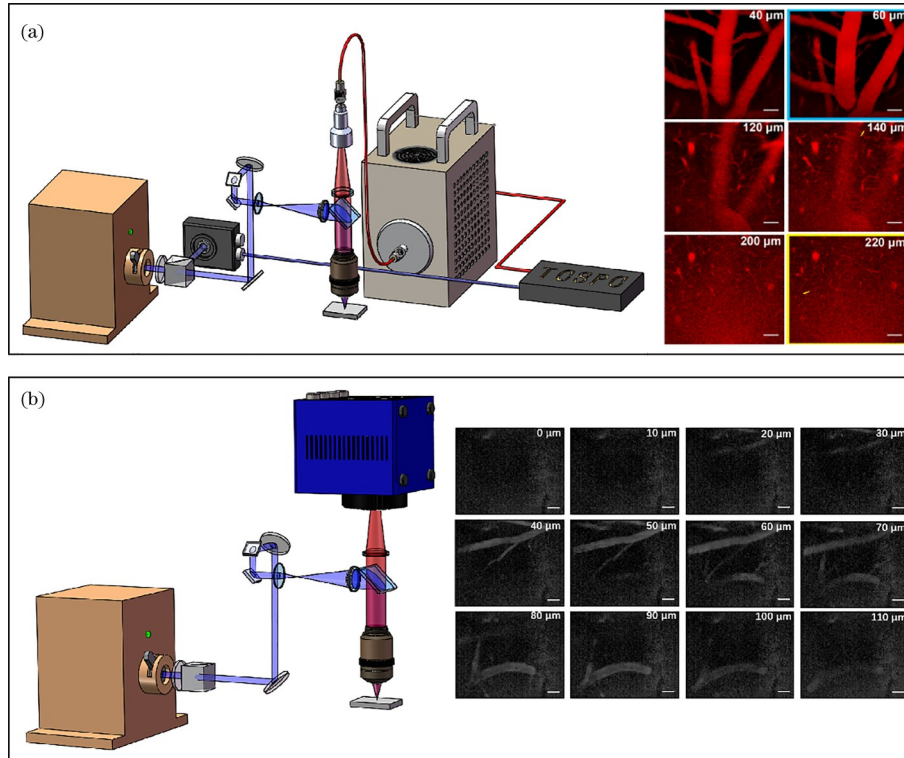


图 14 NIR-II 激发及 NIR-II 探测的双光子显微成像^[125]。(a) NIR-II 点探测的双光子显微成像系统和小鼠脑血管成像, 比例尺为 50 μm ; (b) NIR-II 面探测的双光子显微成像系统和小鼠脑血管成像, 比例尺为 50 μm

Fig. 14 Two-photon microscopy (2PM) with NIR-II excitation and NIR-II detection^[125]. (a) 2PM system with NIR-II point detection and the images of brain vessels, scale bar is 50 μm ; (b) 2PM system with NIR-II area detection and the images of brain vessels, scale bar is 50 μm

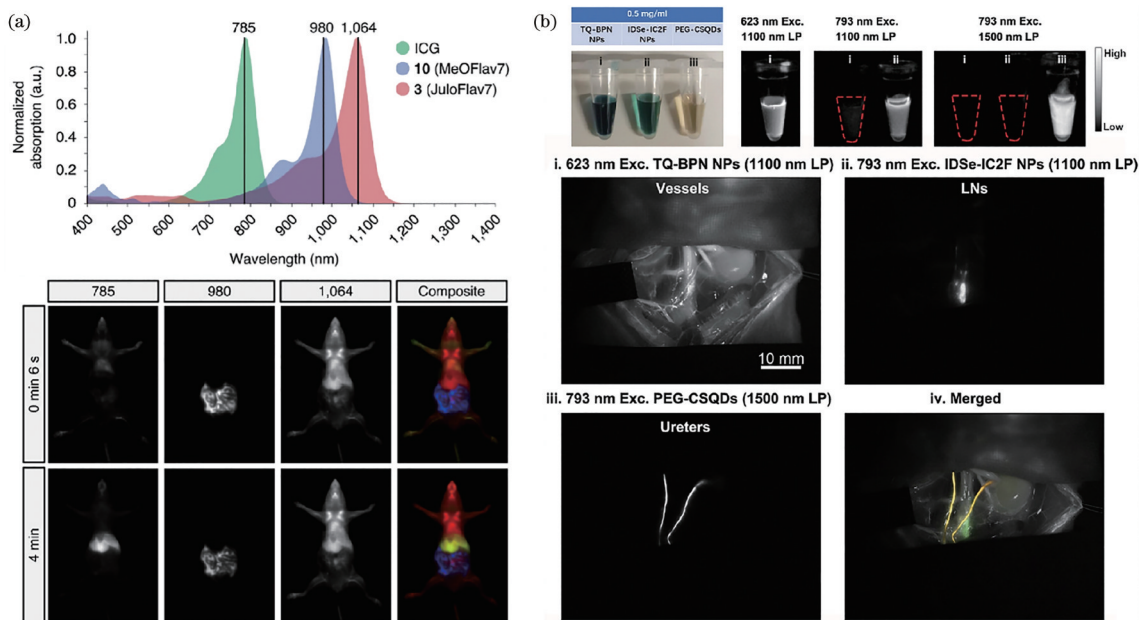


图 15 多色 NIR-II 荧光功能成像。(a) 几种荧光染料的吸收光谱和在不同波长激发下的小鼠三色成像^[129]; (b) 使用不同的激发光源和滤光片的荧光探针图像及利用三种探针实现血管、淋巴结及输尿管的三色成像^[132]

Fig. 15 Multicolor NIR-II fluorescence functional imaging. (a) Absorption spectra of three fluorescent dyes and the three-color imaging of mice using different excitation wavelengths^[129]; (b) images of the three fluorophores using different excitation sources and filters, and the three-color imaging of the mice with blood vessels, lymph nodes, and ureters^[132]

NIR-II 荧光探针,在强环境光下进行双通道 NIR-II 荧光导航手术,增加了手术的便利性。钱骏教授团队、附属邵逸夫医院林辉教授团队及苏州大学药学院李盛亮教授团队^[132]开展合作,借助三种在 NIR-II 窗口有不同激发及发射特性的纳米荧光探针,通过同时对激发光(623 nm 和 793 nm)和荧光收集通道(1100 nm 长波通和 1500 nm 长波通)进行调控,实现了血管、淋巴结、输尿管三通道精准检测,利于减小术中损伤,如图 15(b)所示。除此之外,利用不同波段通道内荧光强度的差异,也可以进行比率 NIR-II 荧光成像,精准定量生物指征^[106, 109, 133-138]。

4.3.2 光致发光寿命多通道成像

处于激发态的电子短暂停留后返回基态,发射光子的平均时间称为发光寿命。除了调控激发光及荧光收集波段,还可以通过筛选光致发光材料的发光寿命进行多通道成像^[139]。图 16(a)是基于光学斩波器的时间门控 NIR-II 光致发光时间分辨成像系统示意图,利用延迟探测来选择不同发光寿命的信息,这种检测方式通常用于毫秒级等较长的发光

寿命检测^[108]。要检测纳秒或皮秒级的发光寿命,时间相关单光子计数(TCSPC)技术是一种常用的方法^[118, 140]。基于 TCSPC 寿命检测技术的 NIR-II 共聚焦扫描显微成像系统如图 16(b)所示。利用三种不同寿命的 Er^{3+} 掺杂纳米颗粒,复旦大学张凡教授团队^[108]利用 NIR-II 发光寿命多通道成像定量检测了肿瘤亚型的生物标志物的表达。由于稀土离子发光寿命较长,一般在毫秒量级,通过延时门控很容易区分其与其他 NIR-II 发光探针。目前,在 NIR-IIb 区具有强发光的光学探针种类有限。斯坦福大学戴宏杰教授团队^[7]开发了 NIR-IIb 发光寿命多通道成像模式,先通过激发光的选择,将 NIR-IIb 发射 PbS/CdSe 量子点选择出来,此时 Er^{3+} 掺杂纳米颗粒不发光,再利用 1 ms 的时延,将 Er^{3+} 掺杂纳米颗粒与 PbS/CdSe 量子点区分开,如图 17(a)所示。最终,研究者实现了程序性死亡配体 1(PD-L1)和细胞毒性 T 淋巴细胞(CD8^+)的异质生物分布 NIR-IIb 区双通道定位,如图 17(b)所示。

