

激活型近红外二区小分子生物成像

戴汉铭, 阮小红, 邵进军*, 董晓臣**

南京工业大学先进材料研究院, 江苏 南京 211816

摘要 近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)荧光成像(FLI)可以克服组织强吸收、高散射和自体荧光等问题,显著改善成像时空分辨率、信噪比和穿透深度,在重大疾病诊疗领域发挥着重要作用。在众多NIR-II荧光材料中,有机小分子因其生物相容性好、体内代谢快和生物安全性高等优点而呈现出巨大的临床转化潜力。目前,大多数NIR-II小分子为“always on”型,对病灶的检测缺乏精确度,导致诊断结果的不确定。激活型NIR-II小分子可在特定的生物标志物激活下产生特异性荧光信号,从而极大地提升检测的精准性和可靠性。系统总结了近年来用于生物成像的激活型NIR-II小分子,重点关注其分子结构设计策略及其生物成像性能。此外,对当前存在的问题、挑战和未来的发展方向进行了讨论。

关键词 生物成像; 近红外二区荧光成像; 有机小分子; 激活

中图分类号 Q-334 **文献标志码** A

doi: 10.3788/LOP202259.0617010

Activatable NIR-II Small Molecules for Bioimaging

Dai Hanming, Ruan Xiaohong, Shao Jinjun*, Dong Xiaochen**

Institute of Advanced Materials, Nanjing Tech University, Nanjing, Jiangsu 211816, China

Abstract The second near-infrared (NIR-II, 1000–1700 nm) fluorescence imaging (FLI) can overcome the problems of strong tissue absorption, high scattering, and auto-fluorescence, significantly improve the spatiotemporal resolution, signal-to-noise ratio, and penetration depth, so as to play a vital role in the diagnosis and treatment of major diseases. Among NIR-II fluorescent materials, small organic molecules present great potential for clinical transform by their good biocompatibility, fast metabolism, and high biosafety. At present, most always-on type NIR-II small molecules lack accuracy in the detection of lesions, leading to uncertainty in diagnosis. Activatable NIR-II small molecules can generate specific fluorescent signals under the activation of biomarkers, which greatly improves the accuracy and reliability of detection. This review systematically summarizes the recent progresses on activatable NIR-II small molecules for bioimaging, focusing on their molecular design strategies and bioimaging performance. In addition, the current problems, challenges, and future development directions are discussed.

Key words bioimaging; NIR-II fluorescence imaging; small organic molecules; activation

1 引言

近红外荧光成像(FLI)技术具有特异性强、灵敏度高和非侵入式等优点,近年,在基础研究和临床应用中得到广泛关注^[1-3]。近红外一区(NIR-I)

FLI依赖波长范围为650~900 nm的荧光穿透生物组织对病灶进行成像检测^[4-5]。然而,生物组织在NIR-I对光子的强吸收、高散射及自体荧光限制了NIR-I FLI对深层组织成像的分辨率^[6-8]。最新研究表明,相比于NIR-I FLI,NIR-II FLI较低的光

收稿日期: 2021-11-12; 修回日期: 2021-12-21; 录用日期: 2021-12-24

通信作者: *iamjjshao@njtech.edu.cn; **iamxcdong@njtech.edu.cn

吸收、散射效应和忽略不计的自体荧光使其具备出色的时空分辨率、信噪比和穿透深度,在深层组织早期病灶成像检测中呈现出明显优势,开发 NIR-II 荧光发射材料也因此成为生物成像领域的热点^[9-11]。

围绕 NIR-II FLI,一系列无机纳米材料(如碳纳米管、量子点和稀土掺杂纳米粒子)和有机材料(如半导体聚合物和共轭小分子)相继被开发出来^[12-14]。但无机纳米材料本身固有的生物相容性差、重复性低、代谢难及潜在的长期毒性等问题使其在临床转化方面面临困难^[15-16];有机材料因其良好的生物相容性和高的生物安全性而展现出较好的临床转化优势^[17-18]。特别是,共轭小分子因其结构明确、易代谢、性能可调等优点备受研究人员的青睐^[19-20]。2015年,有研究报道了首个具有 NIR-II 荧光发射的小分子 CH1055,掀起了对 NIR-II 小分子的研究热潮^[21]。随后,不同类型的 NIR-II 小分子被合成出来,并广泛应用于生物成像诊断与肿瘤治疗领域。由于纳米颗粒大多是通过高渗透长滞留效应(EPR)被动积累于靶点,且大多数为“always on”型,不可避免地在正常组织中富集,如果被激发就会产生荧光信号,降低成像信噪比,甚至出现假阳性现象^[22-24]。相比之下,激活型(“turn-on”)NIR-II 小分子只在疾病相关生物标志物刺激激发下才会产生激活信号,进一步提高生物成像的特异性和信噪比,对病灶的识别更为精准,对疾病的诊疗意义深远^[25-28]。

本文在系统总结激活型 NIR-II 小分子生物成像检测应用基础上,重点关注激活型 NIR-II 小分子的设计策略和成像性能;同时,对目前存在的问题、挑战及未来的发展方向进行讨论与展望,为激活型 NIR-II 小分子的开发提供一定思路。

2 激活型 NIR-II 小分子的开发

微环境是细胞间质及体液成分的统称,是细胞进行正常生理活动的重要保障。微环境成分的异变可导致细胞病变,进而发展为各种疾病。根据病理组织微环境中异常的生物标志物,研究人员设计开发出一系列激活型 NIR-II 小分子。在正常组织中,这些小分子通常不具备或者表现出微弱的荧光发射;当到达病灶部位时,生物标志物的刺激使其可通过分子结构变化实现荧光信号从“off”到“on”的转变,提高疾病诊断的精准性,为分子层面理解

病理机制和后续疾病治疗提供指导。目前,已开发的激活型 NIR-II 小分子可归纳为以下四类:活性物种激活型、酶激活型、pH 激活型和黏度激活型。

2.1 活性物种激活型

生物体内的活性物种对其生理过程有至关重要的影响,并在细胞信号传递、免疫和组织稳态中发挥着重要作用^[29-30]。活性物种的异常和过量表达往往也与各种疾病的产生和发展密切相关,开发活性物种激活型 NIR-II 小分子对疾病早期检测和发病机制的研究至关重要。目前,活性物种激活型 NIR-II 小分子设计所基于的活性物种可分为三大类:1) 活性氧物种(ROS),如羟基自由基($\cdot\text{OH}$)、过氧化氢(H_2O_2)、次氯酸根(ClO^-)和次氯酸(HClO);2) 活性氮物种(RNS),如一氧化氮(NO)和过氧亚硝酸阴离子(ONOO^-);3) 活性硫物种(RSS),如硫化氢(H_2S)。

2.1.1 $\cdot\text{OH}$ 激活

$\cdot\text{OH}$ 含量的异常通常与炎症、癌症和急性肝炎等病理过程密切相关,其可与生物体系中的 DNA、蛋白质和脂质等生物大分子反应,造成严重的氧化应激损伤^[31]。基于此,Feng 等^[32]采用共轭系统和刚性平面结构打破-恢复的可逆策略,开发出一种可检测 $\cdot\text{OH}$ 的小分子(Hydro-1080),如图 1(a)所示。Hydro-1080 具有非平面结构和较差的分子共轭性,在可见光区表现出微弱吸收且不具备任何荧光。Hydro-1080 一侧的 C—N 单键作为 $\cdot\text{OH}$ 识别位点被 $\cdot\text{OH}$ 氧化为 C=N 双键,生成具有完整共轭和平面结构的分子(Et-1080),表现出良好的 NIR-II 吸收和荧光,如图 1(b)所示。体外实验表明:Hydro-1080 对 $\cdot\text{OH}$ 的成像识别具有高灵敏度和强特异性;此外,在对乙酰氨基酚(APAP)诱导的小鼠肝损伤模型中, $\cdot\text{OH}$ 的细微变化可以被激活的 NIR-II FLI 所检测,呈现出清晰图像和高对比度,如图 1(c)所示。

2.1.2 H_2O_2 激活

内源性 H_2O_2 具有强氧化性,对生物大分子同样具有攻击活性。例如,异烟肼是目前批准可用于治疗结核病的主要药物之一,长期服用会导致严重的肝损伤并伴随着 H_2O_2 高表达,如何对异烟肼诱导的肝损伤进行检测是目前面临的难题^[33]。鉴于激活型 NIR-II 小分子的光学成像特性,Chen 等^[34]基于含三氟吡喃的七甲胺骨架设计开发出一种 H_2O_2 激活型小分子(TC- H_2O_2),如图 2(a)所示。硝基苯氧

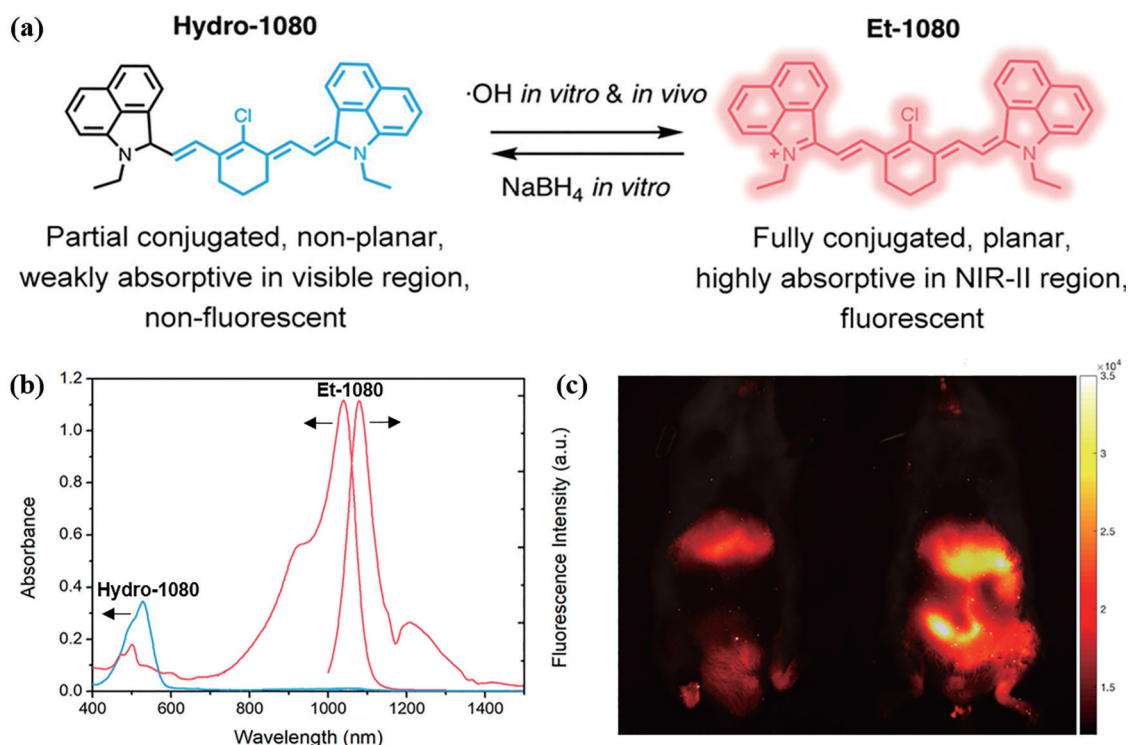


图 1 —OH 激活型小分子^[32]。(a) Hydro-1080 和 Et-1080 的结构及相互转化；(b) Hydro-1080 和 Et-1080 的吸收和荧光发射光谱；(c) 小鼠体内 NIR-II FLI

