

文章编号: 1005-5630(2022)05-0084-11

DOI: 10.3969/j.issn.1005-5630.2022.005.011

上转换发光材料在生物成像 和肿瘤诊疗中的应用综述

刘金亮, 缪煜清, 李钰皓

(上海理工大学材料与化学学院, 上海 200093)

摘要: 近年来, 光学成像与检测技术越来越多的应用于生物医学领域, 其具有高检测灵敏度、生物安全性好以及非侵入性等众多优异的特点。该技术的发展得益于荧光物质(如染料、荧光蛋白)的光学特性和光学成像设备的发展。与传统下转换光学成像方式相比, 上转换光学成像具有反斯托克斯位移发光特性。该光学成像方式在生物医学领域中展现出较好的应用前景, 其成像方式较好地避免了下转换发光的一些弊端, 如近红外光激发可增加光对组织的穿透深度、可避免生物体自发荧光和对组织损伤较小等。正因为上转换光学成像方式的特殊性, 有必要对其进行介绍并综述近期在生物医学领域中的应用, 包括成像检测与疾病治疗。这对于合理使用上转换发光技术和合理设计上转换发光材料具有指导意义。

关键词: 生物成像; 上转换发光; 肿瘤诊疗一体化; 反斯托克斯位移

中图分类号: O 69 **文献标志码:** A

Application of upconversion luminescence materials in biological imaging and tumor theranostics

LIU Jinliang, MIAO Yuqing, LI Yuhao

(School of Materials and Chemistry, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: In recent years, optical imaging and detection technology has been increasingly used in the field of biomedicine, which has many excellent characteristics such as high detection sensitivity, good biological safety and non-invasiveness. The development of this technology benefits from the optical properties of fluorescent substances (such as dyes, fluorescent proteins) and the development of optical imaging devices. Compared with traditional downconversion optical imaging methods, upconversion optical imaging has anti-Stokes shift luminescence properties. The optical imaging method shows good application prospects in the field of biomedicine, and the imaging method can avoid some disadvantages of downconversion luminescence. For example, the use of near-infrared light excitation can increase the penetration depth of light into the tissue, avoid

收稿日期: 2022-02-24

基金项目: 上海市自然科学基金(19ZR1434700); 上海理工大学教师教学发展研究项目(CFTD203049); 上海市军民融合发展专项资金科技创新支持项目(2020-jmrh-kj8)

作者简介: 刘金亮(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向为频率上转换光学材料。E-mail: 1591444641@qq.com

通信作者: 李钰皓(1983—), 男, 副教授, 研究方向为上转换发光材料。E-mail: yhli@usst.edu.cn

the autofluorescence of the organism, and cause less damage to the tissue. Because of the particularity of this imaging method, it is necessary to introduce and review its applications in the field of biomedicine, including imaging detection and disease treatment. This has guiding significance for the rational use of upconversion luminescence technology and the rational design of upconversion luminescence materials.

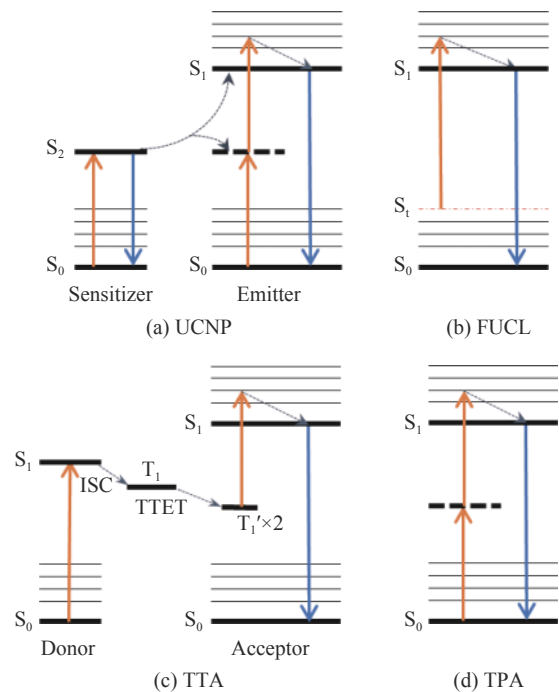
Keywords: bioimaging; upconversion luminescence; tumor diagnosis and treatment; anti-Stokes

引 言

光学成像在生物医学领域中用于生物分子等实时检测与成像是目前研究的热点。这种成像方式基于光学活性物质与光学检测设备的进步与发展。其中用于实时监测各种生理活性物质的荧光探针物质遵循斯托克斯(Stokes)光学定律,即被高能量(短波长)的光激发后发出低能量(长波长)的光,这种发光方式也称为下转换发光^[1-3]。换句话说,这些光学活性物质在高能量光子的激发下发出低能量的光子。然而这些遵循 Stokes 定律的发光物质在体内应用时会受到诸多干扰因素的影响,比如在可见光区激发和发射会造成严重的生物自发背景光干扰、光穿透深度低和信噪比差等^[4]。基于此,上转换发光技术在疾病诊断和医学造影成像等领域表现出原位检测独特优势。上转换发光打破了传统斯托克斯光学定律,是一种反斯托克斯(anti-Stokes)位移发光,其发光过程是指在低能量光(长波长)激发下,通过多种转换方式发射出高能量光(短波长)的发光过程。这种光学成像方式可很好地解决上述下转换发光在生物医学领域应用中的不足。

基于上转换发光原理的不同,如图 1 所示可将上转换发光材料分为以下 4 类,包括镧系元素掺杂的稀土上转换纳米材料(upconversion nanoparticle, UCNP)、单光子频率上转换发光材料(frequency upconversion luminescence, FUCL)、三重态-三重态湮灭上转换发光材料(triplet-triplet annihilation, TTA)和双光子吸收发光材料(two-photon absorption, TPA)^[5-8]。上转换发光过程还需要一些额外的能量才能实现从低能量光激发后发射出高能量光的过程。1946 年,Pringsheim