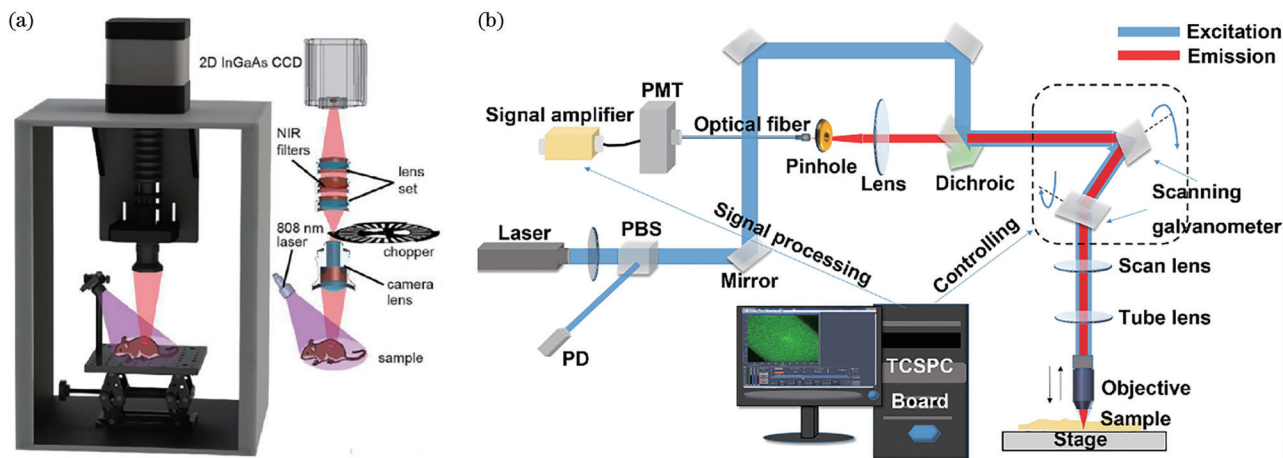


图 16 NIR-II 光致发光寿命成像系统。(a)基于光学斩波器的时间分辨成像系统^[108]; (b)基于 TCSPC 技术的寿命共聚焦显微成像系统^[118]

Fig. 16 NIR-II photoluminescence imaging system. (a) Time-resolved NIR-II optical imaging system based on the chopper^[108]; (b) NIR-II fluorescence lifetime microscopic imaging system based on the TCSPC technique^[118]

4.3.3 NIR-II 荧光+X 复合成像

没有一种成像技术能够满足所有需求,且不同的成像模式具有相应的优势。与荧光成像相比,光声成像更利于深层检测。这两种技术的结合利于完整、准确地解剖结构成像或检测疾病。为此,研究者开发了许多“二合一”探针,使其同时具有 NIR-II 荧光特性和光声特性^[141]。如图 18(a)所示,南京邮电大学范曲立与沈清明教授团队^[142]利用 NIR-II 荧光和光声双模态的成像技术精准观察了

荷瘤小鼠肿瘤的大小和位置。程震教授与中国药科大学附属盛京医院郭启勇教授团队^[143]合作,利用稀土离子掺杂纳米探针实现 NIR-II 和磁共振双模态成像,实现肝癌精准检测。利用聚合物与 Gd^{3+} 的螯合,范曲立教授团队^[56]构建了荧光、光声、磁共振三模态成像平台,实现对癌症的多模态诊疗。除此之外,计算机断层扫描(CT)成像也是一种深穿透、高分辨的成像模式。CT 可以作为 NIR-II 荧光成像的补充,有利于精准诊断^[144]。复

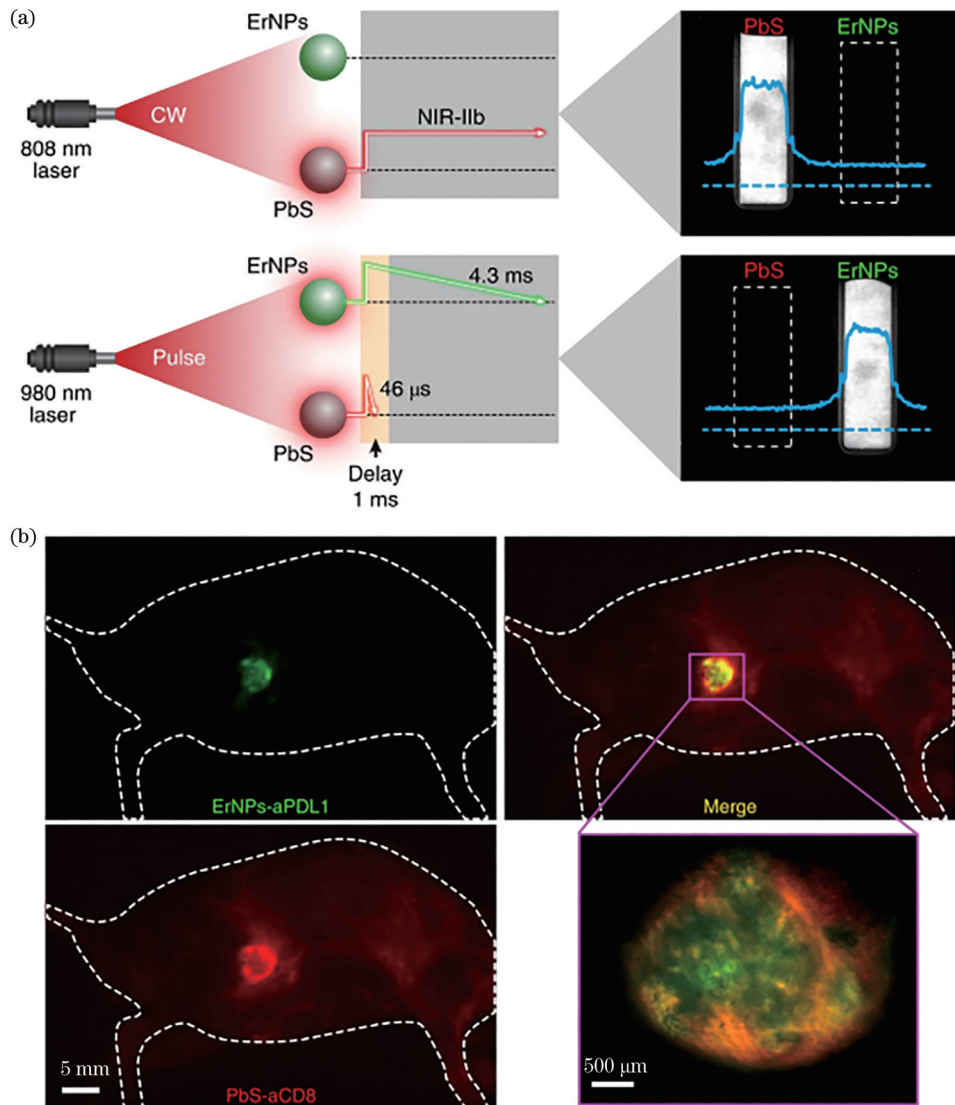


图 17 NIR-IIb 光致发光寿命活体多通道成像^[7]。(a)以 PbS/CdS 量子点及 Er³⁺ 掺杂纳米颗粒为发光探针的 NIR-IIb 光致发光双通道成像示意图；(b)结肠癌荷瘤小鼠的双色 NIR-IIb 光学成像

Fig. 17 Multi-channel NIR-IIb photoluminescence *in vivo* imaging^[7]. (a) Schematic of two-channel NIR-IIb photoluminescence imaging using the PbS/CdS quantum dots and Er³⁺-doped nanoparticles as probes; (b) two-color NIR-IIb optical imaging of the colon tumor mouse