Fig. 1 —OH-activated small molecule^[32]. (a) Structure and mutual transformation of Hydro-1080 and Et-1080; (b) absorption and fluorescence spectra of Hydro-1080 and Et-1080; (c) *in vivo* NIR-II FLI of mice

乙酰胺基团与七甲胺之间的光致电子转移 (PET) 过程使 TC-H₂O₂ 仅具有 680 nm 吸收峰和十分微弱的荧光。作为 H₂O₂ 识别基团, 硝基苯氧乙酰胺基团可以被诱导断裂脱除, 阻断 PET 过程, 生成具有 755 nm 吸收峰的小分子 (TC-NN), 同时其在 920~1020 nm 的荧光显著增强; TC-NN 的荧光和光声信号与 H₂O₂ 浓度也呈现出良好的线性关系, 如图 2(b) 所示, 在 30 min 内可达到最大值。进一步研究表明, TC-H₂O₂ 的响应具有高选择性和抗干扰性, 通过 NIR-II 荧光、多光谱光声断层扫描 (MOST) 双模成像实现了对异烟肼导致小鼠肝损伤的精准检测, 如图 2(c) 和 2(d) 所示。

2.1.3 ClO⁻/HClO 激活

ClO⁻ 和 HClO 由过氧化氢与氯离子通过髓过氧化物酶催化产生, 在人体免疫功能系统中起重要作用^[35]。低浓度的 ClO⁻ 和 HClO 可以破坏入侵的细菌和病原体, 引导生物体生理平衡, 过度表达则会导致癌症和炎症等疾病^[36]。为实现生物体内 ClO⁻ 的检测, Tang 等^[37] 提出了一种可生物消除分子间供体-受体相互作用的通用设计策略, 采用两亲性聚合物 PEG-b-PPG-b-PEG (PEG 为聚乙二醇,

PPG 为聚丙二醇), 包覆有机小分子受体 (ITTC) 和半导体聚合物供体 (PDF), 开发出一种 NIR-II 荧光探针 (SPNP25), 如图 3(a) 所示。由于 ITTC 和 PDF 的最高占据分子轨道 (HOMO)/最低未占分子轨道 (LUMO) 能级一致且两者具有良好的相容性, 它们之间可以产生 PET 过程, 淬灭 PDF 的 NIR-II 荧光; 但 ITTC 可被 ClO⁻ 特异性降解, 阻断 PET 过程, 使 PDF 的 NIR-II 荧光恢复, 实现 ClO⁻ 的特异性成像检测。特别值得注意的是, 尾静脉注射 5 h 后, SPNP25 在 ClO⁻ 诱导的小鼠炎症组织处的荧光强度是正常组织处的 17.5 倍, 表现出很高的成像对比度, 如图 3(b) 所示。

随后, Ge 等^[38] 将可活化的 NIR-II 小分子 (SeTT) 修饰于三价铈离子 (Er³⁺) 掺杂的下转换纳米颗粒 (DCNP) 表面, 设计开发了一种单波长激发的比率型荧光探针 (DCNP@SeTT), 如图 3(c) 所示。HClO 可氧化 SeTT 噻吩单元上的硫转变为砜, 使 SeTT 在 1150 nm 处的荧光强度降低, 具有 1550 nm 荧光发射的 DCNP 则作为探针内标, 在 980 nm 单波长激光激发下, 探针在 1150 nm 和 1550 nm 处的比率荧光信号 ($I_{1150\text{ nm}}/I_{1550\text{ nm}}$) 与 HClO

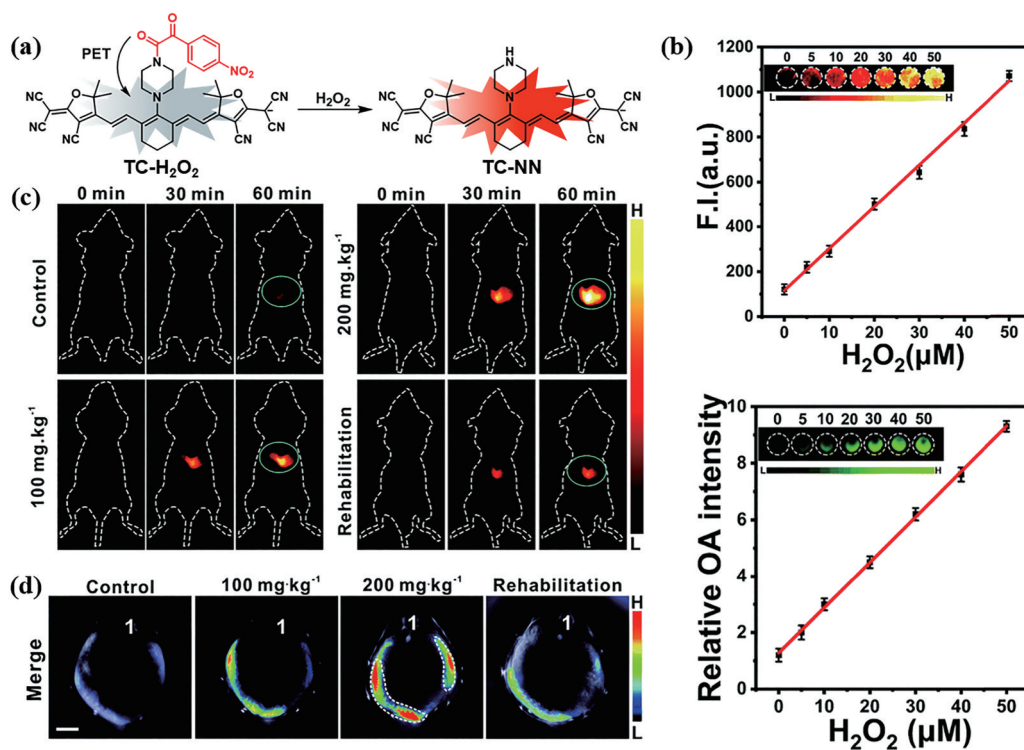


图 2 H_2O_2 激活型小分子^[34]。(a) TC- H_2O_2 的结构及荧光激活；(b) 荧光和光声信号与 H_2O_2 浓度的线性拟合；(c) 小鼠体内的 NIR-II FLI；(d) 小鼠肝部位的 MOST

Fig. 2 H_2O_2 -activated small molecule^[34]. (a) Structure and fluorescence activation of TC- H_2O_2 ; (b) linear fit of fluorescence and photoacoustic signals to H_2O_2 concentration; (c) *in vivo* NIR-II FLI of mouse; (d) MOST of mouse liver

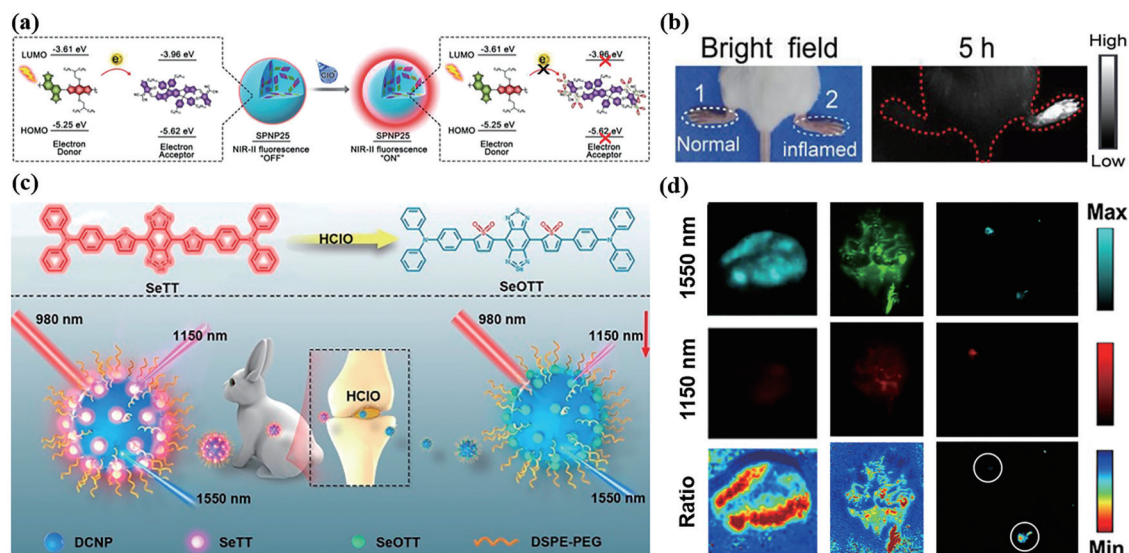


图 3 基于 $ClO^-/HCIO$ 激活型小分子的 NIR-II 荧光探针^[37-38]。(a) SPNP25 的荧光激活机理；(b) SPNP25 在正常部位和炎症部位的 NIR-II FLI；(c) DCNP@SeTT 的构建及激活机理；(d) 小鼠肿瘤、炎症部位和兔骨关节炎的 NIR-II 比例 FLI