等对这一过程的热力学背景进行了激烈的辩论,并最终由 Landau 在同年解决了此问题^[9]。由于其独特性,除在生物医学领域的应用以外,上转换发光在太阳能电池、显示设备、人工照明、人工光合作用和激光冷却等领域也受到极大的关注,并展现出广阔的应用前景^[10]。上转换荧光成像在生物医学成像方面有很大的应用价值,优良的上转换发光可以赋予该类材料多模态成像、光导药物递送和疾病治疗等多种用途。本文将介绍它们在不同发光机制基础上的应用以及反斯托



S_0 : 基态; S_1 : 激发态; S_2 : 激发态; S_i : 振动旋转能级; T_1 : 三重激发态; ISC: 系间窜越; TTET: 三重激发态-三重激发态能量转移

图 1 4 类上转换发光材料发光机制

Fig. 1 Luminescence mechanisms of four upconversion luminescence materials

克斯发光材料的进展, 以期为上转换发光材料应用与研究提供新的思路和方法。

1 稀土上转换发光纳米材料

稀土元素的外层电子结构非常丰富, 外部的电子轨道包括 5d、6s 和 4f 层, 其中 4f 层中的电子接受能量后实现的电子跃迁可表现出特征发光^[11]。通过不同敏化剂和激活剂共掺杂于同种基质材料内实现两者之间的能量传递, 激活剂 4f 电子层中不同电子辐射跃迁回到基态所发射出不同能量的上转换光, 可由此实现多色发光。一般情况下基质材料的晶体结构需要与掺杂离子紧密匹配且拥有足够的透明度让近红外光子在晶格中自由迁移。目前已报道的镧系掺杂的基质材料有氟化物、氧化物等, 但氟化物基质仍然是首选材料。四氟钇酸钠(NaYF_4)是常用的氟化物基质, 由于声子能量低和镧系元素能级匹配, 被认为是较优的基质材料之一。通过水热或溶剂热等方式可合成得到 α 、 β 两种晶型的 NaYF_4 纳米晶, 其中 α 相为立方相, 相比之下, 热力学稳定的六方相也就是 β 相的 NaYF_4 作为基质材料表现出更优的增强发光的特性。镧系元素中, 镱离子(Yb^{3+})是典型的敏化剂, 其表现出单一的激发态, 可与铥(Ho^{3+})、铒(Er^{3+})、铥(Tm^{3+})等众多镧系激活剂的 f-f 跃迁能级匹配较好, 因此 Yb^{3+} 可向这些镧系离子有效传递能量实现上转换发光。该类材料在近红外光通常是 980 nm 或者 808 nm 光激发下, 在近红外至可见光区发射出半峰宽较窄的特征电子跃迁发射峰。借助于这种发光技术可实时在动物模型中观察纳米材料在组织脏器内的分布情况。合成得到的稀土上转换发光纳米材料结构通常为球形, 也有六方形和棒状等, 粒径可调并影响发光强度, 几百纳米粒径的发光强度优于几纳米粒径的发光强度。除此之外, 发光强度还受到结晶度、基质物相、掺杂敏化离子和激活离子浓度等因素的影响^[12]。如图 2 所示, 为了降低发光淬灭, 通常将该类材料制成核壳结构以增强其发光。还可以通过表面修饰包括聚合物修饰和蛋白修饰等以增加亲水性和靶向性, 由此在材料表面构筑的疏水空腔可作为药物载体实现高效载药及可控药物释放^[13]。以下结

合多种治疗方式分述举例该类材料在生物医学领域中的应用。

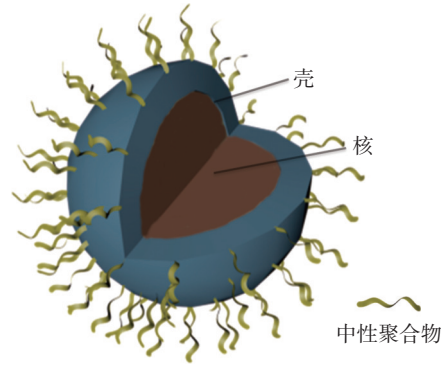


图 2 中性聚合物修饰的核壳型稀土纳米材料示意图

Fig. 2 Basic structure of core-shell rare earth nanomaterial modified by polymer

1.1 用于光动力治疗

光动力疗法(photodynamic therapy, PDT)发展至今已近百年, 在临床中对部分疾病尤其是在皮肤类疾病的治疗中展现出独特的治疗优势^[14]。一般来说, 需要一个外部光源来激活光敏剂, 将光能传递给敏化剂使其产生活性氧, 导致肿瘤细胞凋亡或坏死。该治疗方法具有可重复给药、光剂量可控、副作用小以及局部治疗等优点, 可很好地解决常规三大治疗方式(手术、放疗和化疗)产生的一些治疗局限性^[15]。为扩大光动力疗法在深层肿瘤中的应用并增加其生物相容性, 可将上转换纳米材料用作能量转换器, 将“生物窗口”(700~1300 nm)的近红外光上转换为更短波长的光^[16], 从而增加光对组织的穿透深度, 避免使用紫外光对组织造成的二次伤害。Chan 等^[17]提出了一种新型的多功能纳米核壳结构治疗平台。在该设计方案中, 以 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Tm}@$ $\text{NaYF}_4:\text{Yb}/\text{Nd}$ 为核壳型稀土纳米材料, 在其表面修饰聚合物聚赖氨酸(PLL)而显现出电正性, 通过静电作用与表面带有负电荷的石墨氮化碳量子点(CNs)结合形成复合纳米药剂(UCNP-PLL@Cns)。基于上转换能量传递过程, 由核壳结构的稀土纳米材料吸收 808 nm 近红外光后发射出紫外至可见光, 再被石墨氮化碳量子点吸收而产生对细胞有毒的活性氧实现光动力治疗。

基于该能量传递过程, Guan 等^[18]设计了一种复合纳米粒子(UCNP-PEG-FA/PC₇₀), 其中叶

酸(FA)配体用于修饰纳米颗粒以增强对肿瘤的靶向性和促进内化,当稀土纳米材料将近红外光转换成紫外可见光时激活一种卟啉结构的光敏剂(PC₇₀),由此可在低氧环境中产生单线态氧用于光动力学治疗。再者,Zhang等^[19]等利用核壳结构的纳米材料(UCNP@mSiO₂)存储两种类型的客体分子:可用于化疗的阿霉素(DOX)和可用于光动力学治疗的二氢卟吩(Ce6)。通过稀土上转换纳米颗粒的能量转换可激发Ce6产生活性氧联合化疗对肿瘤产生不可逆损伤。因此,稀土上转换纳米材料用于光动力学治疗,主要基于能量传递过程实现低能量上转换发光激活光动力学治疗中的敏化剂产生活性氧,单独或联合其他治疗模式增强肿瘤治疗疗效。