旦大学李富友教授团队^[145]合成了稀土离子掺杂多功能纳米复合探针,利用 NIR-II 光学成像与 CT 成像,成功实现了肿瘤精准成像,如图 18(b)所示。此外,中科院苏州纳米技术与纳米仿生研究所陈光村、王强斌教授团队^[146]开发了一种 NIR-II 荧光+生物发光复合成像的方法,如图 18(c)所示。通过将 NIR-II 荧光成像与基于红色萤火虫荧光素酶 (RFLuc) 和高斯荧光素酶 (Col1A1-GLuc) 的生物发光成像三通道结合,实现了对移植后的人类间充质干细胞的精准定位,并观察了颅骨缺损小鼠成骨分化的状态^[146]。这些多模式复合成像技术的开发

为生物结构定位、动态功能解析等提供了便利。不同的成像模式相互补充使得成像越来越完整,信息越来越丰富。

5 多功能诊疗平台

相对分离的生物学诊断和治疗方式尚存在一定的局限性。我们已知,利用多模态 NIR-II 荧光成像技术,可以对生物结构或病灶组织进行精准解析和定位。在此基础上,将成像和治疗统一在一种纳米载体中,将活体示踪、靶向定位及精准治疗整合,即可实现诊疗一体化。

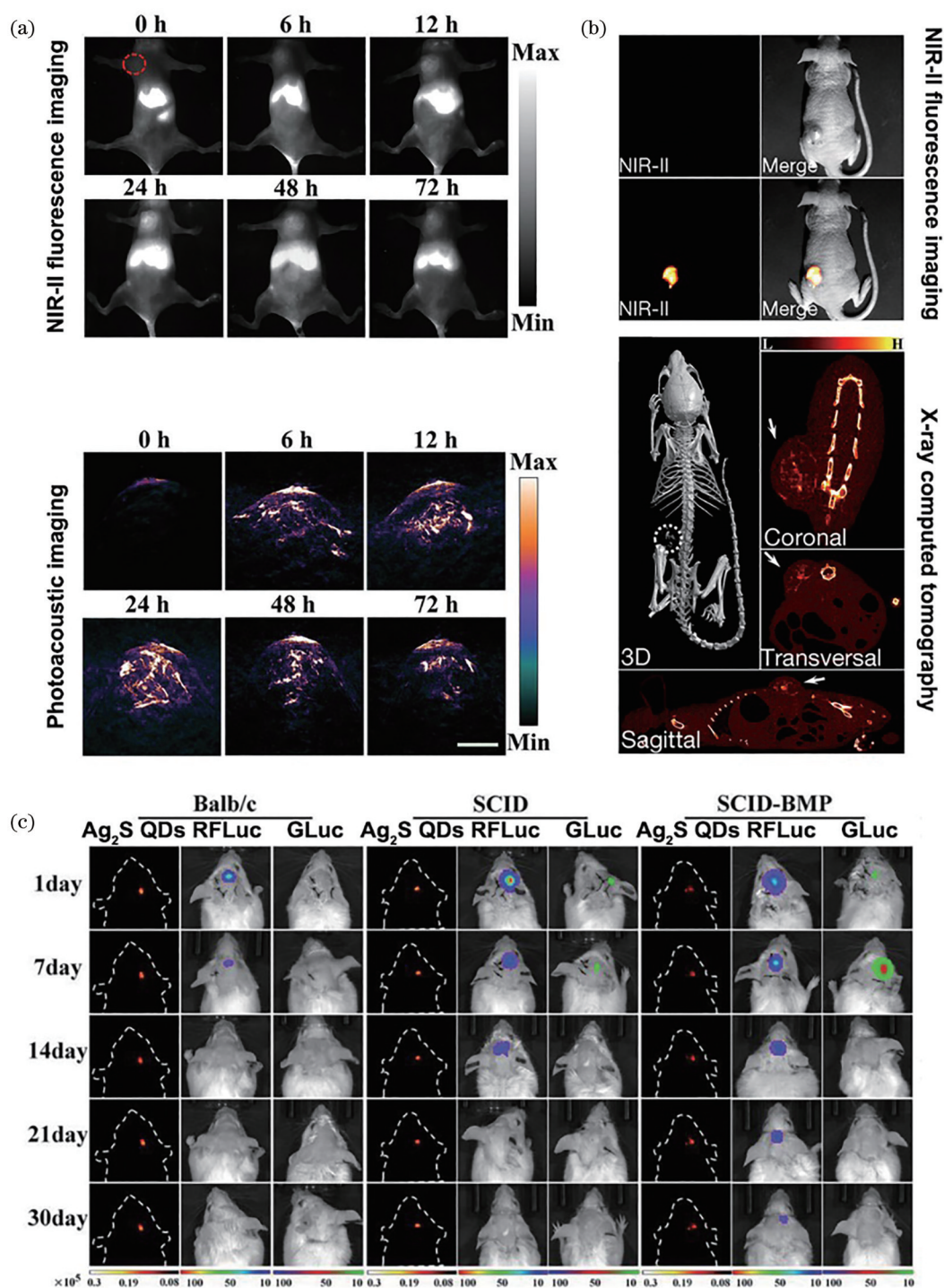


图 18 NIR-II 荧光 + X 多通道活体成像。(a) NIR-II 荧光与光声双通道活体成像^[142]；(b) NIR-II 荧光与 CT 双通道活体成像，比例尺为 3.5 mm^[145]；(c) NIR-II 荧光 (Ag₂S 量子点标记) 与生物发光 (红色萤火虫荧光素酶和高斯荧光素酶标记) 三通道活体成像^[146]

Fig. 18 NIR-II fluorescence + X multi-channel *in vivo* imaging. (a) NIR-II fluorescence/photoacoustic two-channel *in vivo* imaging^[142]; (b) NIR-II fluorescence/X-ray CT two-channel *in vivo* imaging, scale bar is 3.5 mm^[145]; (c) NIR-II fluorescence (Ag₂S quantum dots labeled)/dual bioluminescence (red firefly luciferase and Gauss luciferase labeled) three-channel *in vivo* imaging^[146]

5.1 NIR-II 光学成像引导下的光热治疗

光热治疗是一种利用光能转化成的热能进行

局域性细胞破坏,从而实现疾病治疗的手段。在常见的光电转换体系中,被激发的电子会有一部分经

过非辐射跃迁回到基态,从而产生热能,这就产生了光热效应。将成像窗口从短波长过渡到 NIR-II 窗口时,激发光也会相应红移。相比于可见波段,近红外光的组织穿透性较高,可以深入组织深部激发光热探针。因此,NIR-II 成像引导下的光热诊疗可以实现强强联合,精准诊疗^[64]。花菁类染料通常具有大吸光度、高量子产率及高光热转换效率的优势。利用在 NIR-II 有强拖尾荧光发射的商用花菁类小分子 IR-820,钱骏教授团队^[26]实现了 NIR-II 成像引导下皮下肿瘤光热治疗,注入血液中的小分子最终安全地排出体外,证明了该诊疗方案具有良好的临床转化前景。为了减小激发光照射对患者及操作者的损

伤,研究者们致力于开发新的具有高光热转换效率的光热探针,以实现安全、高效的病灶治疗。2018年,钱骏教授团队同唐本忠院士团队^[147]合作,开发了具有强 NIR-II 发射且高光热转换效率的 AIE 纳米探针,利用肿瘤的 EPR 效应,实现了皮下和原位膀胱癌肿瘤的标记,利用 785 nm 光束的激发,实现了对皮下肿瘤的治疗及对原位肿瘤的抑制。为了提高 NIR-II 探针对于肿瘤的靶向性,钱骏教授团队、林辉教授团队与唐本忠院士团队^[148]合作,通过电转使肿瘤外泌体结合在 NIR-II 强发射的 AIE 纳米荧光探针上,显著提升了肿瘤靶向能力,实现了特异性肿瘤靶向标记和精准光热治疗,如图 19(a) 所示。