Fig. 3 NIR-II fluorescent probes based on $ClO^-/HCIO$ -activated small molecules^[37-38]. (a) Fluorescence activation mechanism of SPNP25; (b) NIR-II FLI of SPNP25 at normal and inflammation sites; (c) construction and activation mechanisms of DCNP@SeTT; (d) NIR-II ratiometric FLI of mouse tumors, inflammation sites, and rabbit osteoarthritis

的浓度呈线性关系,其有效检测浓度可低至 $4.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该探针成功应用于肿瘤发展、炎症小鼠模型腹腔解剖结构的可视化以及兔骨关节炎模型中的 HClO 浓度检测,如图 3(d)所示,表现出快速响应性和高检测选择性。

2.1.4 NO 激活

NO 在肝脏生理学和病理生理学中起重要作用,许多慢性疾病与它的过度表达密切相关,其中最常见的是肝损伤引起的肝脏炎症。为实现 NO 的体内检测,Tang 等^[39]通过酰胺化反应将聚苯乙烯-马来酸酐共聚物(PSMA)和 NO 敏感分子(FTBD)链接,合成了一种有机半导体纳米探针(AOSNP),如图 4(a)所示。较弱的电子受体苯并[c][1,2,5]噻二唑-5,6-二胺使 FTBD 仅表现出 NIR-I 区荧光发射,而 NO 可以诱导苯并[c][1,2,5]噻二唑-5,6-二胺受体转变为拉电子性能更强的苯并三唑衍生物受体,促进分子内电荷转移(ICT),有效降低分子能隙,使分子荧光发射从 NIR-I 区红移至 NIR-II 区,表现出 0.35% 的荧光量子产率。体外实验表明,AOSNP 对 NO 的检测具有高特异性,低检测限($3.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)及较短的反应时间(3 min),可成功应用于小鼠体内 APAP 诱导肝毒性引起的剂量依赖性 NO 活性的

原位、实时和无创检测。

以含双甲氧基苯胺的二氢氧杂蒽单元作为电子供体,喹啉单元作为电子受体,Sun 等^[40]开发了一种供体- π -受体结构的 NO 激活型小分子(QY-N),如图 4(b)所示。供电子丁胺基团的修饰使得喹啉单元的拉电子性能削弱,分子荧光淬灭,QY-N 仅表现出 670 nm 左右的特征吸收峰和微弱荧光;在 NO 存在下,NO 诱导的亚硝化反应可以使丁胺基团转变为丁基-N-亚硝基基团,增强喹啉受体的拉电子能力,促进电荷推-拉效应,使激活后分子(QY-NO)的光谱发生显著红移(700~850 nm 吸收和 910~1110 nm 荧光发射);此外,QY-NO 的聚集诱导发光(AIE)特性使其在二甲基亚砜(DMSO)溶剂中具有 0.48% 的荧光量子产率。体外实验表明,QY-N 对 NO 的响应具有高选择性,且对 NO 供体 N-二乙氨基-N-氧代亚硝酰胺钠盐(DEA·NONOate)的检测极限低至 $2.3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,实现了对雷公藤内酯(TP)诱导肝损伤中 NO 的无创、原位 NIR-II 荧光、光声双模成像检测。特别地,通过 3D MOST 提供的时空信息还可以精确描绘出肝损伤部位及大小,实现 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对肝损伤治疗过程中康复情况的监测,如图 4(c)所示。

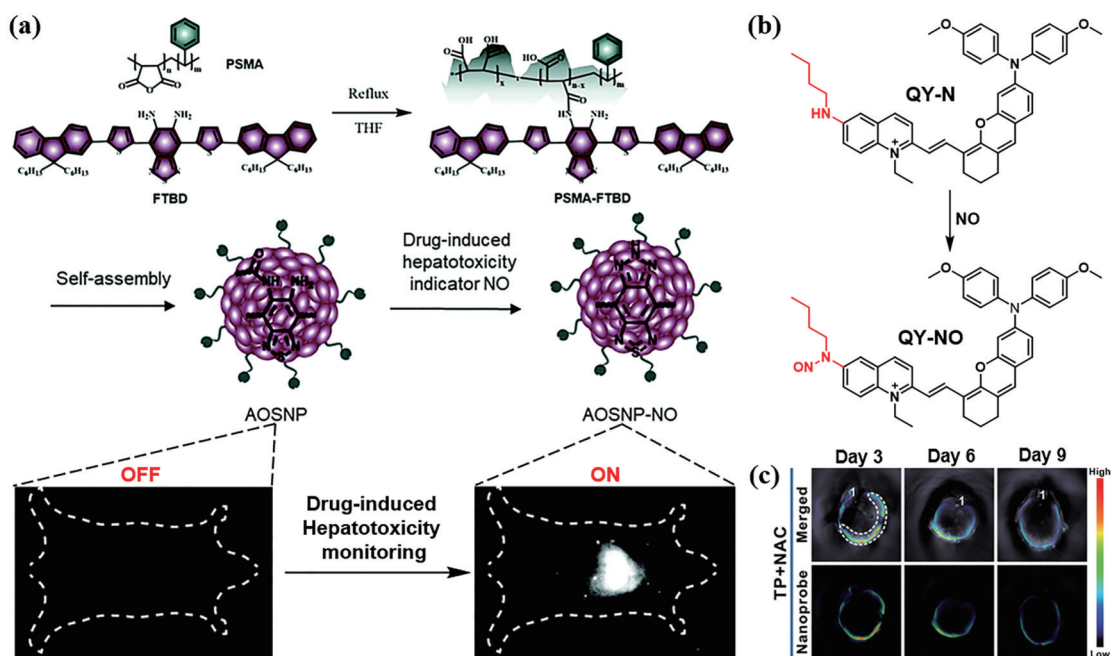


图 4 NO 激活型小分子^[39-40]。(a) AOSNP-NO 的构建和体内 NIR-II FLI; (b) QY-N 的荧光激活机理; (c) MOST 检测小鼠肝损伤恢复情况

Fig. 4 NO-activated small molecules^[39-40]. (a) Construction of AOSNP-NO and *in vivo* NIR-II FLI; (b) fluorescence activation mechanism of QY-N; (c) MOST to detect the recovery of liver injury in mice

2.1.5 ONOO⁻ 激活

ONOO⁻ 由 NO 和 O₂⁻ 结合而产生, 涉及广泛生理和病理过程, 它的产生被认为是药物诱导肝毒性的早期征兆, 开发 ONOO⁻ 激活型 NIR-II 小分子对肝毒性早期检测具有重要意义^[41-43]。Li 等^[44] 将苯硼酸酯单元引入苯并硫吡喃菁染料骨架中, 开发出一种 ONOO⁻ 激活型小分子 (IRBTP-B)。苯硼酸酯单元的引入导致 IRBTP-B 的共轭 π 电子体系一分为二, 促使其 NIR-II 荧光淬灭。ONOO⁻ 可诱导分子内部发生氧化反应和电子重排, 脱除苯硼酸酯单元生成具

有完整共轭结构的分子 (IRBTP-O), 如图 5(a) 所示, 使得 NIR-II 荧光恢复。含有 IRBTP-O 的纳米胶束在甲醇中表现出 0.1% 的荧光量子产率且可在 5 mm 穿透深度处检测到可靠的荧光激活信号; 进一步研究表明, IRBTP-B 激活过程对 ONOO⁻ 具有快速响应性 (3 min)、低检测限 ($5.59 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高度选择性。其他因素, 例如生物硫醇 (半胱氨酸和硫氢化钠)、ROS 及其他 RNS 对激活过程没有明显的影响。使用该分子可高效且选择性地检测 ONOO⁻ 以监控 APAP 引起的临床前肝损伤。