1.2 用于光热治疗

光热疗法(photothermal therapy, PTT)是一种基于光热剂,将光能转化为热能从而使肿瘤细胞产生不可逆热损伤而实现热消融治疗的方法^[20]。由于稀土离子的消光系数较低,稀土纳米材料在光照下转化为热能的能力有限,而当其与有较强消光系数的纳米粒子,如金(Au)和硫化铜(CuS)等复合时,可提高光热疗法的有效性。形成复合结构是将稀土纳米材料与光热性能相结合的有效方法。通过与CuS复合,Zhang等^[21]设计出粒径大约120 nm的透明质酸(HA)修饰的UCNP@CuS-HA复合材料,实现了超小粒径的CuS在肿瘤光热治疗中的协同应用。Cheng等^[22]构建了用于分子/磁性双靶向光热治疗的稀土纳米材料,氧化铁(IONP)多功能纳米粒子。在研究中,紫外吸收光谱表明这种纳米材料具有较宽的光吸收范围,其吸收从可见光延伸至近红外区,并在近红外激发下可以有效地杀死癌细胞。考虑到在42~45 °C温度下,长时间处理可能会损伤正常组织,Zhu等^[23]利用碳壳(Carbon)作为光热剂构建核/壳结构上转换纳米复合物(NaLuF₄:Yb,Er@NaLuF₄@Carbon),在实现对体内肿瘤有效光热消融的同时提供温度反馈,以减少过热对正常组织的损伤。Xu等^[24]构建了一个将上转换纳米粒子和染料(IR-1048)共同引入脂质适配体纳米结构的一体化治疗纳米平台(UCILA)。IR-1048染料移植到脂质双分子层中,可以作为光声成像、

光学血管成像、光热成像和第二近红外窗口光热治疗的治疗剂。此外,装载在UCILA内部的UCNP具有良好的发光特性和高X射线衰减系数,可作为计算机断层扫描和热敏上转换发光成像的对比剂,实时跟踪肿瘤代谢活动和温度反馈。由此可见稀土纳米材料与光热药剂结合形成复合纳米药剂,两者之间并无能量传递等关系,但仍可发挥各自的作用实现多模式诊断与协同治疗。

1.3 用于智能载药治疗

构筑稀土纳米材料药物传递系统最简单的方法是在纳米材料表面包裹中性聚合物、DNA、蛋白等。这些聚合物将为药物提供一个贮存库,并有助于保持纳米材料的胶体稳定性。聚乙二醇(PEG)是最常用的包覆于稀土纳米材料的聚合物,因其具有高水溶性和良好生物相容性等优点被广泛应用^[25-27]。Liu等^[28]以此设计了一种复合纳米颗粒(UCNPs@MIL-PEG),其中以稀土上转换纳米材料为核心,含铁的金属有机框架结构(MIL)为壳层,PEG对其进行进一步修饰。核壳纳米粒子可以同时呈现出稀土上转换纳米颗粒的近红外发光和含铁元素壳的T₂加权磁共振成像。随后,装载阿霉素的UCNPs@MIL-PEG纳米粒子可用于潜在的上转换发光/磁共振双模式成像,在协同成像条件下实现对病灶的精准诊断并同时实现对药物的可控释放,达到对癌症的精准诊疗。由于结构中的PEG对pH有响应,在pH为7.4时,聚合物开始收缩,小的药物分子很难穿透高密度的PEG壳,被限制在聚合物基体中。而在pH为5.8时,PEG壳层保持膨胀状态,导致小分子化疗药物阿霉素从相对松散的网络中顺利扩散,可促进药物在癌症区域的快速释放。因此环境响应型聚合物对纳米药物控释起到很好的作用。又如Dain等^[29]设计了NaYF₄:Yb/Er@SiO₂@P(NIPAM-co-MAA)核/壳结构微球,通过层层设计创造了一种pH诱导的热响应药物控释体系,实现药物的可控释放。此外,再比如将DNA修饰在稀土纳米材料表面,基于DNA的UCNP能够实现多种功能,并具有广阔的应用前景。目前,已有多种DNA修饰的UCNP复合材料被开发用于诊断和治疗。Han等^[30]利用一种DNA修饰UCNP显著提高了纳米粒子在高盐缓

冲条件下的稳定性。此外,这种 DNA 还拥有高载药能力,可在保持温度传感能力,控制靶向抗癌药物递送的同时实现深部组织成像。

综上所述,通过形成复合结构等方式,镧系元素掺杂的上转换纳米晶中融入了光动力治疗、光热治疗、药物递送与可控释放等功能。但由于材料的发光量子效率低和对近红外光的吸收范围窄,该类材料在生物医学方面的应用尚未得到充分应用。通过对发光机理的深入研究,增强该类材料的发光效率,可使得稀土上转换材料在生物医学领域中的应用得到进一步提升与拓展。

2 单光子频率上转换发光材料

FUCL 是通过激发基态的热振动-旋转能级(S_1)到第一激发态(S_1)产生上转换发光回到基态的最低能级(S_0)^[31]。值得注意的是,频率上转换发光是一种典型的单光子过程,而需要将低能光子转变为高能光子额外的能量是由来自于原始玻尔兹曼分布的热量提供的^[32]。图 3 列出了几种目前已报道的可作为单光子频率上转换材料的结构。由于频率上转换材料是有机小分子,与稀土上转换纳米材料相比,表现出相对较高的光吸收率和可调控的激发和发射波长,并具有良好的耐氧性和高效率等优点,在生物医学领域具有潜在应用价值。