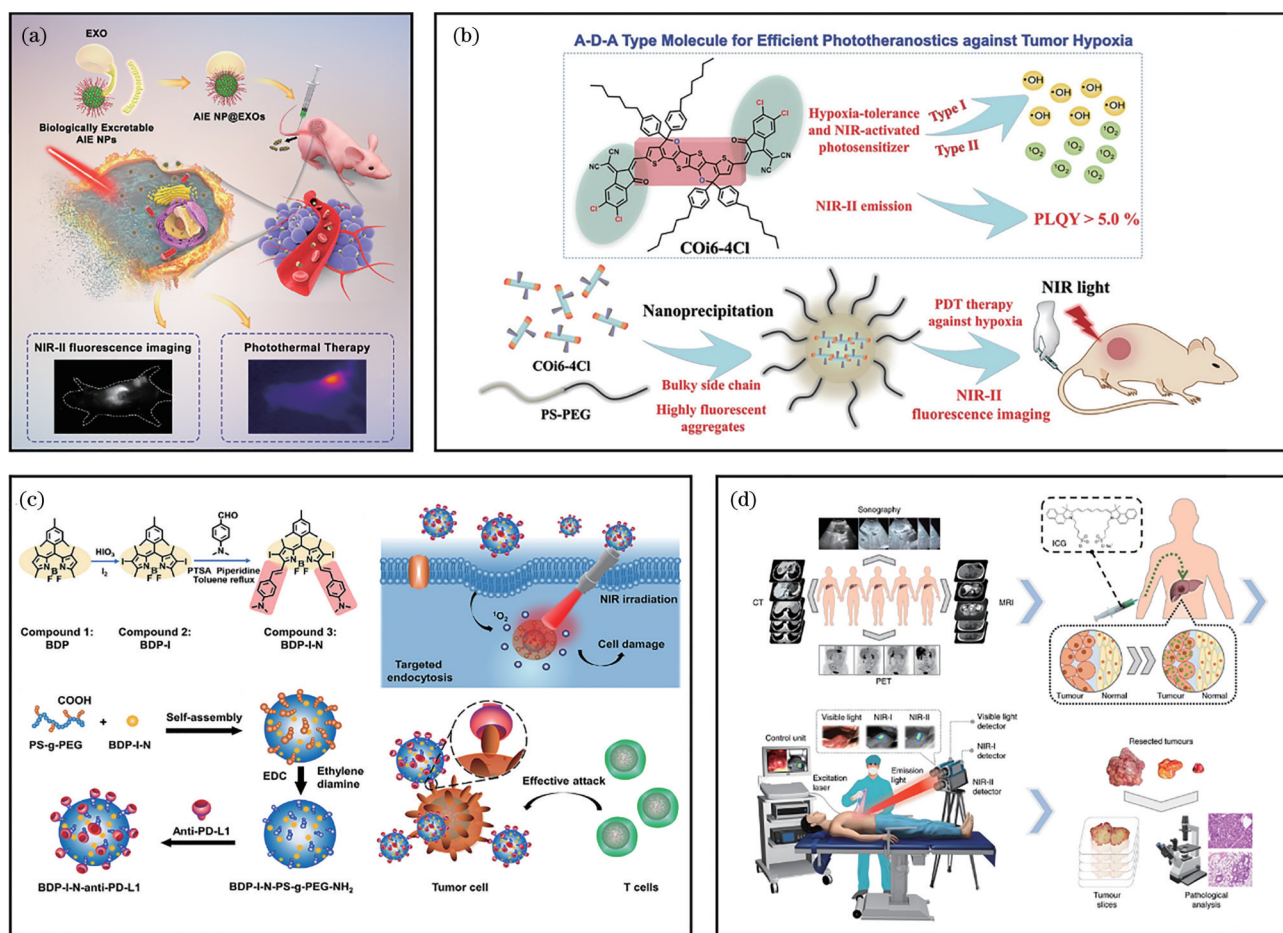


图 19 NIR-II 荧光成像引导下的多功能诊疗平台。(a) 肿瘤外泌体介导的肿瘤光热治疗^[148]; (b) 耐缺氧肿瘤光动力治疗^[150]; (c) 光动力及免疫复合肿瘤治疗^[151]; (d) 人类肝癌精准切除手术^[152]

Fig. 19 Multifunctional diagnosis and treatment platform guided by NIR-II fluorescence imaging. (a) Tumor cell-derived exosome (EXO) assisted photothermal therapy^[148]; (b) hypoxia-tolerant photodynamic theranostics of tumor^[150]; (c) dual photodynamic and immune therapy of tumor^[151]; (d) precious surgery of human liver tumor^[152]

5.2 NIR-II 光学成像引导下的光动力治疗

光动力治疗也是一种安全、微创、高效的光激活疗法。常见的光动力过程是光敏剂吸收激发光后,将环境中的氧气转化为活性氧,进而有效地损

伤癌细胞。研究者们致力于 NIR-II 光可激活的新一代光敏剂开发,以获得对深层组织的精准诊疗。深圳大学王东教授与唐本忠院士等^[149]设计和构建了一种新的 AIE 荧光团,可以有效实现包括荧光成

像、光声成像、光热成像、光热及光动力治疗等在内的多种光诊疗模式。在 NIR-II 荧光、光声及光热成像的引导下,通过光热及光动力协同治疗,实现了精确的肿瘤成像和肿瘤消除。常见的光动力药物利用具有氧气依赖性的 I 型光动力过程进行组织杀伤,而肿瘤组织中乏氧的环境是这类光动力疗法的致命缺点。为此,南方科技大学田雷蕾研究员团队^[150]开发了在特征波长激发下同时具备 I 型和 II 型光动力过程的光动力药物,该药物同时具有较强的 NIR-II 荧光发射,在缺氧条件下实现 NIR-II 成像引导下的肿瘤精准治疗,图 19(b)所示。

5.3 NIR-II 光学成像引导下的免疫治疗

免疫疗法近年来已成为一种有效的癌症治疗方法。免疫疗法旨在激活人体免疫系统,依靠自身免疫机能杀灭癌细胞和肿瘤组织。其中,PD-L1 单克隆抗体可以阻断癌细胞表面的 PD-L1 蛋白,重新激活 T 淋巴细胞实现免疫治疗。在近红外成像中,尤其是 NIR-II 成像在活体条件下为可视化肿瘤的免疫微环境和免疫疗法的免疫反应提供了技术支撑。为此,美国斯坦福大学戴宏杰教授团队^[7]开发了一种连有抗 PD-L1 抗体交联亲水聚合物层功能化的 Er^{3+} 掺杂发光纳米颗粒,它在 NIR-IIb 波段具有较强的下转换发光性能,可对癌症免疫治疗过程进行动态成像。结果发现经免疫治疗后的肿瘤微环境会存在细胞毒性 T 淋巴细胞,并且免疫激活后的肿瘤和脾脏中的 CD8 信号也会发生改变,实现了活体内肿瘤免疫微环境和免疫反应的可视化。为了提高肿瘤治疗的有效性,免疫治疗协同光动力治疗是目前可行的策略之一。四川大学姜楠和应国量、中国中医科学院王继刚、南京林业大学徐海军教授等^[151]合作,将 NIR-II 成像与免疫治疗及光动力治疗结合,开发了一种具有 PD-L1 抗体功能化的有机纳米颗粒,在 808 nm 激光激发下,对荷瘤小鼠上的肿瘤进行免疫及光动力联合治疗,治疗后,肿瘤被治愈且无复发,图 19(c)所示。

5.4 NIR-II 光学成像引导下的精准外科手术

精准外科是精准医疗在外科领域的延伸,遵循病灶清除、脏器保护和损伤控制三要素平衡法,实现患者最大化康复的目标。外科医生在术中可通过 NIR-II 荧光成像追踪淋巴结,标记肿瘤,显示血管、输尿管、神经等。在多组织实时 NIR-II 荧光成像引导下,术者可以彻底切除病变组织,同时避免正常组织损伤。中科院自动化研究所田捷研究员团队、