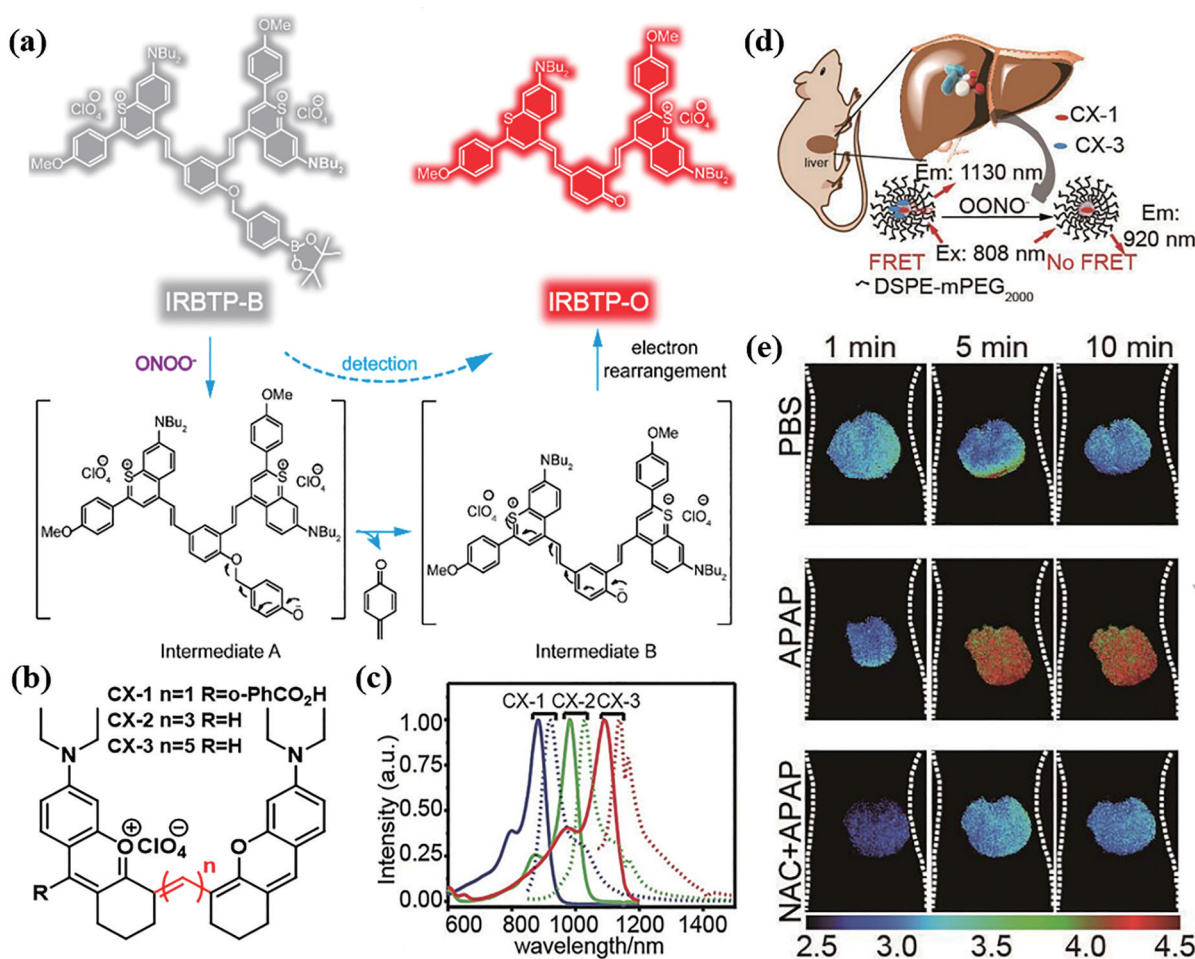


图 5 ONOO⁻ 激活型小分子及探针^[44-45]。(a) IRBTP-B 的结构转化; (b) CX-1、CX-2 和 CX-3 的分子结构; (c) CX-1、CX-2 和 CX-3 的吸收和荧光发射光谱; (d) PN1100 的检测机制示意图; (e) 小鼠肝部位的比例图像

Fig. 5 ONOO⁻-activated small molecules and probes^[44-45]. (a) Structural transformation of IRBTP-B; (b) molecular structures of CX-1, CX-2 and CX-3; (c) absorption and fluorescence emission spectra of CX-1, CX-2 and CX-3; (d) schematic diagram of the detection mechanism of PN1100; (e) ratiometric images of livers of mice

基于花菁类染料结构可变、波长可调的特性, Lei 等^[45] 通过扩展分子骨架 π 共轭长度开发出一系列具有 NIR-II 荧光发射的聚甲炔染料 (CX-1/2/3), 如图 5(b) 所示。由于吸收和发射光谱的重叠性, 如图 5(c) 所示, 分子 CX-1 和 CX-3 之间可产生有效的

福斯特共振能量转移 (FRET) 过程, 表现为 CX-1 在 920 nm 发射峰值处的强度减弱而 CX-3 在 1130 nm 发射峰值处的强度增强。此外, 在相同浓度 ONOO⁻ 条件下, CX-1 较 CX-3 具有更好的稳定性。受此启发, 研究者采用 CX-1 和 CX-3 共包覆策略开

发出一种基于 FRET 的 ONOO⁻ 激活型荧光探针 (PN1100), 如图 5(d) 所示。ONOO⁻ 可氧化 CX-3, 阻断分子间 FRET 过程, 使得比率荧光信号 (F_{920}/F_{1130}) 呈指数增长。其他生物物种, 例如谷胱甘肽、半胱氨酸、H₂O₂、ClO⁻ 等对该信号均无明显干扰, 通过该比率信号, 实现了对 APAP 诱导小鼠肝损伤的精准、无创检测成像, 如图 5(e) 所示。

2.1.6 H₂S 激活

H₂S 是继 NO 和一氧化碳 (CO) 之后第三种关键的内源性信号分子, 对机体具有广泛生理药理学效

应^[46-47]。最新研究发现, 结肠癌 (CRC) 细胞中过度表达的胱硫醚-β-合酶 (Cbs) 会促进 H₂S 生成, 为肿瘤细胞增值、转移和侵袭提供必要能量^[48], 这是 CRC 细胞中 H₂S 水平远高于正常组织的原因, 开发对内源性 H₂S 具有高选择性和灵敏度的激活型 NIR-II 小分子对 CRC 的诊疗具有十分重要的意义。Xu 等^[49] 开发了一种 H₂S 激活型小分子 (ZX-NIR), 如图 6(a) 所示, 其在通常情况下具有 520 nm 的吸收峰和 600 nm 的发射峰。H₂S 可诱导 4-硝基苯硫酚基团脱除并转变为巯基, 生成具有 NIR-II 荧光发射的小分子

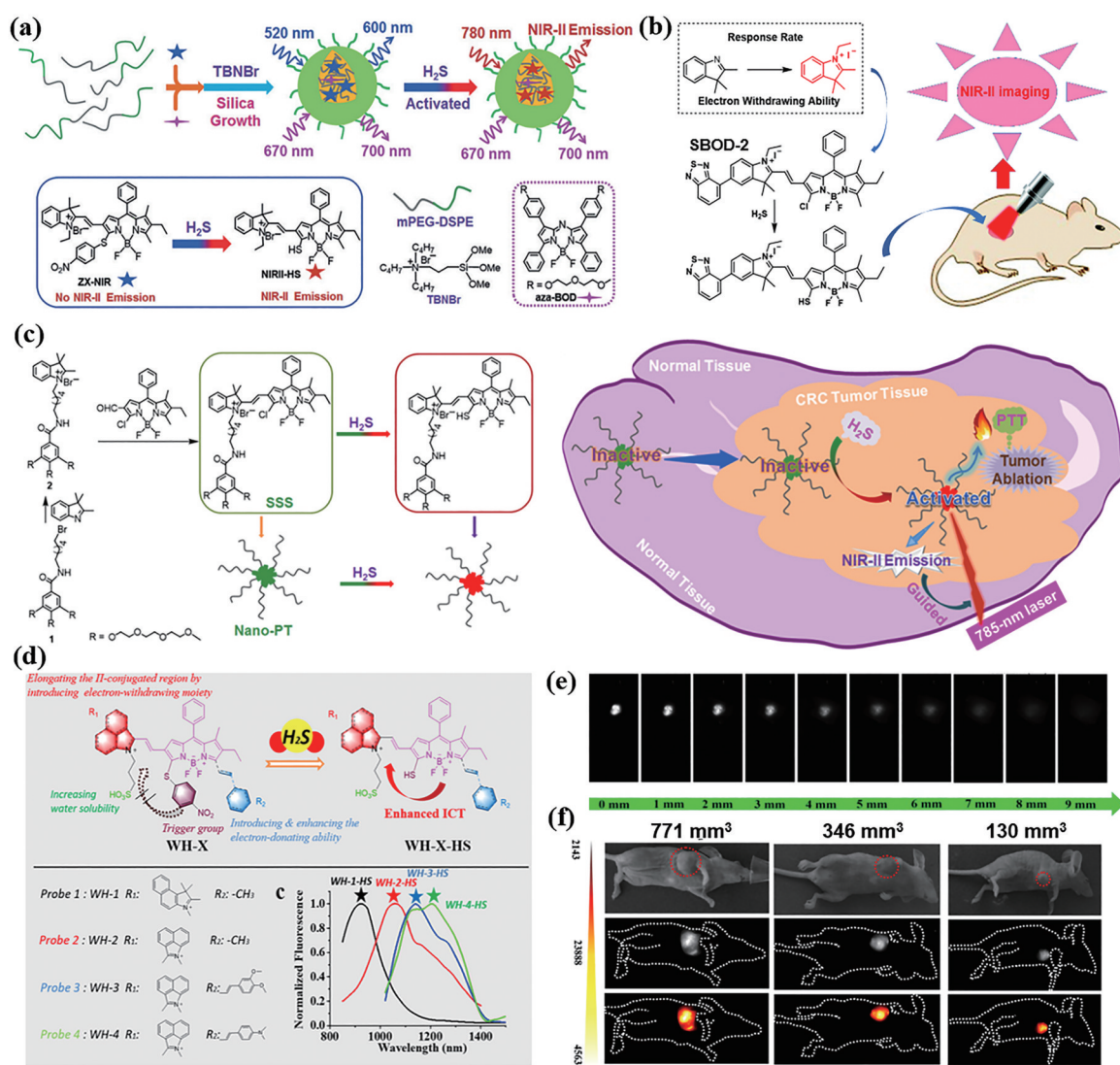


图 6 H₂S 激活型小分子^[49-52]。(a) NIR-II @Si 的构建; (b) SBOD-2 的设计及荧光激活; (c) SSS 的合成及其用于 NIR-II FLI 指导的 CRC 光热治疗; (d) WH-X (WX-1, WX-2, WX-3 和 WX-4) 的设计策略及其激活后的荧光发射光谱; (e) NIR-II FLI 组织穿透深度测试; (f) 不同大小肿瘤 NIR-II 荧光图像

Fig. 6 H₂S-activated small molecules^[49-52]. (a) Construction of NIR-II @Si; (b) design and fluorescence activation of SBOD-2; (c) synthesis of SSS and its application in photothermal therapy of CRC guided by NIR-II FLI; (d) design strategy of WH-X (WX-1, WX-2, WX-3, and WX-4) and their activated fluorescence emission spectra; (e) tissue penetration depth test of NIR-II FLI; (f) NIR-II fluorescence images of tumors with different sizes

(NIRII-HS)。随后,采用 ZX-NIR 和内标分子(aza-BOD)共包覆,构建出一种比率型纳米荧光探针(NIR-II@Si),该探针对 H_2S 的识别具有高特异性、低检测限($3.7 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)且激活状态下表现出 0.37% 的 NIR-II 区荧光量子产率,使用该探针成功实现了对小鼠 HCT-116 肿瘤的高信噪比成像检测。基于亲核反应机理,Gao 等^[50]设计出一种 H_2S 激活型小分子(SBOD-2),如图 6(b)所示。通过提高单氯化氟硼二吡咯(BODIPY)的取代基拉电子性能,在使得激活后分子荧光发射红移至 NIR-II 区的同时,提高了对 H_2S 的响应速率,SBOD-2 与 H_2S 的反应时间缩短至 15 min,实现了活体内 H_2S 快速检测。