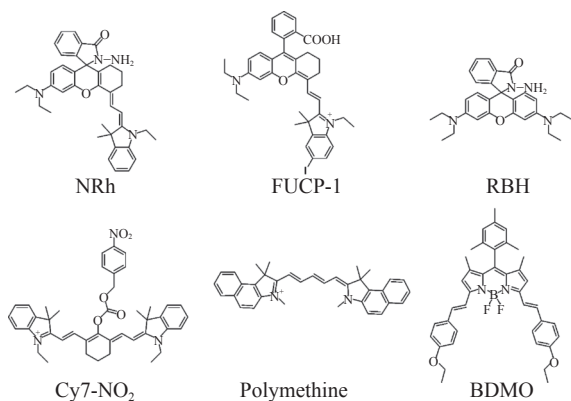


图 3 已报道的几种单光子频率上转换发光材料的结构
Fig. 3 Some reported structures for single-photon frequency upconversion luminescence

2.1 用于离子检测

有毒有害的金属阳离子污染物长期以来对环

境和生命构成严重威胁,因此建立快捷、高灵敏度、高选择性的检测方法是目前研究的一个热门方向。Liu 等^[33]利用特定的铜离子(Cu^{2+})诱导螺旋内酰胺开环,开发出了单光子频率上转换探针(NRh)。该探针在水中 Cu^{2+} 具有良好的灵敏度和选择性,成功地检测了肝豆状核变性患者尿铜水平。Yang 等^[34]人设计合成了含有单硫代螺内酯基团的罗丹明衍生物近红外化学剂量计(FUC-1)。由于汞和硫原子之间的强结合,FUC-1 经历了从非荧光硫内酯形式到近红外荧光开环形式的独特转变,对二价汞离子和甲基汞都表现出高选择性和高灵敏性。而 Xia 等^[35]开发出的探针(rhodamine B hydrazine, RBH)在不同波长的激发下能同时发射上转换荧光和下转换荧光,不仅对亚汞离子具有良好的选择性,而且对 NO_2^- 也有较高的灵敏度。由于有机小分子光学探针具有可修饰性强和检测简便等优点,在多学科领域有良好的应用。

2.2 用于生物物质检测

酶在生物体中是一种非常重要的催化剂,它可以使生物体中的化学反应在温和的条件下有效且持续地进行。因此利用荧光探针检测酶含量在疾病诊断中发挥着重要的作用。Zhu 等^[36]制备了一种基于罗丹明衍生物(NRh)和 3,4-二硝基苯胺的近红外频率上转换发光化学剂量计,以检测谷胱甘肽 S-转移酶的活性水平。由于光诱导作用,罗丹明衍生物和邻双硝基取代苯胺之间可发生电子转移过程,这会导致罗丹明荧光猝灭。但是在谷胱甘肽 S-转移酶的作用下,谷胱甘肽被硝基取代,在 850 nm 光激发下发出 832 nm 的光。活细胞内稳定的 pH 值对维持细胞内环境平衡非常重要,如细胞增殖、新陈代谢、吞噬作用和酶的活性。Chen 等^[37]引入甘露糖改善频率上转换探针的生物相容性和在水溶液中的溶解度,可以靶向溶酶体,从而灵敏地测定溶酶体中 pH 的变化。此外,Dong 等^[38]也设计合成了一种频率上转换探针用于检测溶酶体中的 pH 值,由于该探针内酰胺环开闭结构发生转换,探针的发射强度提高了近 80 倍。缺氧被认为是肿瘤微环境中使得肿瘤对抗治疗的主要因素之一,因此可通过提高局部免疫抑制削弱抗肿瘤免疫应

答。Li 等^[4]构建了一个基于花菁结构的硝基还原酶频率上转换探针(Cy7-NO₂),该探针可以在近红外光的作用下通过对硝基还原酶的检测与成像,可以对乏氧肿瘤进行检测与成像。此外,Yu 等^[39]报道了一种线粒体靶向近红外探针(NRh-O)用于频率上转换发光乏氧成像。在低氧条件下,该探针可被诱导还原成相应的胺,具有高灵敏度和选择性。

2.3 用于生物成像及肿瘤治疗

在生物成像和肿瘤诊疗中,使用低能量近红外光激发是首选,这样可以避免使用紫外光激发进而避免了对活体生物的光损伤,同时也有利于增加光在组织中的穿透深度并有利于提高信噪比^[32]。Liu 等^[7]开发了一个分子荧光团(NRh-1)在体内成像,可以在 808 nm 激发下产生 730 nm 的强近红外发射。结果表明该探针不仅提高了体内信噪比,而且相比于稀土上转换材料,可以很容易地在 72 h 内从体内清除。Tian 等^[40]设计合成了一种有机分子上转换敏化剂(FUCP-1)并且首次报道了基于肿瘤内部光动力治疗的频率上转换机制。重原子(常用非金属碘原子)的引入显著促进激发态能级从单重激发态向三重激发态转变,促进了产生对细胞有损伤的单线态氧,可有效抑制肿瘤生长。Zhou 等^[41]构建了一系列具有上转换发光的供体-受体结构的新型硫代吡啶染料,不仅能快速、有效地对骨肉瘤细胞内的线粒体成像,在成像时还可利用非辐射跃迁实现光能到热能的转变,因此该物质在成像引导下还能产热对线粒体进行热损伤达到兼具诊疗效果。除上述结构外,氟硼荧吡咯结构(BODIPY)具有优秀的量子产率和光稳定性,因此Jia 等^[42]利用水溶性的硅纳米颗粒掺杂 BODIPY 实现高性能的生物成像且上转换的量子产率达到了 6.9%。这些工作扩展了单光子频率上转换材料在生物医学领域的研究,也为这类材料的研究提供了有力的理论依据。

综上所述,相比于传统有机荧光分子的小转换发光,频率上转换发光成像技术将具有结构可调、无光损伤、抗光漂白性好、检测灵敏度高、穿透深度优等特点,在生物成像中极具优势。但该类材料报道较少,对于何种有机染料结构具有