程震教授团队及 Gambhir 教授团队^[152]合作,利用 FDA 认证的染料 ICG,首次在可见光、NIR-I 和 NIR-II 窗口下进行了多光谱荧光成像引导的人肝脏肿瘤切除手术。他们发现,术中 NIR-II 成像导航提高了肿瘤检出率和肿瘤检测灵敏度,如图 19(d)所示^[152]。此外,中科院苏州纳米技术与纳米仿生研究所王强斌教授和李春炎研究员、苏州大学附属儿童医院郭万亮教授团队^[153]利用了一种酶激活的 NIR-II 荧光探针,在小鼠肿瘤腹膜转移模型中实现术中导航病灶切除。通过肉眼识别,切除的 33 个病灶的阳性率仅为 62%,而在 NIR-II 成像引导下切除 44 个病灶的阳性率达到 84%,这说明 NIR-II 术中导航可以实现对肿瘤病灶的有效识别。钱骏教授团队、林辉教授团队、苏州大学李盛亮教授团队^[132]开展了多通道近红外二区成像引导下淋巴结清扫术,借助 NIR-II 窗口具有更高信噪比、分辨率和穿透深度的优势,在示踪需切除的淋巴结的同时,清晰显示周围重要解剖结构(如血管、输尿管),在完整、彻底清扫淋巴结的前提下保证邻近重要组织器官不受损害,在多通道成像条件下实现了更精确的手术。

目前,光动力治疗、光热治疗、免疫治疗、精准外科治疗等手段结合 NIR-II 成像被开发用于精准诊疗。除此之外,化疗^[154]、纳米气体治疗^[67]、基因治疗^[155]等其他治疗方案也能够与 NIR-II 成像相结合。作为精准诊断的方式,光声成像、MRI、CT 等影像学手段在实际应用中也有着不同的评价标准。然而,不同的诊断及治疗策略均有各自的优势和不足,通过对不同疾病的分析,选择合适的影像学手段和治疗方案能实现患者个体化诊疗,意义不言而喻。

6 结束语

基于近红外二区窗口的生物医学光子学研究当下俨然是一大热点,科学家们致力于将 NIR-II 成像技术临床转化。

从机理上看,波长增长带来的散射降低、该窗口内生物组织光吸收对散射背景的抑制、生物组织自发荧光的明显下降是 NIR-II 窗口内生物光学成像质量优异的本质。1300 nm 以后,生物组织中水分子的吸光度明显抬升,使得该波长以后的二维面探测生物光学成像效果显著区别于之前的波段。笔者认为,将临床现有的 NIR-I 荧光术中导航技术拓展至 1300 nm 以上的 NIR-II 波段是实现精准医疗关键的一步。然而,目前临床上尚缺少在 1300 nm

以上有明显发射的可用染料。除此之外,在临床上,针对 NIR-II 波段的多模态光学检测仪器尚待开发。

包括有机半导体荧光探针、无机半导体量子点、稀土离子掺杂发光纳米颗粒在内的多种 NIR-II 发光染料已成功用于 NIR-II 多功能生物荧光成像。从临床转化的方向考虑,有机半导体小分子染料和无重金属无机发光纳米探针是具有转化潜力的 NIR-II 光学探针。对于小分子染料,优异的生物可排泄性值得被关注,但设计与合成在 1300 nm 以上高效发射,尤其是在 1450 nm 附近具有明亮发射的小分子染料仍是一大挑战。此外,仍需要全面评估外源性荧光探针的长期生物毒性。

NIR-II 活体宏观成像系统具有小于 1 的放大倍数,在基础研究中,常用于对小鼠、大鼠、兔子、狨猴等动物的全身或器官显影。在临床研究中,该系统可以满足术中外科操作、离体器官组织宏观活检等要求。NIR-II 显微成像系统则可以对微结构进行精准解析,在临床上,无需病理切片即可对离体组织器官进行组织显微分析。同时,NIR-II 荧光内窥系统的开发对腹腔镜下外科微创手术而言意义重大。NIR-II 宏观、显微、内窥等先进医疗影像设备的开发及临床转化是当下的研究热点之一。

在生物医学研究及临床实践中,任何单一的检测手段都具有局限性。将多模态 NIR-II 荧光成像与其他先进的影像学诊断方法有机结合,是一种实现多维度全面诊疗的有力途径。尽管该领域已经经过了十几年的发展,但要想真正推向临床,仍需要研究者们齐力。期待不久的未来,NIR-II 荧光成像技术可以为医疗事业带来变革。

参 考 文 献

- [1] Lim Y T, Kim S, Nakayama A, et al. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging[J]. *Molecular Imaging*, 2003, 2(1): 50-64.
- [2] Welsher K, Liu Z, Sherlock S P, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice[J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(11): 773-780.
- [3] Smith A M, Mancini M C, Nie S M. Bioimaging: second window for *in vivo* imaging[J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4(11): 710-711.
- [4] Chang B S, Li D F, Ren Y, et al. A phosphorescent probe for *in vivo* imaging in the second near-infrared window[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2021: 1-11.
- [5] Liu Y S, Li Y, Koo S, et al. Versatile types of inorganic/organic NIR-IIa/IIb fluorophores: from strategic design toward molecular imaging and theranostics[J]. *Chemical Reviews*, 2022, 122(1): 209-268.
- [6] 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.
- [7] Zhong Y T, Ma Z R, Wang F F, et al. *In vivo* molecular imaging for immunotherapy using ultra-bright near-infrared-IIb rare-earth nanoparticles[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(11): 1322-1331.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Wang T, Wang S F, Liu Z Y, et al. A hybrid erbium (III): bacteriochlorin near-infrared probe for multiplexed biomedical imaging[J]. *Nature Materials*, 2021, 20(11): 1571-1578.
- [11] Li J, Liu Y, Xu Y L, et al. Recent advances in the development of NIR-II organic emitters for biomedicine [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2020, 415: 213318.
- [12] Dai H M, Shen Q, Shao J J, et al. Small molecular NIR-II fluorophores for cancer phototheranostics[J]. *The Innovation*, 2021, 2(1): 100082.
- [13] Kou L, Labrie D, Chylek P. Refractive indices of water and ice in the 0.65- to 2.5- μm spectral range[J]. *Applied Optics*, 1993, 32(19): 3531-3540.
- [14] Bosschaart N, Edelman G J, Aalders M C G, et al. A literature review and novel theoretical approach on the optical properties of whole blood[J]. *Lasers in Medical Science*, 2014, 29(2): 453-479.
- [15] Bashkatov A N, Genina É A, Kochubey V I, et al. Optical properties of the subcutaneous adipose tissue in the spectral range 400 – 2500 nm[J]. *Optics and Spectroscopy*, 2005, 99(5): 836-842.
- [16] Benayas A, Hemmer E, Hong G S, et al. Near infrared-emitting nanoparticles for biomedical applications [M]. Cham: Springer, 2020.
- [17] Golovynskyi S, Golovynska I, Stepanova L I, et al. Optical windows for head tissues in near-infrared and

- short-wave infrared regions: approaching transcranial light applications[J]. *Journal of Biophotonics*, 2018, 11(12): e201800141.
- [18] Diao S, Hong G S, Antaris A L, et al. Biological imaging without autofluorescence in the second near-infrared region[J]. *Nano Research*, 2015, 8(9): 3027-3034.
- [19] Feng Z, Tang T, Wu T X, et al. Perfecting and extending the near-infrared imaging window[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10: 197.
- [20] Tanzid M, Hogan N J, Sobhani A, et al. Absorption-induced image resolution enhancement in scattering media[J]. *ACS Photonics*, 2016, 3(10): 1787-1793.
- [21] Carr J A, Aellen M, Franke D, et al. Absorption by water increases fluorescence image contrast of biological tissue in the shortwave infrared[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(37): 9080-9085.
- [22] Wu D, Xue D W, Zhou J, et al. Extrahepatic cholangiography in near-infrared II window with the clinically approved fluorescence agent indocyanine green: a promising imaging technology for intraoperative diagnosis[J]. *Theranostics*, 2020, 10(8): 3636-3651.
- [23] 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.
- [24] Yu X M, Feng Z, Cai Z C, et al. Deciphering of cerebrovasculatures via ICG-assisted NIR-II fluorescence microscopy[J]. *Journal of Materials Chemistry. B*, 2019, 7(42): 6623-6629.
- [25] Xue D W, Wu D, Lu Z Y, et al. Structural and functional NIR-II fluorescence bioimaging in urinary system via clinically approved dye methylene blue[J]. *bioRxiv*, 2020: 917955.
- [26] 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.
- [27] Zhu S, Hu Z, 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): e1802546.
- [28] Zhu S J, Yung B C, Chandra S, et al. Near-infrared-II (NIR-II) bioimaging via off-peak NIR-I fluorescence emission[J]. *Theranostics*, 2018, 8(15): 4141-4151.
- [29] 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 Ed. in English)*, 2018, 57(25): 7483-7487.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] Wan H, Ma H L, Zhu S J, et al. Developing a bright NIR-II fluorophore with fast renal excretion and its application in molecular imaging of immune checkpoint PD-L1[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(50): 1804956.
- [34] Wang W Z, Ma Z R, Zhu S J, et al. Molecular cancer imaging in the second near-infrared window using a renal-excreted NIR-II fluorophore-peptide probe[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(22): e1800106.
- [35] Li B H, Zhao M Y, Zhang F. Rational design of near-infrared-II organic molecular dyes for bioimaging and biosensing[J]. *ACS Materials Letters*, 2020, 2(8): 905-917.
- [36] 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.
- [37] Sun C X, Sun X F, Pei P, et al. NIR-II J-aggregates labelled mesoporous implant for imaging-guided osteosynthesis with minimal invasion[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(23): 2100656.
- [38] Fang Y, Shang J Z, Liu D K, et al. Design, synthesis, and application of a small molecular NIR-II fluorophore with maximal emission beyond 1200 nm [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(36): 15271-15275.
- [39] Sun Y, Qu C R, Chen H, et al. Novel benzo-bis(1, 2, 5-thiadiazole) fluorophores for *in vivo* NIR-II