针对 CRC 传统临床治疗方式具有副作用且疗效有限的问题,Shi 等^[51]进一步设计了一种 H_2S 激活型小分子(SSS),如图 6(c)所示。由于具有三甘醇链修饰的半花青苷基团,SSS 表现出良好的亲水性和生物相容性,在水中可自组装形成纳米结构(Nano-PT)。在不存在 H_2S 环境下,Nano-PT 在 540 nm 和 589 nm 处分别具有吸收和发射峰,而光热效应可忽略不计。 H_2S 可特异性激活 Nano-PT 产生 790 nm 的吸收峰和 NIR-II 荧光。特别是,激活后 Nano-PT 在 790 nm 的强吸收使 Nano-PT 产生良好的光热性能,其光热转换效率可以达到 27.8%,使用 Nano-PT 激活型 NIR-II FLI 指导的光热治疗可精确消融小鼠 CRC 肿瘤组织。

当前,激活后 NIR-II 小分子的发射峰值仍局限于 900~1000 nm 的波长范围,为拓展发射峰值以获得更高的信噪比和组织穿透深度,Dou 等^[52]提出了一种将延长 π 共轭体系与增强供体电子密度相结合的策略,并基于该策略设计开发出一系列激活型 NIR-II 小分子(WH-1/2/3/4),如图 6(d)所示。4-硝基苯硫酚基团作为 H_2S 特异性识别基团可与 H_2S 反应脱除并由巯基取代,激活 NIR-II 荧光;随着吸电子基团的引入和供体供电子性能的逐步增强,激活后增强的 ICT 使分子的荧光光谱可发生显著红移。特别是,在 980 nm 激光激发下,激活后的 WH-3 和 WH-4 分别在 1140 nm 和 1205 nm 处出现 NIR-II 荧光峰值发射;此外,WH-3 和 WH-4 均具有 H_2S 高选择性(检测限分别为 $51, 8.3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和可接受的 NIR-II 激活荧光量子产率(分别为 0.17% 和 0.05%)。基于 WH-3,可实现对 HCT-116 荷瘤小鼠内源性 H_2S 实时、高信噪比(10.64)和深层组织(9 mm)成像检测,并揭示了 H_2S 水平与肿瘤发展之间的关系,如图 6(e)和 6(f)所示。

2.1.7 NO 和 H_2S 双重激活

单一气体信号分子在体内的作用已被广泛研究,但对于不同气体信号分子之间相关性的研究仍处于起步阶段。为准确描绘 NO 与 H_2S 之间的相互作用,Zhu 等^[53]通过同时引入 NO 和 H_2S 响应性基团,开发出一种双重激活型 NIR-II 小分子(BOD-NH-SC),如图 7(a)

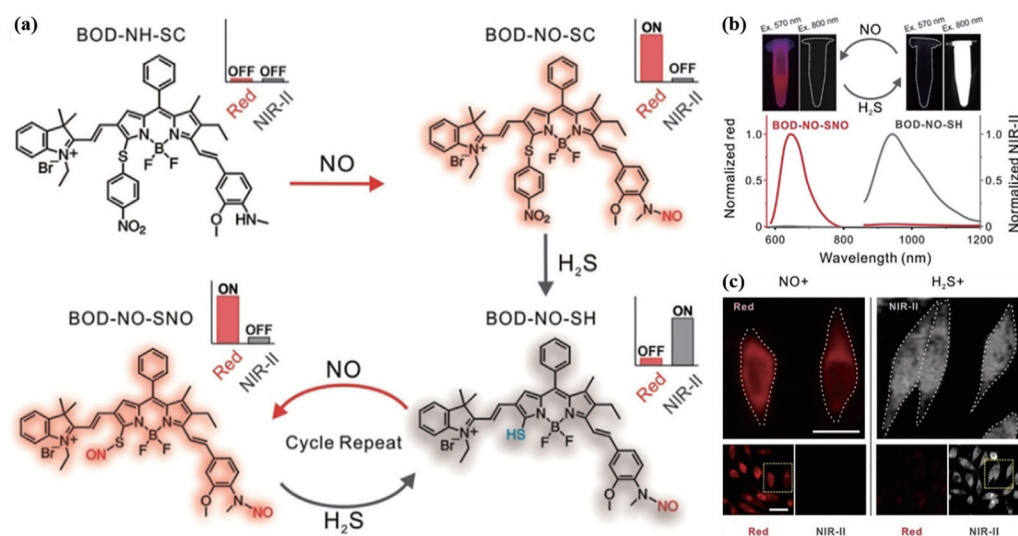


图 7 NO、 H_2S 双重激活型小分子^[53]。(a) BOD-NH-SC 的荧光激活及荧光转换机理;(b) 荧光光谱揭示 S-亚硝化和转亚硝化过程的重复循环;(c) 活细胞中 NO 和 H_2S 动态和交替存在的可视化

Fig. 7 NO and H_2S dual-activated small molecule^[53]. (a) Fluorescence activation and fluorescence conversion mechanism of BOD-NH-SC; (b) repeatedly cycled S-nitrosation and transnitrosation processes revealed by fluorescence emission spectra; (c) visualization of the dynamic and alternating presence of NO and H_2S in living cells

所示。N-甲基-2-甲氧基苯作为NO特异性识别基团,在不存在NO条件下,可促使分子内产生PET过程,BOD-NH-SC几乎不具备任何荧光;而NO可诱导N-甲基-2-甲氧基苯的N-亚硝化阻断PET过程,使激活后分子(BOD-NO-SC)表现出655 nm的NIR-I区峰值荧光发射;进而,H₂S可诱导H₂S特异性识别基团4-硝基苯硫醇转变为巯基,经两步激活后,655 nm处的荧光峰消失,取而代之出现了明亮的936 nm峰值荧光和NIR-II尾荧光。有趣的是,BOD-NO-SH通过NO和H₂S循环处理,可实现NIR-I荧光和NIR-II荧光之间循环转换过程,如图7(b)所示,利用这一过程可以实现对活细胞中NO和H₂S动态和交替过程的精准监测和可视化,如图7(c)所示。

2.2 酶激活型

酶作为生物体内大量存在的蛋白质,可高效、特异性催化体内几乎所有的生理过程和代谢反应,其异常表达可致使内环境紊乱失调,导致例如癌症

等一些重大疾病的发生^[54]。乏氧是实体瘤的共同特点并伴随着硝基还原酶(NTR)过度表达,基于此,Meng等^[55]将硝基咪唑基团(MZ)与NIR-II小分子染料(IR1048)结合开发出一种乏氧激活型小分子(IR1048-MZ),如图8(a)所示。由于MZ引起电荷转移,IR1048-MZ几乎不具备荧光发射和光热性能,在肿瘤乏氧的微环境中,NTR可诱导MZ的硝基还原为胺基,使还原后分子(IR1048-MZH)的NIR-II荧光和光热激活。与IR1048-MZ相比,IR1048-MZH在1046 nm处的荧光量子产率提高了106.9倍,如图8(b)所示;此外,在980 nm激光的激发下,IR1048-MZH表现出20.2%的激活光热转换效率。体内实验表明,尾静脉注射后14 h,荧光信号达到最大值并表现出高达30的信噪比,如图8(c)所示;同时,三维光声成像(PAI)纵截面穿透深度可达(14.6±0.2) mm,如图8(d)所示,实现对深层乏氧肿瘤的高效、精准诊疗一体化,如图8(e)所示。随后,Ouyang等^[56]开发了一种具有AIE特性的NTR

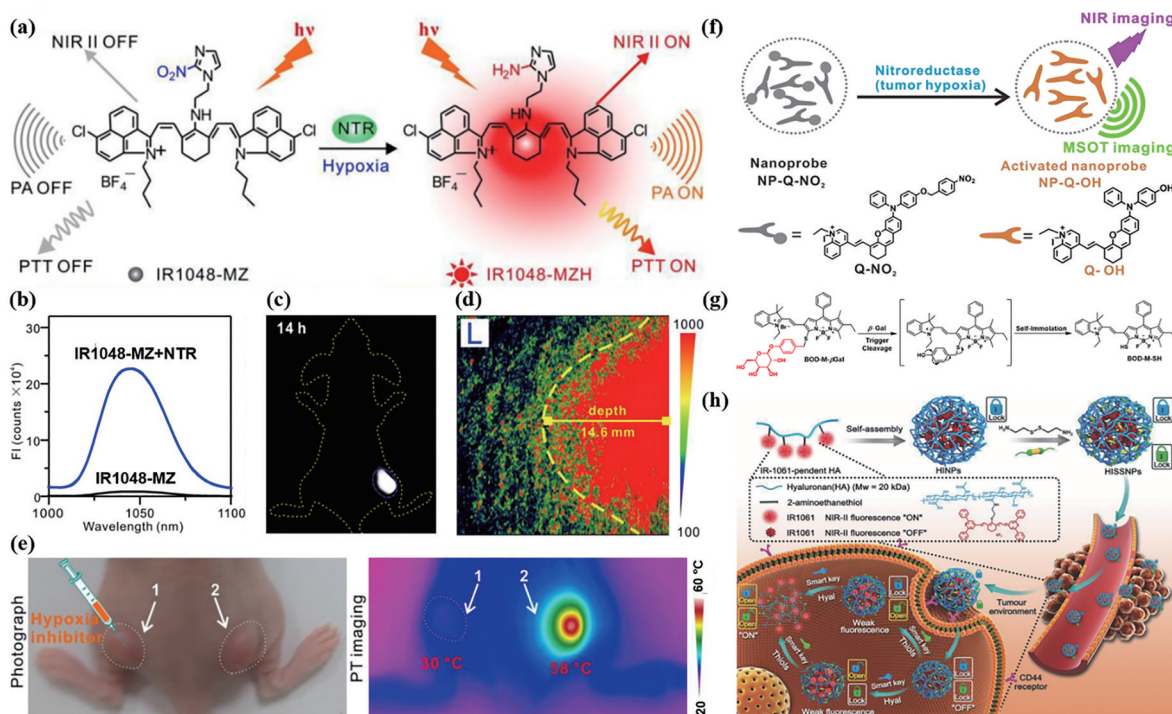


图 8 酶激活型小分子^[55-58]。(a) IR1048-MZ的激活机制;(b) IR1048-MZ及其激活后的荧光发射光谱;(c)注射后14 h,肿瘤部位的NIR-II FLI;(d)注射后14 h,肿瘤纵切面中PAI的穿透深度;(e) IR1048-MZ激活后的光热治疗;(f) Q-NO₂与NTR反应的示意图;(g) BOD-M-βGal的激活机制;(h) HISSPNPs的构建及其荧光激活过程