频率上转换特性目前还尚无规律可循。增加对频率上转换发光材料分子结构和发光特性的研究可促进该类材料在生物医学检测与成像中的应用。

3 三重态-三重态碰撞能量湮灭型上转换材料

三重态-三重态碰撞能量湮灭型上转换(TTA)发光有着非常独特的光物理过程,其光学特性为非线性。图 4 列举了一些常见的 TTA 材料结构。该组合中主要由两部分组成,包括了光敏剂(作为一种能量供体)和湮灭剂(作为一种能量受体)。上转换发光过程主要基于光敏剂在三重激发态将能量传递给湮灭剂并由两个湮灭剂分子在三重激发态碰撞产生更高能量的单重激发态进而发射出高能光子。近期,利用三重态湮灭能量转移技术,Askes 等^[43]以 630 nm 临床级激光器作为激发源,构建了具有蓝光发射的聚乙二醇化脂质体复合物,该研究结果有效地验证了双组份能量转移上转换发光复合物可实际应用。此外 Li 等^[44]构筑了一种上转换发光的比率型温度探针。该探针是采用了一种对温度敏感的双亲性聚合物同时包裹光敏剂与湮灭剂而形成基于能量湮灭转移的纳米胶束。研究结果表明上转换的发光比率对温度具有较灵敏的响应,并在一定范围能呈现出线性范围,可用于纳米测温。在性能优异的同时还具有较好的对空气的低敏感性、稳定

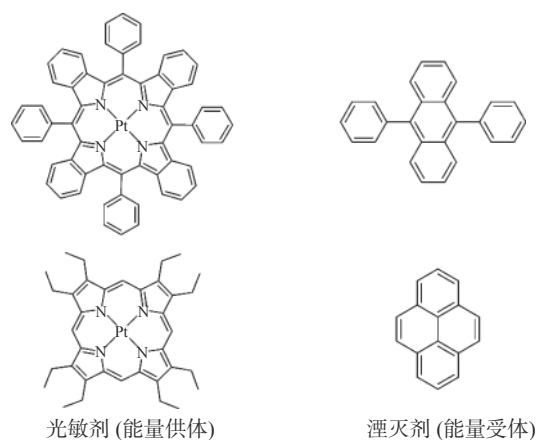


图 4 典型的三重态-三重态碰撞能量湮灭型上转换材料的光敏剂与湮灭剂

Fig. 4 Typical sensitizer and annihilator structures of triplet-triplet annihilation type upconversion energy transfer material

性和可重复性。因此,通过封装技术制备上转换比率型的纳米光学温度探针,可以很好的消除生物背景干扰,在生物体的高灵敏局域成像和疾病诊疗中有着潜在的研究和临床价值。

对于构筑 TTA 发光体系通常要求有机光敏剂中存在重原子,利用重原子效应引起强自旋轨道耦合,可有效地实现系间穿越并增加到达三重激发态的几率。构筑 TTA 上转换发光体系,还要求光敏剂和湮灭剂之间具有匹配的三重激发态能级。该发光过程还受到分子氧的影响,其光敏剂和湮灭剂的三重激发态对分子氧敏感,可淬灭上转换过程。为了克服这一限制,应设计具有高阻隔性能的抗氧保护机制。Huang 等^[45]利用上述特性开发了 TTA 核壳结构的前药物传递纳米颗粒,该纳米颗粒包含预载 TTA 分子的介孔二氧化硅纳米颗粒为核心,封装抗癌前药分子的两亲性聚合物为外壳。系统中强烈的 TTA 上转换蓝光在远红光刺激下激活抗癌前药分子,在体内表现出有效的肿瘤生长抑制作用。同样,Lv 等^[46]将前药和光敏剂封装在两亲性嵌段共聚物高分子胶束中免受氧分子的攻击,有效地释放药物用于癌症治疗。这些工作不仅为癌症治疗提供了一个新的纳米平台,也为新的有机 TTA 上转换技术应用与肿瘤诊疗奠定了基础。

TTA 上转换发光体系是光敏剂和湮灭剂通过碰撞,实现能量传递发出上转换光,因此该体系的发展受到光敏剂和湮灭剂研究的双重制约。此外,该上转换发光体系对氧敏感,用于生物成像或检测药物递送时,需要使用聚合物等包裹技术实现与氧气隔离,这也是限制该技术应用的关键因素。因此,如何提高上转换发光效率、开发更多的 TTA 发光体系和隔绝氧气的封装技术均是本领域的研究热点与难点。这些技术的进步与发展将有助于推动 TTA 在生物医学领域中的应用。

4 双光子吸收材料

1931 年,Göppert-Mayer 首次提出了双光子吸收(TPA)过程的概念。她从理论上预测,该过程会导致原子或分子在较低能级和较高能级之间的跃迁^[47]。1961 年,Kaiser 等提出在一个 $\text{CaF}_2:\text{Eu}^{2+}$ 晶体样品中首次观察到由激光器 694.3 nm 波长

辐射激发的双光子吸收发生频率上转换荧光^[48]。该过程被描述为材料在超短时间内连续吸收两个低能光子使其达到单重激发态,并由此回落至基态时发射出比吸收的低能光子能量更高的高能光子。由于低能光子通常处于近红外区域,在生物医学成像应用中表现出较好的光穿透深度和可调发光范围,因此该种上转换发光受到极大的关注。例如 Guo 等^[49]采用两亲性聚合物包裹构筑了多模态纳米粒子用于双光子激发光动力学治疗。该复合纳米制剂具有良好的水溶性、光稳定性和高荧光强度等优点,不仅可用于深层组织中癌细胞成像,还能高效地生成单线态氧杀死癌细胞。Hu 等^[50]提出了第一个 NO 激活荧光光敏剂(DBB-NO)的例子,伴随 NO 升高的双光子吸收,用于成像引导下的光动力治疗。结合聚集诱导发光(AIE)特性,Gu 等^[51]设计并制备了一种纳米双光子光敏剂,通过两亲性聚合物封装并用细胞穿透肽对其功能化。其具有 TPA 横截面大、聚集诱导发光、单线态氧的生成效率高和生物相容性好等独特优势,在癌细胞中展现出较好的成像与治疗性能。Yang 等^[52]构建了共价有机框架材料(COF-606),其具有优良的双光子吸收性能和光稳定性,在很大程度上避免了聚集引起的猝灭,因此提供了较高的活性氧生成效率,作为双光子吸收光敏剂用于深部肿瘤组织的光动力治疗。