- imaging of cancer[J]. *Chemical Science*, 2016, 7(9): 6203-6207.
- [40] Lin J C, Li Q Q, Zeng X D, et al. A novel small-molecule near-infrared II fluorescence probe for orthotopic osteosarcoma imaging[J]. *Science China Chemistry*, 2020, 63(6): 766-770.
- [41] Sun Y, Ding M M, Zeng X D, et al. Novel bright-emission small-molecule NIR-II fluorophores for *in vivo* tumor imaging and image-guided surgery[J]. *Chemical Science*, 2017, 8(5): 3489-3493.
- [42] Birks J B. *Photophysics of aromatic molecules*[M]. London: Wiley-Interscience, 1970: 1294-1295.
- [43] Takezaki M, Kawakami R, Onishi S, et al. Integrated fluorescent nanoprobe design for high-speed *in vivo* two-photon microscopic imaging of deep-brain vasculature in mice[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(20): 2010698.
- [44] Luo J, Xie Z, Lam J W, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1, 2, 3, 4, 5-pentaphenylsilole [J]. *Chemical Communications*, 2001(18): 1740-1741.
- [45] Kang M M, Zhang Z J, Song N, et al. Aggregation-enhanced theranostics: AIE sparkles in biomedical field[J]. *Aggregate*, 2020, 1(1): 80-106.
- [46] Qian J, Tang B Z. AIE luminogens for bioimaging and theranostics: from organelles to animals[J]. *Chem*, 2017, 3(1): 56-91.
- [47] Mei J, Leung N L C, Kwok R T K, et al. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! [J]. *Chemical Reviews*, 2015, 115(21): 11718-11940.
- [48] Xu Y Z, Li C B, Xu R H, et al. Tuning molecular aggregation to achieve highly bright AIE dots for NIR-II fluorescence imaging and NIR-I photoacoustic imaging[J]. *Chemical Science*, 2020, 11(31): 8157-8166.
- [49] Zhu W, Kang M M, Wu Q, et al. Zwitterionic AIEgens: rational molecular design for NIR-II fluorescence imaging-guided synergistic phototherapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(3): 2007026.
- [50] Qi J, Sun C W, Zebibula A, et al. Real-time and high-resolution bioimaging with bright aggregation-induced emission dots in short-wave infrared region [J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(12): e1706856.
- [51] Feng Z, Bai S Y, Qi J, et al. Biologically excretable aggregation-induced emission dots for visualizing through the marmosets intravitally: horizons in future clinical nanomedicine[J]. *Advanced Materials*, 2021, 33(17): e2008123.
- [52] 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.
- [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] Yu X M, Ying Y Y, Feng Z, et al. Aggregation-induced emission dots assisted non-invasive fluorescence hysteroigraphy in near-infrared IIb window[J]. *Nano Today*, 2021, 39: 101235.
- [55] Wu D, Liu S J, Zhou J, et al. Organic dots with large π -conjugated planar for cholangiography beyond 1500 nm in rabbits: a non-radioactive strategy[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(3): 5011-5022.
- [56] Hu X M, Tang Y F, Hu Y X, et al. Gadolinium-chelated conjugated polymer-based nanotheranostics for photoacoustic/magnetic resonance/NIR-II fluorescence imaging-guided cancer photothermal therapy[J]. *Theranostics*, 2019, 9(14): 4168-4181.
- [57] Chen Y, Sun B, Jiang X Y, et al. Double-acceptor conjugated polymers for NIR-II fluorescence imaging and NIR-II photothermal therapy applications[J]. *Journal of Materials Chemistry. B*, 2021, 9(4): 1002-1008.
- [58] Zhang W S, Huang T, Li J W, et al. Facial control intramolecular charge transfer of quinoid conjugated polymers for efficient *in vivo* NIR-II imaging[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(18): 16311-16319.
- [59] Verma M, Chan Y H, Saha S, et al. Recent developments in semiconducting polymer dots for analytical detection and NIR-II fluorescence imaging [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2021, 4(3): 2142-2159.
- [60] 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.
- [61] Liu Y, Liu J F, Chen D D, et al. Quinoxaline-based semiconducting polymer dots for *in vivo* NIR-II fluorescence imaging[J]. *Macromolecules*, 2019, 52(15): 5735-5740.
- [62] 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.
- [63] Liu M H, Zhang Z, Yang Y C, et al. Polymethine-based semiconducting polymer dots with narrow-band emission and absorption/emission maxima at NIR-II for bioimaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(2): 983-989.
- [64] 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.
- [65] Lu X M, Yuan P C, Zhang W S, et al. A highly water-soluble triblock conjugated polymer for *in vivo* NIR-II imaging and photothermal therapy of cancer [J]. *Polymer Chemistry*, 2018, 9(22): 3118-3126.
- [66] Zhang W S, Deng W X, Zhang H, et al. Bioorthogonal-targeted 1064 nm excitation theranostic nanoplatform for precise NIR-IIa fluorescence imaging guided efficient NIR-II photothermal therapy [J]. *Biomaterials*, 2020, 243: 119934.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] 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.
- [70] 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 Ed. in English)*, 2020, 59(47): 21049-21057.
- [71] Chen D D, Liu Y, Zhang Z, et al. NIR-II fluorescence imaging reveals bone marrow retention of small polymer nanoparticles[J]. *Nano Letters*, 2021, 21(1): 798-805.
- [72] Michalet X, Pinaud F F, Bentolila L A, et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 538-544.
- [73] Lu H P, Carroll G M, Neale N R, et al. Infrared quantum dots: progress, challenges, and opportunities [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(2): 939-953.
- [74] Lian W, Tu D T, Hu P, et al. Broadband excitable NIR-II luminescent nano-bioprobes based on CuInSe₂ quantum dots for the detection of circulating tumor cells[J]. *Nano Today*, 2020, 35: 100943.
- [75] Zebibula A, Alifu N, Xia L Q, et al. Ultrastable and biocompatible NIR-II quantum dots for functional bioimaging[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(9): 1703451.
- [76] Zhang M X, Yue J Y, Cui R, et al. Bright quantum dots emitting at ~1, 600 nm in the NIR-IIb window for deep tissue fluorescence imaging[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(26): 6590-6595.
- [77] He H, Lin Y, Tian Z Q, et al. Ultrasmall Pb:Ag₂S quantum dots with uniform particle size and bright tunable fluorescence in the NIR-II window[J]. *Small*, 2018, 14(11): e1703296.
- [78] Zhang J J, Lin Y, Zhou H, et al. Cell membrane-camouflaged NIR II fluorescent Ag₂Te quantum dots-based nanobioprobes for enhanced *in vivo* homotypic tumor imaging[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(14): e1900341.
- [79] Zhu C N, Jiang P, Zhang Z L, et al. Ag₂Se quantum dots with tunable emission in the second near-infrared window[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2013, 5(4): 1186-1189.
- [80] Chen L L, Zhao L, Wang Z G, et al. Near-infrared-II quantum dots for *in vivo* imaging and cancer therapy[J]. *Small*, 2021: e2104567.
- [81] Zhang M Y, Liu A N, Fu H H, et al. Regulation of silver precursor reactivity via tertiary phosphine to synthesize near-infrared Ag₂Te with photoluminescence quantum yield of up to 14.7% [J]. *Chemistry of Materials*, 2021, 33(24): 9524-9533.
- [82] Li C Y, Zhang Y J, Wang M, et al. *In vivo* real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1): 393-400.
- [83] Li C Y, Li F, Zhang Y J, et al. Real-time monitoring surface chemistry-dependent *in vivo* behaviors of protein nanocages via encapsulating an NIR-II Ag₂S quantum dot[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(12): 12255-12263.
- [84] Zhang Y, Hong G S, Zhang Y J, et al. Ag₂S