Fig. 8 Enzyme-activated small molecules^[55-58]. (a) Activation mechanism of IR1048-MZ; (b) IR1048-MZ and its activated fluorescence emission spectra; (c) NIR-II FLI of the tumor site after 14 h injection; (d) penetration depth of PAI in the longitudinal section of tumor site after 14 h injection; (e) photothermal therapy after activation of IR1048-MZ; (f) schematic diagram of the reaction between Q-NO₂ and NTR; (g) activation mechanism of BOD-M-βGal; (h) construction of HISSPNPs and its fluorescence activation process

激活型小分子(Q-NO₂),如图 8(f)所示,其激活后分子(Q-OH)可产生显著的 NIR-I、NIR- II 和光声信号,通过荧光和多光谱光声断层扫描双模成像不仅可对乳腺癌化疗效果进行监控,还可对乳腺肿瘤转移进行有效检测。

卵巢癌是一种在女性中发病率和死亡率较高的癌症,它的产生通常表现为 β -半乳糖苷酶(β -gal)含量和活性的激增。Chen 等^[57]使用 4-羟基苯硫酚基团将 β -半乳糖残基与 BODIPY 染料结合开发了一种 β -gal 激活型小分子(BOD-M- β Gal),如图 8(g)所示, β -gal 可诱导 β -半乳糖残基发生水解;随后,暴露的 4-羟基苯硫酚基团可自我脱除转变为巯基,使得 BOD-M- β Gal 的 NIR- II 荧光激活。该分子对 β -gal 具有特异性及快速响应性,可实现对小鼠卵巢肿瘤快速、高信噪比荧光成像检测。

激活型 NIR- II 荧光探针大多依赖于单一病理参数对其进行激活,为进一步降低背景信号,提高检测精准性,开发多重病理参数协同激活型 NIR- II 荧光探针具有十分重要的意义。Tang 等^[58]用 2-氨基乙硫醇同时链接 NIR- II 花菁类染料 IR-1061 和透明质酸(HA),开发了一种两亲性聚合物。在水溶液中,该聚合物可通过自组装形成纳米颗粒(HINPs);进一步,使用二硫化物交联 HINPs 表面的 HA 可以形成纳米体系(HISSNPs),如图 8(h)所示。HA 不仅可以特异性靶向肿瘤细胞表面糖蛋白 CD44,还可配合二硫键封锁 IR-1061,促使其 π - π 堆砌,导致荧光淬灭。肿瘤微环境中过度表达的硫醇和透明质酸酶可分别诱导二硫键和 HA 链断裂,释放聚集态 IR-1061 恢复荧光。相比于透明质酸酶单激活的 HINPs, HISSNPs 在 MCF-7 荷瘤小鼠体内的检测成像表现出更高的肿瘤背景(15.4:3.3)和肿瘤肝脏(5.87:1.1)信号比。

2.3 pH 激活型

pH 是表示酸碱度的一个重要生理指标,控制和决定着生物体内的生物化学反应和能量转变^[59]。肿瘤乏氧的微环境特性刺激了糖酵解的上调,导致肿瘤组织(pH 6.5~6.8)表现出与正常组织(pH 7.4)不同的微酸环境;此外,肿瘤亚细胞器中的 pH 也不尽相同,例如细胞质呈微碱性而溶酶体呈酸性(pH 4.5~5.0)^[60]。因此,pH 可作为开发激活型 NIR- II 小分子的重要生物标志物。例如,He 等^[61]设计开发了一系列 pH 敏感型有机小分子(Lyso855/880/950/1005),其哌嗪单元不仅

可作为溶酶体靶向基团,并且其质子化可有效抑制 ICT,实现 pH 诱导的荧光增强,如图 9(a)所示。特别是,当 pH 从 7.0 降至 5.0,分子 Lyso1005 表现出高于 4 倍的 NIR- II 荧光增强。进一步,采用 PEG 对 Lyso1005 进行亲水性修饰开发了名为 CEAF-OMe 的探针,其在水溶液中具有 $1 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的超低临界聚集浓度,且聚集态不具备任何荧光;经细胞内吞后,溶酶体中增强的非共价相互作用和酸性使 CEAF-OMe 解聚并质子化,可以点亮并增强 NIR- II 荧光,如图 9(b)所示,清晰勾勒出肿瘤边缘,为手术切除提供精准导航,如图 9(c)所示。此外,基于 Lyso1005,研究者还开发了 $\alpha_v\beta_3$ 特异性靶向探针(CEAF-RGD),用于体内外伤性关节炎诊断,表现出高目标背景比。

由于缺乏通用设计策略,激活型 NIR- II 小分子的开发仍具有挑战性,开发可用于构建激活型 NIR- II 小分子的通用纳米平台显得尤为重要。Ren 等^[62]通过引入具有供电子性能的大位阻基团开发出一系列亮度高、稳定性好且具有抗溶剂淬灭性能的 NIR- II 聚甲炔染料(NIR II -RT1/RT2/RT3/RT4),如图 9(d)所示。有趣的是,羧酸官能团的引入使分子内可产生螺环化,实现特殊的荧光淬灭-点亮转换机制,使 NIR II -RT3 和 NIR II -RT4 可以作为构建激活型小分子的良好平台。基于 NIR II -RT4,引入不同的、可形成分子内螺环的响应型基团,依次开发出 pH、三磷酸腺苷(ATP)和汞(Hg²⁺)激活型探针 NIR II -RT-pH/ATP/Hg,如图 9(e)和 9(f)所示,并实现对小鼠肝损伤模型中 ATP 波动的实时、高信噪比(>4.5)成像监测,如图 9(g)所示。

2.4 黏度激活型

黏度是微环境的关键生物指标之一,也与各种生理和病理过程相关。为阐明体内疾病相关黏度变化,Dou 等^[63]设计合成了一系列黏度激活型 NIR- II 小分子(WD-CH₃/NO₂/OCH₃/NME₂),如图 10(a)所示。在低黏度的环境下,分子内键的自由旋转破坏了分子共轭结构,增加能量非辐射耗散,使荧光衰减;随着黏度增加,分子内键的旋转受到限制,能量辐射耗散增加,荧光恢复。其中,WD-NO₂具有最为出色的综合性能,对黏度的响应表现出 31 倍的荧光增强且对 pH 和极性等因素不敏感;此外,WD-NO₂在甘油中表现出 1.6% 的较高荧光量子产率。基于 WD-NO₂对黏度的优

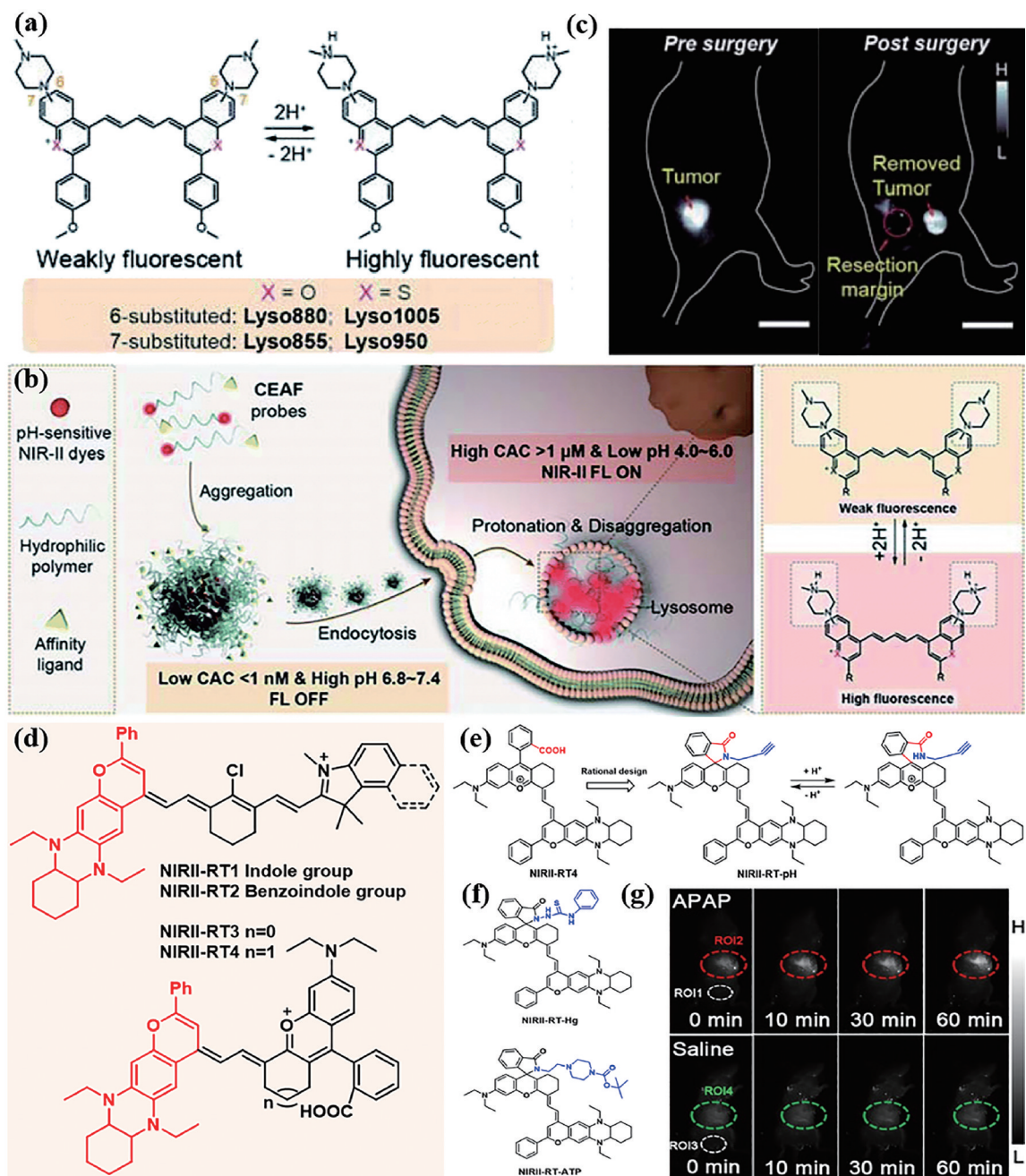


图 9 pH 激活型小分子^[61-62]。(a) Lyso880、Lyso1005、Lyso855 和 Lyso950 的分子结构及质子化过程；(b) CEAF 探针在肿瘤细胞中荧光点亮和增强机制；(c) NIR-II FLI 指导的肿瘤手术切除；(d) NIR II-RT1~4 的设计和分子结构；(e) NIR II-RT-pH 设计合成及其 pH 激活机制；(f) NIR II-RT-Hg 和 NIR II-RT-ATP 的分子结构；(g) ATP 波动的体内成像监测