此外,许多金属配合物具有重原子效应,可有效实现系间穿越过程,促进体系内的单重态到三重态的跃迁。例如 Zhao 等^[53]开发了一种多肽偶联靶向肿瘤细胞中线粒体的 Ru(II)光敏剂(RuC-RGD)。研究表明,RuC-RGD 在癌细胞的线粒体中大量积累而且触发了线粒体介导的细胞凋亡,显示了良好的双光子 PDT 特性。因为癌细胞内的谷胱甘肽(GSH)水平明显高于正常细胞,Zeng 等^[54]报道一种新的 GSH 激活的双核 Ru(II)复合物作为双光子光动力治疗的光敏剂,因配体具有很强的吸电子性导致荧光猝灭,而 GSH 是可以通过还原偶氮配体来大大提高 Ru(II)配合物的发光性能,在癌症治疗中表现出良好的光毒性。与 Ru(II)配合物相比,铱(III)配合物具有更高的配体场强和更强的自旋轨道耦合。Tian 等^[55]探索了一系列环金属铱(III)配合物的双光子光动力抗癌活性,该配合物的配体被推/拉电子基团取代,以调节其电子性质和生物

亲和力。结果显示,铈(III)配合物可在线粒体中定位并在癌细胞中表现出较高的光毒性。

此外,细胞内黏度变化也可用于触发探针,实现响应型检测。Zhang等^[56]构建了两个对细胞内黏度变化响应的可用于检测的双光子成像探针。其中一个探针(Lyso-TA)不但在细胞中动态监测到溶酶体的融合与迁移,还监测到了可自噬的线粒体。该探针可以在简单的室温反应中转化为另一种探针(Mito-QA)用于研究线粒体的功能紊乱与失控。细胞在环境的有害刺激下产生氧化应激时, γ -谷氨酰转肽酶含量会明显上调。 γ -谷氨酰转肽酶水平的检测对于肿瘤细胞的鉴定和细胞氧化应激的研究具有重要意义。Du等^[57]构建了一种新型的 γ -谷氨酰转肽酶双光子荧光探针(Glu-TPAN),通过将S构型谷氨酸连接在荧光染料的萘环上,使得染料的发光被抑制。 γ -谷氨酰转肽酶可以特异性切断谷氨酸,恢复荧光染料结构,并且产生强烈的双光子荧光信号。该探针通过检测细胞内 γ -谷氨酰转肽酶含量,可以准确区分正常细胞与癌细胞,同时能够检测细胞内产生的氧化应激。

然而在实际应用中,TPA要想能够实现良好的空间限域激发效果,激发光源通常采用功率密度很高的飞秒脉冲激光器,在价格上比较昂贵且被激发的染料分子往往需要具有较大的双光子吸收截面,此类染料种类并不多,所以TPA效应存在一定的应用局限性。如何优化双光子吸收上转换各能量传递过程并降低能量损失以获得大的反斯托克斯位移与高的上转换效率是该领域的研究难点与热点。

5 展 望

生物光学成像就是通过光学技术并利用直观的图像表达小到微观细胞大到生物体中的特定区域的信息分子,对其进行实时监控、功能测定等。由于上转换发光技术有效消除了生物组织的自发荧光,可获取高灵敏和低噪音的高质量成像图像,是一种理想的生物成像方式。这种成像方式的光源通常在可见光至近红外波长范围且波长可调、激发光功率低、对活体组织几乎没有损

害,在生物医学疾病诊断与治疗领域表现出良好的应用前景。除此之外,上转换发光技术还易于与其他生物成像或治疗技术复合,通过构建复合纳米材料实现诊疗多功能化。虽然这种技术具有很多的优点,但如何提高上转换发光效率并开发多种上转换发光材料一直是该领域中的研究热点与难点。通过技术的积累,上转换光学成像正飞速发展。可以预见该类材料将在疾病诊断、基因筛查、蛋白质分析、生物评价、新药筛选、在体实时成像等生物医学成像领域中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] WU P, ZHU Y, LIU S Y, et al. Modular design of high-brightness pH-activatable near-infrared BODIPY probes for noninvasive fluorescence detection of deep-seated early breast cancer bone metastasis: remarkable axial substituent effect on performance[J]. *ACS Central Science*, 2021, 7(12): 2039 – 2048.
- [2] XIONG H, KOS P, YAN Y F, et al. Activatable water-soluble probes enhance tumor imaging by responding to dysregulated pH and exhibiting high tumor-to-liver fluorescence emission contrast[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2016, 27(7): 1737 – 1744.
- [3] LI Y H, SUN Y, LI J C, et al. Ultrasensitive near-infrared fluorescence-enhanced probe for *in vivo* nitroreductase imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(19): 6407 – 6416.
- [4] LI Y H, DENG Y, LIU J, et al. A near-infrared frequency upconversion probe for nitroreductase detection and hypoxia tumor *in vivo* imaging[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2019, 286: 337 – 345.
- [5] ZHENG X, KANKALA R K, LIU C G, et al. Lanthanides-doped near-infrared active upconversion nanocrystals: upconversion mechanisms and synthesis[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2021, 438: 213870.
- [6] ZHU L, YE C Q, DAI G L, et al. Highly-efficient upconversion via direct one-photon absorption of xanthene-based chromophores[J]. *Dyes and Pigments*, 2020, 172: 107853.
- [7] LIU Y, SU Q Q, ZOU X M, et al. Near-infrared *in vivo* bioimaging using a molecular upconversion probe[J]. *Chemical Communications*, 2016, 52(47): 7466 – 7469.