- quantum dot: a bright and biocompatible fluorescent nanoprobe in the second near-infrared window[J]. ACS Nano, 2012, 6(5): 3695-3702.
- [85] Hong G S, Robinson J T, Zhang Y J, et al. *In vivo* fluorescence imaging with Ag₂S quantum dots in the second near-infrared region[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2012, 51(39): 9818-9821.
- [86] Yang H C, Li R F, Zhang Y J, et al. Colloidal alloyed quantum dots with enhanced photoluminescence quantum yield in the NIR-II window[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(6): 2601-2607.
- [87] Yang H C, Huang H Y, Ma X, et al. Au-doped Ag₂Te quantum dots with bright NIR-IIb fluorescence for *in situ* monitoring of angiogenesis and arteriogenesis in a hindlimb ischemic model[J]. Advanced Materials, 2021, 33(37): e2103953.
- [88] Bruns O T, Bischof T S, Harris D K, et al. Next-generation *in vivo* optical imaging with short-wave infrared quantum dots[J]. Nature Biomedical Engineering, 2017, 1: 56.
- [89] Franke D, Harris D K, Chen O, et al. Continuous injection synthesis of indium arsenide quantum dots emissive in the short-wavelength infrared[J]. Nature Communications, 2016, 7: 12749.
- [90] Zhong Y T, Dai H J. A mini-review on rare-earth down-conversion nanoparticles for NIR-II imaging of biological systems[J]. Nano Research, 2020, 13(5): 1281-1294.
- [91] Fan Y, Zhang F. A new generation of NIR-II probes: lanthanide-based nanocrystals for bioimaging and biosensing[J]. Advanced Optical Materials, 2019, 7(7): 1801417.
- [92] Naczynski D J, Tan M C, Zevon M, et al. Rare-earth-doped biological composites as *in vivo* shortwave infrared reporters[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2199.
- [93] Zhong Y T, Ma Z R, Zhu S J, et al. Boosting the down-shifting luminescence of rare-earth nanocrystals for biological imaging beyond 1500 nm[J]. Nature Communications, 2017, 8: 737.
- [94] Liu Z, Yun B, Han Y, et al. Dye-sensitized rare earth nanoparticles with up/down conversion luminescence for on-demand gas therapy of glioblastoma guided by NIR-II fluorescence imaging[J]. Advanced Healthcare Materials, 2021: e2102042.
- [95] Liu Z, Ren F, Zhang H, et al. Boosting often overlooked long wavelength emissions of rare-earth nanoparticles for NIR-II fluorescence imaging of orthotopic glioblastoma[J]. Biomaterials, 2019, 219: 119364.
- [96] Wang C L, Lin H X, Ge X G, et al. Dye-sensitized downconversion nanoprobe with emission beyond 1500 nm for ratiometric visualization of cancer redox state[J]. Advanced Functional Materials, 2021, 31(16): 2009942.
- [97] Wang Q, Liang T, Wu J, et al. Dye-sensitized rare earth-doped nanoparticles with boosted NIR-IIb emission for dynamic imaging of vascular network-related disorders[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2021, 13(25): 29303-29312.
- [98] Shao W, Chen G Y, Kuzmin A, et al. Tunable narrow band emissions from dye-sensitized core/shell/shell nanocrystals in the second near-infrared biological window[J]. Journal of the American Chemical Society, 2016, 138(50): 16192-16195.
- [99] Xue Z L, Zeng S J, Hao J H. Non-invasive through-skull brain vascular imaging and small tumor diagnosis based on NIR-II emissive lanthanide nanoprobe beyond 1500 nm[J]. Biomaterials, 2018, 171: 153-163.
- [100] Li Y B, Zeng S J, Hao J H. Non-invasive optical guided tumor metastasis/vessel imaging by using lanthanide nanoprobe with enhanced down-shifting emission beyond 1500 nm[J]. ACS Nano, 2019, 13(1): 248-259.
- [101] Li Y B, Li X L, Xue Z L, et al. Second near-infrared emissive lanthanide complex for fast renal-clearable *in vivo* optical bioimaging and tiny tumor detection[J]. Biomaterials, 2018, 169: 35-44.
- [102] Wang W, Feng Z, Li B, et al. Er³⁺ self-sensitized nanoprobe with enhanced 1525 nm downshifting emission for NIR-IIb *in vivo* bio-imaging[J]. Journal of Materials Chemistry. B, 2021, 9(12): 2899-2908.
- [103] He S Q, Chen S, Li D F, et al. High affinity to skeleton rare earth doped nanoparticles for near-infrared II imaging[J]. Nano Letters, 2019, 19(5): 2985-2992.
- [104] Li D F, He S Q, Wu Y F, et al. Excretable lanthanide nanoparticle for biomedical imaging and surgical navigation in the second near-infrared window [J]. Advanced Science, 2019, 6(23): 1902042.
- [105] Zhang H X, Fan Y, Pei P, et al. Tm³⁺-sensitized NIR-II fluorescent nanocrystals for *in vivo* information storage and decoding[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2019, 58(30): 10153-