Fig. 9 pH-activated small molecules^[61-62]. (a) Molecular structures and protonation process of Lyso880, Lyso1005, Lyso855, and Lyso950; (b) mechanism of CEAF probe's fluorescence lighting and enhancement in tumor cell; (c) NIR-II FLI-guided tumor resection; (d) design and molecular structures of NIR II-RT1-4; (e) design and synthesis of NIR II-RT-pH and its pH activation mechanism; (f) molecular structures of NIR II-RT-Hg and NIR II-RT-ATP; (g) *in vivo* imaging monitoring of ATP fluctuations

异敏感性,在小鼠体内实现了对链脉佐菌素(STZ)诱导糖尿病导致的肝损伤相关黏度变化的检测,如图 10(b)所示。

2.5 激活型 NIR-II 小分子及探针研究进展汇总
激活型 NIR-II 小分子及探针总结如表 1 所示。

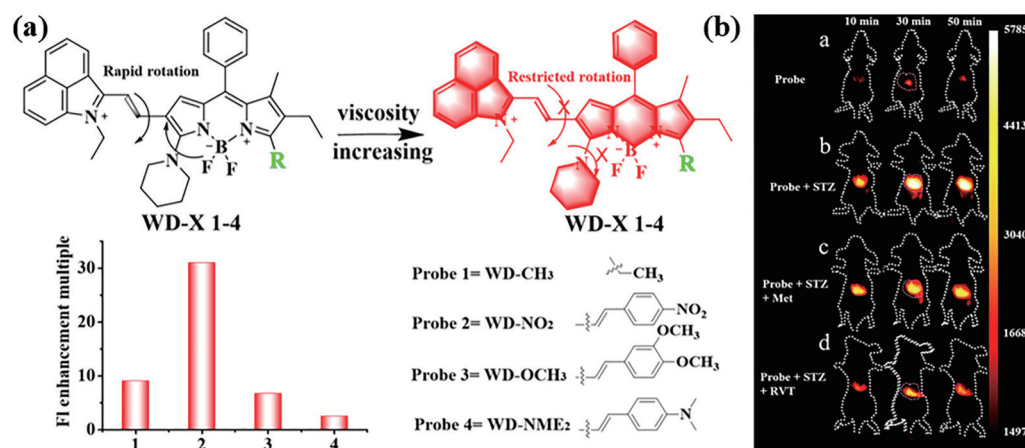


图 10 黏度激活型小分子^[63]。(a) WD-X 对黏度的响应机制；(b) 小鼠肝脏黏度变化的体内成像检测

Fig. 10 Viscosity-activated small molecule^[63]. (a) Response mechanism of WD-X to viscosity; (b) *in vivo* imaging detection of liver viscosity changes of mice

表 1 激活型 NIR-II 小分子及探针总结

Table 1 Summary of activatable NIR-II small molecules and probes

Name	Activation parameter	$\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	Limit of detection	Imaging strategy	Therapeutic mode	Disease	Ref.
Hydro-1080	—OH	808/1080	$5.0 \times 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Hepatotoxicity	[32]
TC-H ₂ O ₂	H ₂ O ₂	808/920—1020	/	FLI and MOST	/	Liver injury	[34]
SPNP25	ClO ⁻	808/1000—1700	$6.8 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Inflammation	[37]
DCNP@SeTT	HClO	980/1150 or 1550	$4.0 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Ratiometric FLI	/	Osteoarthritis	[38]
AOSNP	NO	808/1000—1700	$3.5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Hepatotoxicity	[39]
QY-N	NO	808/910—1110	$2.3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI and MOST	/	Liver injury	[40]
IRBTP-B	ONOO ⁻	808/850—1300	$5.6 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Hepatotoxicity	[44]
PN1100	ONOO ⁻	808/920 or 1130	/	Ratiometric FLI	/	Hepatotoxicity	[45]
NIR-II @Si	H ₂ S	780/1000—1300	$3.7 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Colorectal cancer	[49]
SBOD-2	H ₂ S	780/920—1300	$8.7 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Colorectal cancer	[50]
Nano-PT	H ₂ S	785 or 810/ 900—1300	$1.1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	Photothermal therapy	Colorectal cancer	[51]
WH-3	H ₂ S	980/1140	$5.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	Colorectal cancer	[52]
BOD-NH-SC	NO and H ₂ S	840/936—1200	$3.1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI	/	/	[53]
IR1048-MZ	Nitroreductase	980/1048	/	FLI and PAI	Photothermal therapy	Lung cancer	[55]
Q-NO ₂	Nitroreductase	808/922—1110	$5.2 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$	FLI and MOST	/	Breast cancer	[56]
BOD-M- β Gal	β -Galactosidase	808/900—1300	/	FLI	/	Ovarian cancer	[57]
HISNPs	Hyaluronidase and thiols	808/1000—1700	/	FLI	/	Breast cancer	[58]
Lyso1005	pH	808/850—1700	/	FLI	/	Colorectal cancer	[61]
NIR II -RT-pH/ATP/Hg	pH/ATP/Hg	808/1000—1700	/	FLI	/	Hepatotoxicity	[62]
WD-NO ₂	Viscosity	808/1000—1700	/	FLI	/	Diabetes	[63]

3 讨论与展望

系统总结了近年来激活型 NIR-II 小分子在生物成像检测应用中的研究进展,根据荧光激活所依赖的生物标志物对其进行分类,重点介绍了设计策略和成像性能。激活型 NIR-II 小分子不但改善了 NIR-I FLI 组织穿透性差和分辨率低的问题,而且相比于传统“always on”型 NIR-II 小分子,极大降低了背景信号,提高了成像特异性和信噪比,使检测更为高效和精准,展现出较好的临床应用潜力。尽管对于激活型 NIR-II 小分子的研究取得了显著进展,但它们的开发仍然处于起步阶段,未来仍面临着一些机遇和挑战。

激活型 NIR-II 小分子的吸收波长仍局限于 NIR-I 区域,只能通过 NIR-I 区激光对其进行激发。相比于 NIR-I 区激发, NIR-II 区激发的组织穿透能力更强。为提高组织穿透深度,需拓展激活型 NIR-II 小分子的吸收光谱至 NIR-II 区域;此外,大多数激活型 NIR-II 小分子的荧光发射峰值处于 NIR-I 区域,为实现深层病灶的成像检测,开发具有 NIR-II 区荧光发射峰值,特别是 NIR-II a (1300~1400 nm) 区和 NIR-II b (1500~1700 nm) 区的激活型 NIR-II 小分子将具有十分重要的意义,这也是未来的一个巨大挑战。亮度是评估成像质量的另一个关键参数,大多数激活型 NIR-II 小分子在 NIR-II 区域的亮度偏低,为进一步优化和提高成像质量,高亮度激活型 NIR-II 小分子仍有待进一步研发。

对于激活型 NIR-II 小分子的设计大多只针对单一的生物标志物,由于疾病的复杂性和多样性,一种生物标志物往往可能会涉及多种疾病,为进一步提高对特定疾病识别的精确性,亟须开发多重生物标志物协同激活型 NIR-II 小分子。然而,由于设计的困难,协同激活型 NIR-II 小分子的开发目前仍具有很大的挑战性。

大多数激活型 NIR-II 小分子仅具有成像检测功能,这使得疾病的诊断与治疗脱节。因此,开发成像与治疗一体化的智能化激活型 NIR-II 小分子及探针,实现在对疾病诊断的同时便能进行即时治疗,将进一步提高疾病诊疗的效率和精准性。此外,在临床应用上,目前仅有吡啶菁绿、亚甲基蓝和荧光素钠等有机小分子通过了美国食品和药物管理局批准。为实现激活型 NIR-II 小分子的临床应用,应深入研究激活型 NIR-II 小分子在体