- [8] ZHOU J, LIU Z, LI F Y. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging[J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(3): 1323 – 1349.
- [9] GAJDOS T, HOOP B, ERDELYI M. Hot-Band Anti-Stokes Fluorescence Properties of Alexa Fluor 568[J]. *Journal of Fluorescence*, 2020, 30(3): 437 – 443.
- [10] HAN J L, ZHANG J, ZHAO T H, et al. Photoswitchable photon upconversion from turn-on mode fluorescent diarylethenes[J]. *CCS Chemistry*, 2021, 3(1): 665 – 674.
- [11] ZHU X H, ZHANG J, LIU J L, et al. Recent progress of rare-earth doped upconversion nanoparticles: synthesis, optimization, and applications[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(22): 1901358.
- [12] HOU Z Y, ZHANG Y X, DENG K R, et al. UV-emitting upconversion-based TiO₂ photosensitizing nanoplatform: near-infrared light mediated *in vivo* photodynamic therapy *via* mitochondria-involved apoptosis pathway[J]. *ACS Nano*, 2015, 9(3): 2584 – 2599.
- [13] GONG N Q, MA X W, YE X X, et al. Carbon-dot-supported atomically dispersed gold as a mitochondrial oxidative stress amplifier for cancer treatment[J]. *Nature Nanotechnology*, 2019, 14(4): 379 – 387.
- [14] BELALI S, KARIMI A R, HADIZADEH M. Cell-specific and pH-sensitive nanostructure hydrogel based on chitosan as a photosensitizer carrier for selective photodynamic therapy[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 110: 437 – 448.
- [15] XU J, XU L G, WANG C Y, et al. Near-infrared-triggered photodynamic therapy with multitasking upconversion nanoparticles in combination with checkpoint blockade for immunotherapy of colorectal cancer[J]. *ACS Nano*, 2017, 11(5): 4463 – 4474.
- [16] HOU W J, LIU Y, JIANG Y, et al. Aptamer-based multifunctional ligand-modified UCNPs for targeted PDT and bioimaging[J]. *Nanoscale*, 2018, 10(23): 10986 – 10990.
- [17] CHAN M H, PAN Y T, LEE I J, et al. Minimizing the heat effect of photodynamic therapy based on inorganic nanocomposites mediated by 808 nm near-infrared light[J]. *Small*, 2017, 13(21): 1700038.
- [18] GUAN M R, DONG H, GE J C, et al. Multifunctional upconversion–nanoparticles–tris(4-methylpyridyl)porphyrin–fullerene nanocomposite: a near-infrared light-triggered theranostic platform for imaging-guided photodynamic therapy[J]. *NPG Asia Materials*, 2015, 7(7): e205.
- [19] ZHANG T, LIN H M, CUI L R, et al. Near infrared light triggered reactive oxygen species responsive upconversion nanoplatform for drug delivery and photodynamic therapy[J]. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 2016(8): 1206 – 1213.
- [20] HU C L, ZHANG Z X, LIU S N, et al. Monodispersed CuSe sensitized covalent organic framework photosensitizer with an enhanced photodynamic and photothermal effect for cancer therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(26): 23072 – 23082.
- [21] ZHANG M K, WANG X G, ZHU J Y, et al. Double-targeting explosible nanofirework for tumor ignition to guide tumor-depth photothermal therapy[J]. *Small*, 2018, 14(20): 1800292.
- [22] CHENG L, YANG K, LI Y G, et al. Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobe for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2011, 50(32): 7385 – 7390.
- [23] ZHU X J, FENG W, CHANG J, et al. Temperature-feedback upconversion nanocomposite for accurate photothermal therapy at facile temperature[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 10437.
- [24] XU M Z, XUE B, WANG Y, et al. Temperature-feedback nanoplatform for NIR-II penta-modal imaging-guided synergistic photothermal therapy and CAR-NK immunotherapy of lung cancer[J]. *Small*, 2021, 17(43): 2101397.
- [25] FENG L L, HE F, DAI Y L, et al. A versatile near infrared light triggered dual-photosensitizer for synchronous bioimaging and photodynamic therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, 9(15): 12993 – 13008.
- [26] ZHANG Y, REN K W, ZHANG X B, et al. Phototearable tape close-wrapped upconversion nanocapsules for near-infrared modulated efficient siRNA delivery and therapy[J]. *Biomaterials*, 2018, 163: 55 – 66.
- [27] JIN Y Y, NI D L, GAO L, et al. Harness the power of upconversion nanoparticles for spectral computed tomography diagnosis of osteosarcoma[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(33): 1802656.
- [28] LIU Y N, ZHANG C, LIU H, et al. Controllable synthesis of up-conversion nanoparticles UCNPs@MIL-PEG for pH-responsive drug delivery and potential up-conversion luminescence/magnetic resonance dual-mode imaging[J]. *Journal of Alloys and*