- 10157.
- [106] Wang S F, Liu L, Fan Y, et al. *In vivo* high-resolution ratiometric fluorescence imaging of inflammation using NIR-II nanoprobes with 1550 nm emission[J]. Nano Letters, 2019, 19(4): 2418-2427.
- [107] Wang P Y, Fan Y, Lu L F, et al. NIR-II nanoprobes *in-vivo* assembly to improve image-guided surgery for metastatic ovarian cancer[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2898.
- [108] Fan Y, Wang P Y, Lu Y Q, et al. Lifetime-engineered NIR-II nanoparticles unlock multiplexed *in vivo* imaging[J]. Nature Nanotechnology, 2018, 13(10): 941-946.
- [109] Pei P, Hu H X, Chen Y, et al. NIR-II ratiometric lanthanide-dye hybrid nanoprobes doped bioscaffolds for *in situ* bone repair monitoring[J]. Nano Letters, 2022: 1-9.
- [110] Pei P, Chen Y, Sun C X, et al. X-ray-activated persistent luminescence nanomaterials for NIR-II imaging[J]. Nature Nanotechnology, 2021, 16(9): 1011-1018.
- [111] Liu H L, Hong G S, Luo Z T, et al. Atomic-precision gold clusters for NIR-II imaging[J]. Advanced Materials, 2019, 31(46): e1901015.
- [112] Liu S J, Chen C, Li Y Y, et al. Constitutional isomerization enables bright NIR-II AIEgen for brain-inflammation imaging[J]. Advanced Functional Materials, 2020, 30(7): 1908125.
- [113] 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.
- [114] Qi J, Alifu N, Zebibula A, et al. Highly stable and bright AIE dots for NIR-II deciphering of living rats [J]. Nano Today, 2020, 34: 100893.
- [115] Fan X X, Xia Q M, Zhang Y Y, et al. Aggregation-induced emission (AIE) nanoparticles-assisted NIR-II fluorescence imaging-guided diagnosis and surgery for inflammatory bowel disease (IBD)[J]. Advanced Healthcare Materials, 2021, 10(24): e2101043.
- [116] Wang F F, Wan H, Ma Z R, et al. Light-sheet microscopy in the near-infrared II window[J]. Nature Methods, 2019, 16(6): 545-552.
- [117] Wang F F, Ma Z R, Zhong Y T, et al. *In vivo* NIR-II structured-illumination light-sheet microscopy[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(6): e2023888118.
- [118] 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.
- [119] Zhu S J, Herraiz S, Yue J Y, et al. 3D NIR-II molecular imaging distinguishes targeted organs with high-performance NIR-II bioconjugates[J]. Advanced Materials, 2018, 30(13): e1705799.
- [120] 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.
- [121] Zhang H Q, Xie W S, Chen M, et al. Aggregation-induced emission nanoparticles for *in vivo* three-photon fluorescence microscopic rat brain angiography [J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2019, 12(6): 1950012.
- [122] Wang Y L, Chen M, Alifu N, et al. Aggregation-induced emission luminogen with deep-red emission for through-skull three-photon fluorescence imaging of mouse[J]. ACS Nano, 2017, 11(10): 10452-10461.
- [123] Ni H W, Xu Z C, Li D Y, et al. Aggregation-induced emission luminogen for *in vivo* three-photon fluorescence lifetime microscopic imaging[J]. Journal of Innovative Optical Health Sciences, 2019, 12(5): 1940005.
- [124] Shi L Y, Sordillo L A, Rodríguez-Contreras A, et al. Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging[J]. Journal of Biophotonics, 2016, 9(1/2): 38-43.
- [125] Ni H W, Wang Y L, Tang T, et al. Quantum dots assisted *in vivo* two-photon microscopy with NIR-II emission[J]. Photonics Research, 2021, 10(1): 189-196.
- [126] Hao X X, Li C Y, Zhang Y J, et al. Programmable chemotherapy and immunotherapy against breast cancer guided by multiplexed fluorescence imaging in the second near-infrared window[J]. Advanced Materials, 2018, 30(51): e1804437.
- [127] Yu G T, Luo M Y, Li H, et al. Molecular targeting nanoprobes with non-overlap emission in the second near-infrared window for *in vivo* two-color colocalization of immune cells[J]. ACS Nano, 2019, 13(11): 12830-12839.
- [128] Jia Q, Ma L Y, Zhai X J, et al. Orthogonal near-infrared-II imaging enables spatially distinguishing tissues based on lanthanide-doped nanoprobes[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(21): 14762-14768.

- [129] Cosco E D, Spearman A L, Ramakrishnan S, et al. Shortwave infrared polymethine fluorophores matched to excitation lasers enable non-invasive, multicolour *in vivo* imaging in real time[J]. Nature Chemistry, 2020, 12(12): 1123-1130.
- [130] Cosco E D, Arús B A, Spearman A L, et al. Bright chromenylum polymethine dyes enable fast, four-color *in vivo* imaging with shortwave infrared detection[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(18): 6836-6846.
- [131] Tian R, Ma H L, Zhu S J, et al. Multiplexed NIR-II probes for lymph node-invaded cancer detection and imaging-guided surgery[J]. Advanced Materials, 2020, 32(11): e1907365.
- [132] Fan X X, Li Y R, Feng Z, et al. Nanoprobes-assisted multichannel NIR-II fluorescence imaging-guided resection and photothermal ablation of lymph nodes[J]. Advanced Science, 2021, 8(9): 2003972.
- [133] 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.
- [134] Zhao M Y, Wang J B, Lei Z H, et al. NIR-II pH sensor with a FRET adjustable transition point for *in situ* dynamic tumor microenvironment visualization [J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2021, 60(10): 5091-5095.
- [135] Liao N S, Su L C, Zheng Y S, et al. *In vivo* tracking of cell viability for adoptive natural killer cell-based immunotherapy by ratiometric NIR-II fluorescence imaging[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2021, 60(38): 20888-20896.
- [136] Ge X G, Lou Y H, Su L C, et al. Single wavelength laser excitation ratiometric NIR-II fluorescent probe for molecule imaging *in vivo*[J]. Analytical Chemistry, 2020, 92(8): 6111-6120.
- [137] Deng Z M, Bi S H, Jiang M Y, et al. Endogenous H₂S-activated orthogonal second near-infrared emissive nanoprobe for *in situ* ratiometric fluorescence imaging of metformin-induced liver injury[J]. ACS Nano, 2021, 15(2): 3201-3211.
- [138] Wang C L, Niu M, Wang W, et al. *In situ* activatable ratiometric NIR-II fluorescence nanoprobe for quantitative detection of H₂S in colon cancer[J]. Analytical Chemistry, 2021, 93(27): 9356-9363.
- [139] Zhu X Y, Liu X, Zhang H X, et al. High-fidelity NIR-II multiplexed lifetime bioimaging with bright double interfaced lanthanide nanoparticles[J]. Angewandte Chemie (International Ed. in English), 2021, 60(44): 23545-23551.
- [140] Yu J, Zhang R L, Gao Y F, et al. Intravital confocal fluorescence lifetime imaging microscopy in the second near-infrared window[J]. Optics Letters, 2020, 45(12): 3305-3308.
- [141] 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.
- [142] Wang Q, Dai Y N, Xu J Z, et al. All-in-one phototheranostics: single laser triggers NIR-II fluorescence/photoacoustic imaging guided photothermal/photodynamic/chemo combination therapy[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(31): 1901480.
- [143] Ren Y, He S Q, Huttad L, et al. An NIR-II/MR dual modal nanoprobe for liver cancer imaging[J]. Nanoscale, 2020, 12(21): 11510-11517.
- [144] Wang X D, Shi J P, Li P H, et al. LuPO₄: Nd³⁺ nanophosphors for dual-mode deep tissue NIR-II luminescence/CT imaging[J]. Journal of Luminescence, 2019, 209: 420-426.
- [145] Dai Y, Yang D P, Yu D P, et al. Mussel-inspired polydopamine-coated lanthanide nanoparticles for NIR-II/CT dual imaging and photothermal therapy [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(32): 26674-26683.
- [146] Huang D H, Lin S Y, Wang Q W, et al. An NIR-II fluorescence/dual bioluminescence multiplexed imaging for *in vivo* visualizing the location, survival, and differentiation of transplanted stem cells[J]. Advanced Functional Materials, 2019, 29(2): 1806546.
- [147] 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.
- [148] Li Y R, Fan X X, Li Y Y, et al. Biologically excretable AIE nanoparticles wear tumor cell-derived "exosome caps" for efficient NIR-II fluorescence imaging-guided photothermal therapy[J]. Nano Today, 2021, 41: 101333.
- [149] Zhang Z J, Xu W H, Kang M M, et al. An all-round athlete on the track of phototheranostics: subtly regulating the balance between radiative and nonradiative decays for multimodal imaging-guided synergistic therapy[J]. Advanced Materials, 2020, 32(36): e2003210.

- [150] Li L Q, Shao C, Liu T, et al. An NIR-II-emissive photosensitizer for hypoxia-tolerant photodynamic theranostics[J]. *Advanced Materials*, 2020, 32(45): e2003471.
- [151] Liu Q, Tian J W, Tian Y, et al. Near-infrared-II nanoparticles for cancer imaging of immune checkpoint programmed death-ligand 1 and photodynamic/immune therapy[J]. *ACS Nano*, 2021, 15(1): 515-525.
- [152] 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.
- [153] Zhan Y, Ling S S, Huang H Y, et al. Rapid unperturbed-tissue analysis for intraoperative cancer diagnosis using an enzyme-activated NIR-II nanoprobe [J]. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 2021, 60(5): 2637-2642.
- [154] Li Y, Lin J Y, Wang P Y, et al. Tumor microenvironment responsive shape-reversal self-targeting virus-inspired nanodrug for imaging-guided near-infrared-II photothermal chemotherapy[J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 12912-12928.
- [155] Li L, Yang Z, Zhu S J, et al. A rationally designed semiconducting polymer brush for NIR-II imaging-guided light-triggered remote control of CRISPR/Cas9 genome editing[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(21): e1901187.