内的药代动力学和系统毒理学,为临床转化奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Dai H M, Wang X R, Shao J J, et al. NIR-II organic nanotheranostics for precision oncotherapy [J]. *Small*, 2021, 17(44): 2102646.
- [2] Tang Y F, Pei F, Lu X M, et al. Recent advances on activatable NIR-II fluorescence probes for biomedical imaging[J]. *Advanced Optical Materials*, 2019, 7(21): 1900917.
- [3] Chen J W, Gong H, Yuan J. Multispectral imaging technology and its applications in biomedicine[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(4): 0400001.
陈键伟, 龚辉, 袁菁. 多光谱成像技术及其在生物学中的应用[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(4): 0400001.
- [4] Li Y, Qiu J R. Persistently luminescent phosphors [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(15): 1516002.
李杨, 邱建荣. 蓬勃发展的长余辉材料[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(15): 1516002.
- [5] Xu W H, Wang D, Tang B Z. NIR-II AIEgens: a win-win integration towards bioapplications[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(14): 7476-7487.
- [6] Lu L F, Li B H, Ding S W, et al. NIR-II bioluminescence for *in vivo* high contrast imaging and *in situ* ATP-mediated metastases tracing[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4192.
- [7] Wang S F, Li B H, Zhang F. Molecular fluorophores for deep-tissue bioimaging[J]. *ACS Central Science*, 2020, 6(8): 1302-1316.
- [8] Li J C, Pu K Y. Development of organic semiconducting materials for deep-tissue optical imaging, phototherapy and photoactivation[J]. *Chemical Society Reviews*, 2019, 48(1): 38-71.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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): 1801778.
- [12] Liu Y S, Li Y, Koo S, et al. Versatile types of inorganic/organic NIR-II a/II b fluorophores: from strategic design toward molecular imaging and theranostics[J]. *Chemical Reviews*, 2021: 553.
- [13] Zhu S, 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.
- [14] Cao J, Zhu B L, Zheng K F, et al. Recent progress in NIR-II contrast agent for biological imaging[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2019, 7: 487.
- [15] Cai Y, Si W L, Huang W, et al. Organic dye based nanoparticles for cancer phototheranostics[J]. *Small*, 2018, 14(25): e1704247.
- [16] Chen D P, Yu Q, Huang X, et al. A highly-efficient type I photosensitizer with robust vascular-disruption activity for hypoxic-and-metastatic tumor specific photodynamic therapy[J]. *Small*, 2020, 16(23): e2001059.
- [17] 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.
- [18] Su Y B, Yu B, Wang S, et al. NIR-II bioimaging of small organic molecule[J]. *Biomaterials*, 2021, 271: 120717.
- [19] Zhou H, Xiao Y L, Hong X C. New NIR-II dyes without a benzobisthiadiazole core[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2018, 29(10): 1425-1428.
- [20] Tu L, Xu Y L, Ouyang Q Y, et al. Recent advances on small-molecule fluorophores with emission beyond 1000 nm for better molecular imaging *in vivo* [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2019, 30(10): 1731-1737.
- [21] 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.
- [22] Zhang X, An L, Tian Q W, et al. Tumor microenvironment-activated NIR-II reagents for tumor imaging and therapy[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(22): 4738-4747.
- [23] Bai H R, Peng R Z, Wang D, et al. A minireview on multiparameter-activated nanodevices for cancer imaging and therapy[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(42): 21571-21582.
- [24] Yao Y K, Zhang Y T, Yan C X, et al. Enzyme-activatable fluorescent probes for β -galactosidase: from design to biological applications[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(29): 9885-9894.
- [25] Zhao M Y, Li B H, Zhang H X, et al. Activatable fluorescence sensors for *in vivo* bio-detection in the second near-infrared window[J]. *Chemical Science*, 2020, 12(10): 3448-3459.
- [26] Ding F, Feng J, Zhang X L, et al. Responsive optical probes for deep-tissue imaging: photoacoustics and second near-infrared fluorescence[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 173: 141-163.
- [27] Huang J G, Pu K Y. Activatable molecular probes for second near-infrared fluorescence, chemiluminescence, and photoacoustic imaging[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(29): 11717-11731.
- [28] Zeng Z, Liew S S, Wei X, et al. Hemicyanine-based near-infrared activatable probes for imaging and diagnosis of diseases[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(51): 26454-26475.
- [29] Ferreira C A, Ni D L, Rosenkrans Z T, et al. Scavenging of reactive oxygen and nitrogen species with nanomaterials[J]. *Nano Research*, 2018, 11(10): 4955-4984.
- [30] Liu J, Ma L J, Zhang G Y, et al. Recent progress of surface modified nanomaterials for scavenging reactive oxygen species in organism[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2021, 32(11): 2269-2289.
- [31] Han G, Gao J J, Tu M R, et al. Effect of photobiomodulation mediated by 808 nm laser on active oxygen steady-state in CCC-ESFs under high glucose environment[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2021, 58(9): 0917001.
- 韩广, 高静静, 屠梦茹, 等. 808 nm 激光介导的光生物调节对高糖环境下成纤维细胞活性氧稳态的影响[J]. *激光与光电子学进展*, 2021, 58(9): 0917001.
- [32] Feng W Q, Zhang Y Y, Li Z, et al. Lighting up NIR-II fluorescence *in vivo*: an activable probe for noninvasive hydroxyl radical imaging[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(24): 15757-15762.
- [33] Pai M, Behr M A, Dowdy D, et al. Tuberculosis[J]. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2016, 2: 16076.
- [34] Chen L Q, Chen J J, Fang Y C, et al. A turn-on probe for detecting antituberculous drug-induced liver injury in mice via NIR-II fluorescence/optoacoustic imaging[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(63): 7842-7845.
- [35] He X J, Chen H, Xu C C, et al. Ratiometric and colorimetric fluorescent probe for hypochlorite

- monitor and application for bioimaging in living cells, bacteria and zebrafish[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122029.
- [36] Yin C, Zhen X, Fan Q L, et al. Degradable semiconducting oligomer amphiphile for ratiometric photoacoustic imaging of hypochlorite[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(4): 4174-4182.
- [37] 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.
- [38] 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.
- [39] Tang Y F, Li Y Y, Wang Z, et al. Organic semiconducting nanoprobe with redox-activatable NIR-II fluorescence for *in vivo* real-time monitoring of drug toxicity[J]. *Chemical Communications*, 2018, 55(1): 27-30.
- [40] Sun L H, Ouyang J, Ma Y Q, et al. An activatable probe with aggregation-induced emission for detecting and imaging herbal medicine induced liver injury with optoacoustic imaging and NIR-II fluorescence imaging[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021, 10(24): e2100867.
- [41] Guo B P, Shu W, Liu W J, et al. Mitochondria-specific ultrasensitive ratiometric AIE probe for imaging endogenous peroxynitrite[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 344: 130206.
- [42] Han X J, Yang X P, Zhang Y R, et al. A novel activatable AIEgen fluorescent probe for peroxynitrite detection and its application in EC1 cells[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 321: 128510.
- [43] Liu F Y, Dong H, Tian Y. Real-time monitoring of peroxynitrite (ONOO⁻) in the rat brain by developing a ratiometric electrochemical biosensor[J]. *The Analyst*, 2019, 144(6): 2150-2157.
- [44] Li D D, Wang S F, Lei Z H, et al. Peroxynitrite activatable NIR-II fluorescent molecular probe for drug-induced hepatotoxicity monitoring[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(7): 4771-4779.
- [45] 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 Edition*, 2019, 58(24): 8166-8171.
- [46] Lv B Y, Chen S, Tang C S, et al. Hydrogen sulfide and vascular regulation-An update[J]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 27: 85-97.
- [47] Chen Y Q, Zhang F, Yin J Y, et al. Protective mechanisms of hydrogen sulfide in myocardial ischemia[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2020, 235(12): 9059-9070.
- [48] Chen S W, Yue T H, Huang Z H, et al. Inhibition of hydrogen sulfide synthesis reverses acquired resistance to 5-FU through miR-215-5p-EREG/TYMS axis in colon cancer cells[J]. *Cancer Letters*, 2019, 466: 49-60.
- [49] Xu G, Yan Q L, Lü X G, et al. Imaging of colorectal cancers using activatable nanoprobe with second near-infrared window emission[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, 57(14): 3626-3630.
- [50] Gao J Z, Wang R C, Zhu T L, et al. An electron-deficiency-based framework for NIR-II fluorescence probes[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2020, 8(43): 9877-9880.
- [51] Shi B, Yan Q L, Tang J, et al. Hydrogen sulfide-activatable second near-infrared fluorescent nanoassemblies for targeted photothermal cancer therapy[J]. *Nano Letters*, 2018, 18(10): 6411-6416.
- [52] Dou K, Feng W Q, Fan C, et al. Flexible designing strategy to construct activatable NIR-II fluorescent probes with emission maxima beyond 1200 nm[J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93(8): 4006-4014.
- [53] Zhu T L, Ren N, Liu X, et al. Probing the intracellular dynamics of nitric oxide and hydrogen sulfide using an activatable NIR II fluorescence reporter[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(15): 8450-8454.
- [54] Ou Y G, Wilson R E, Weber S G. Methods of measuring enzyme activity *ex vivo* and *in vivo*[J]. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 2018, 11(1): 509-533.
- [55] Meng X Q, Zhang J L, Sun Z H, et al. Hypoxia-triggered single molecule probe for high-contrast NIR II/PA tumor imaging and robust photothermal therapy[J]. *Theranostics*, 2018, 8(21): 6025-6034.
- [56] Ouyang J, Sun L H, Zeng Z, et al. Nanoaggregate probe for breast cancer metastasis through multispectral optoacoustic tomography and aggregation-induced NIR-I/II fluorescence imaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(25): 10111-10121.
- [57] Chen J A, Pan H M, Wang Z J, et al. Imaging of

- ovarian cancers using enzyme activatable probes with second near-infrared window emission[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(18): 2731-2734.
- [58] Tang Y F, Li Y Y, Hu X M, et al. "Dual lock-and-key"-controlled nanoprobe for ultrahigh specific fluorescence imaging in the second near-infrared window[J]. *Advanced Materials*, 2018, 30(31): 1801140.
- [59] Rupprecht C, Wingen M, Potzkei J, et al. A novel FbFP-based biosensor toolbox for sensitive *in vivo* determination of intracellular pH[J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 258: 25-32.
- [60] Liang P P, Huang X Y, Wang Y, et al. Tumor-microenvironment-responsive nanoconjugate for synergistic antivasculature activity and phototherapy[J]. *ACS Nano*, 2018, 12(11): 11446-11457.
- [61] He Y, Wang S F, Yu P, et al. NIR-II cell endocytosis-activated fluorescent probes for *in vivo* high-contrast bioimaging diagnostics[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(31): 10474-10482.
- [62] Ren T B, Wang Z Y, Xiang Z, et al. A general strategy for development of activatable NIR-II fluorescent probes for *in vivo* high-contrast bioimaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(2): 800-805.
- [63] Dou K, Huang W J, Xiang Y H, et al. Design of activatable NIR-II molecular probe for *in vivo* elucidation of disease-related viscosity variations[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(6): 4177-4181.