- Compounds, 2018, 749: 939 – 947.
- [29] DAI Y L, MA P A, CHENG Z Y, et al. Up-conversion cell imaging and pH- induced thermally controlled drug release from NaYF₄: Yb³⁺/Er³⁺@hydrogel core-shell hybrid microspheres[J]. *ACS Nano*, 2012, 6(4): 3327 – 3338.
- [30] HAN S Y, SAMANTA A, XIE X J, et al. Gold and hairpin DNA functionalization of upconversion nanocrystals for imaging and in vivo drug delivery[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(18): 1700244.
- [31] JAIN R K, HU C, GUSTAFSON T K, et al. Absorption processes associated with anti-Stokes fluorescence in rhodamine B solutions[J]. *Journal of Applied Physics*, 1973, 44(7): 3157 – 3161.
- [32] ZHU X J, SU Q Q, FENG W, et al. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2017, 46(4): 1025 – 1039.
- [33] LIU Y, SU Q Q, CHEN M, et al. Near-infrared upconversion chemodosimeter for in vivo detection of Cu²⁺ in Wilson disease[J]. *Advanced Materials*, 2016, 28(31): 6625 – 6630.
- [34] YANG H R, HAN C M, ZHU X J, et al. Upconversion luminescent chemodosimeter based on nir organic dye for monitoring methylmercury in vivo[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, 26(12): 1945 – 1953.
- [35] XIA F Y, CHEN S R, YE C Q, et al. Dual-channel NO₂⁻/Hg²⁺ detections based on upconversion/downshifting[J]. *Journal of Luminescence*, 2020, 226: 117476.
- [36] ZHU W C, QIAN X L, WANG J, et al. Near-infrared frequency upconversion probes for monitoring glutathione S-transferase to evaluate acute liver injury[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2021, 347: 130640.
- [37] CHEN T H, ZHANG S W, JAISHI M, et al. New near-infrared fluorescent probes with single-photon anti-stokes-shift fluorescence for sensitive determination of pH variances in lysosomes with a double-checked capability[J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2018, 1(3): 549 – 560.
- [38] DONG Z, HAN Q X, MOU Z L, et al. A reversible frequency upconversion probe for real-time intracellular lysosome-pH detection and subcellular imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018, 6(9): 1322 – 1327.
- [39] YU H, SUN W L, TIEMUER A, et al. Mitochondria targeted near-infrared chemodosimeter for upconversion luminescence bioimaging of hypoxia[J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(42): 5207 – 5210.
- [40] TIAN R S, SUN W, LI M L, et al. Development of a novel anti-tumor theranostic platform: a near-infrared molecular upconversion sensitizer for deep-seated cancer photodynamic therapy[J]. *Chemical Science*, 2019, 10(43): 10106 – 10112.
- [41] ZHOU H, ZENG X D, LI A G, et al. Upconversion NIR-II fluorophores for mitochondria-targeted cancer imaging and photothermal therapy[J]. *Nature Communication*, 2020, 11(1): 6183.
- [42] JIA T, WANG Q H, XU M, et al. Highly efficient BODIPY-doped upconversion nanoparticles for deep-red luminescence bioimaging *in vivo*[J]. *Chemical Communication*, 2021, 57(12): 1518 – 1521.
- [43] ASKES S H C, BAHREMAN A, BONNET S. Activation of a photodissociative ruthenium complex by triplet-triplet annihilation upconversion in liposomes[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(4): 1029 – 1033.
- [44] LI L, ZHANG C, XU L, et al. Luminescence ratiometric nanothermometry regulated by tailoring annihilators of triplet-triplet annihilation upconversion nanomicelles[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, 60(51): 26725 – 26733.
- [45] HUANG L, ZHAO Y, ZHANG H, et al. Expanding anti-stokes shifting in triplet-Triplet annihilation upconversion for in vivo anticancer prodrug activation[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2017, 56(46): 14400 – 14404.
- [46] LV W, LONG K Q, YANG Y, et al. A red light-triggered drug release system based on one-photon upconversion-like photolysis[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2020, 9(21): 2001118.
- [47] HE G S, TAN L S, ZHENG Q D, et al. Multiphoton absorbing materials: molecular designs, characterizations, and applications[J]. *Chemical Reviews*, 2008, 108(4): 1245 – 1330.
- [48] KAISER W, GARRETT C G B. Two-photon excitation in CaF₂: Eu²⁺[J]. *Physical Review Letters*, 1961, 7(6): 229 – 231.
- [49] GUO L, GE J C, LIU Q, et al. Versatile polymer nanoparticles as two-photon-triggered photosensitizers for simultaneous cellular, deep-tissue imaging, and photodynamic therapy[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2017, 6(12): 1601431.
- [50] HU W B, XIE M, ZHAO H, et al. Nitric oxide

- activatable photosensitizer accompanying extremely elevated two-photon absorption for efficient fluorescence imaging and photodynamic therapy[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(4): 999 – 1005.
- [51] GU B B, WU W B, XU G X, et al. Precise two-photon photodynamic therapy using an efficient photosensitizer with aggregation-induced emission characteristics[J]. *Advanced Materials*, 2017, 29(28): 1701076.
- [52] YANG L L, ZHANG L, WAN S C, et al. Two-photon absorption induced cancer immunotherapy using covalent organic frameworks[J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, 31(42): 2103056.
- [53] ZHAO Z Z, QIU K Q, LIU J P, et al. Two-photon photodynamic ablation of tumour cells using an RGD peptide-conjugated ruthenium(II) photosensitizer[J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(83): 12542 – 12545.
- [54] ZENG L L, KUANG S, LI G Y, et al. A GSH-activatable ruthenium(II)-azo photosensitizer for two-photon photodynamic therapy[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(12): 1977 – 1980.
- [55] TIAN X H, ZHU Y Z, ZHANG M Z, et al. Localization matters: a nuclear targeting two-photon absorption iridium complex in photodynamic therapy[J]. *Chemical Communications*, 2017, 53(23): 3303 – 3306.
- [56] ZHANG H H, ZHU X J, LIU G, et al. Conformationally induced off-on two-photon fluorescent bioprobes for dynamically tracking the interactions among multiple organelles[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(10): 6730 – 6737.
- [57] DU W, SHAO T, WANG L, et al. Two-photon fluorogenic probe off γ -glutamyl transpeptidase for cancer cells identification with simultaneous oxidative stress monitoring[J]. *Dyes and Pigments*, 2022, 200: 110155.

(编辑: 李晓莉)

(上接第 83 页)

- [20] PANG P Y, JIN G R, LIANG C, et al. Rearranging low-dimensional phase distribution of quasi-2D perovskites for efficient sky-blue perovskite light-emitting diodes[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(9): 11420 – 11430.
- [21] ABDELHAMIED M M, SONG Y L, LIU W W, et al. Improved photoemission and stability of 2D organic-inorganic lead iodide perovskite films by polymer passivation[J]. *Nanotechnology*, 2020, 31(42): 42LT01.
- [22] 庄园, 徐公杰. 高分子聚合物封装对 (PEA)₂PbI₄ 荧光稳定性的改善 [J]. *光学仪器*, 2021, 43(5): 75 – 82.
- [23] 范成, 徐公杰, 蔡斌. 基于钙钛矿纳米晶体的复合材料微球发光特性的研究 [J]. *光学仪器*, 2020, 42(6): 42 – 48.
- [24] ZHUANG Y, MA P F, SHI J Q, et al. Stability improvement of 2D perovskite by fluorinated insulator[J]. *Advanced Materials Interfaces*, 2021, 8(20): 2101343.
- [25] LIANG K N, MITZI D B, PRIKAS M T. Synthesis and characterization of organic-inorganic perovskite thin films prepared using a versatile two-step dipping technique[J]. *Chemistry of Materials*, 1998, 10(1): 403 – 411.
- [26] DU K Z, TU Q, ZHANG X, et al. Two-dimensional lead(II) halide-based hybrid perovskites templated by acene alkylamines: crystal structures, optical properties, and piezoelectricity[J]. *Inorganic Chemistry*, 2017, 56(15): 9291 – 9302.
- [27] ZHANG S, ZHONG Y G, YANG F, et al. Cavity engineering of two-dimensional perovskites and inherent light-matter interaction[J]. *Photonics Research*, 2020, 8(11): A72 – A90.
- [28] <https://www.taodocs.com/p-136148511.html>.
- [29] <https://www.polyplastics.com/en/product/lines/film/index.html>.

(编辑: 张 磊)