

## 近红外二区荧光探针的设计及应用研究进展

黄艳芳, 李子婧\*

(厦门大学公共卫生学院, 分子影像暨转化医学研究中心, 福建 厦门 361102)

**摘要:** 高时空分辨率和高灵敏度的荧光成像技术是一种新兴的活体可视化检测工具。与近红外一区 (NIR-I, 700~900 nm) 相比, 近红外二区 (NIR-II, 1000~1700 nm) 成像具有更低的自发背景荧光、更深的组织穿透性和更高的信背比。因此, NIR-II 荧光成像能够促进深部疾病的精确诊断。NIR-II 荧光探针是 NIR-II 荧光成像的基础, 目前已开发了一系列基于有机和无机材料的 NIR-II 荧光探针, 包括有机小分子染料、基于小分子染料的有机纳米粒子、共轭聚合物、量子点、稀土掺杂纳米粒子和单壁碳纳米管等。本文综述近期新型 NIR-II 荧光探针的研究进展及其在生物医学领域的应用。

**关键词:** 荧光成像; 近红外二区; 荧光探针; 有机小分子染料

**中图分类号:** R 445      **文献标志码:** A

光学成像技术具有无创、安全、可视化能力强、空间分辨率高、成本低等优点, 可对生物分子、细胞、组织和生物体进行实时、多维的可视化监测, 是生物医学领域中十分重要的研究手段<sup>[1, 2]</sup>。荧光成像由于其高灵敏度、高分辨率以及操作简单等优点, 在生物分子检测成像、药物分布代谢跟踪、疾病检测和诊断, 特别是癌症早期诊断和影像引导治疗中, 具有良好的应用前景。

与可见光相比, 发射在近红外区域的荧光探针可获得更深的穿透深度和更好的成像质量, 因此, 近十年来, 荧光成像技术主要集中在近红外窗口上。近红外一区 (NIR-I, 700~900 nm) 荧光成像以其高灵敏度、快速反馈、无危害辐射、低成本等优点, 在生物医学研究中受到广泛关注。例如, 利用 NIR-I 荧光染料可以精确地描绘前哨淋巴结/肿瘤轮廓, 并在术中引导切除前哨淋巴结/肿瘤组织<sup>[3]</sup>。最近研究表明, 由于具有散射少、组织吸收可忽略和自荧光效应最小化等优势, 在第二近红外区 (NIR-II, 1000~1700 nm) 进行生物医学成像

**收稿日期:** 2020-11-16      **录用日期:** 2020-12-09

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81971674); 福建省自然科学基金 (2019J06006)

**\*通信作者:** zijing.li@xmu.edu.cn

可以充分提高成像的时空分辨率（约 20 ms 和约 25 mm）以及穿透深度（高达 3 cm），从而获得比 NIR-I 更好的图像质量和信背比<sup>[4-7]</sup>。

目前，临床批准的近红外荧光染料有两种，分别是吲哚菁绿（ICG，发射波长 800 nm）和亚甲基蓝（MB，发射波长 700 nm），两者都是可以快速排泄的小分子，主要用于 NIR-I 区成像<sup>[2]</sup>。随着化学合成的不断发展，新的荧光材料不断被发掘出来。NIR-II 荧光材料种类也日益丰富，如有机荧光材料、量子点、稀土纳米材料等被开发应用于近红外生物学成像。然而，缺乏良好的水溶性、稳定性、荧光效率和生物相容性等是 NIR-II 荧光材料发展的瓶颈。如何解决这些问题是 NIR-II 荧光成像领域的一个热点，也是未来发展的方向<sup>[8-12]</sup>。因此，开发荧光效率高、水溶性好、生物相容性好的新型 NIR-II 荧光材料对荧光成像技术的发展具有重要意义。在此，本文对近期新型 NIR-II 荧光材料的设计理念及其在生物学领域的应用进行了综述和展望，以为未来 NIR-II 荧光成像技术的发展提供参考思路。

## 1 有机 NIR-II 荧光探针

目前，已经开发出多种性能优良的有机 NIR-II 荧光材料（如表 1 所示）。有机 NIR-II 荧光探针具有明确的化学结构，并且易于代谢、生物相容性好<sup>[13]</sup>，因此极具吸引力和发展前景，有望率先在未来的临床中应用。

### 1.1 苯并双噻二唑（BBTD）类

具有供体-受体-供体（donor-acceptor-donor, D-A-D）特征的荧光团，如苯并双噻二唑（BBTD）衍生物，具有较大的斯托克斯位移（约 200 nm）和高成像质量。在 D-A-D 支架中，强电子供体与中心电子受体的空间结构可缩小杂化最高占据分子轨道（HOMO）/最低未占据分子轨道（LUMO）能级之间的能隙，将荧光发射红移至 NIR-II 窗口<sup>[13-16]</sup>。BBTD 是这类染料中十分经典的受体单元，通过调节 D-A-D 荧光团的受体和供体结构可以有效地改变吸收和发射光谱特征。

通常，BBTD 基荧光团最大吸收波长和发射波长分别位于 800 和 1000 nm 左右，波长相对较短。设计波长更长的新型荧光团将有利于在 NIR-II 对深层组织进行成像<sup>[17]</sup>。Ma 等<sup>[18]</sup>通过研究后发现，用硒取代 BBTD 骨架中的 S 原子可以使发射波长红移；另外，引入给电子氨基也可以使发射波长延长至 NIR-II。但是，单一的改进措施只能使波长红移 $\leq 50$  nm，如何进一步有效延长波长仍然是一个挑战。最近，Ma 及其团队<sup>[18]</sup>通过同时在 BBTD 骨架中引入一个 Se 原子和一个氨基，开发了一种最大发射波长为 1210 nm 的新的有机小分子荧光

团 FM1210。与 S-取代的类似物 CF1065 相比，FM1210 在发射波长上大幅红移了 145 nm，并保持相当的量子产率和亮度，从而使 FM1210 的活体成像质量明显高于 CF1065。此外，波长增益约为使用单一修饰的 BBTD 衍生物（约 50 nm）的 3 倍。超过 1200 nm 区域波长的大幅增加可归因于硒原子和氨基的协同作用。这些优点进一步使 NIR-II 荧光成像能够以 100 fps 的速度对小鼠进行成像。最后，Ma 等<sup>[18]</sup>还证明了纳米尺度的 FM1210 脂质体（FM1210-NPs）能以高信号背景比对肿瘤及血管系统进行活体成像（图 1）。

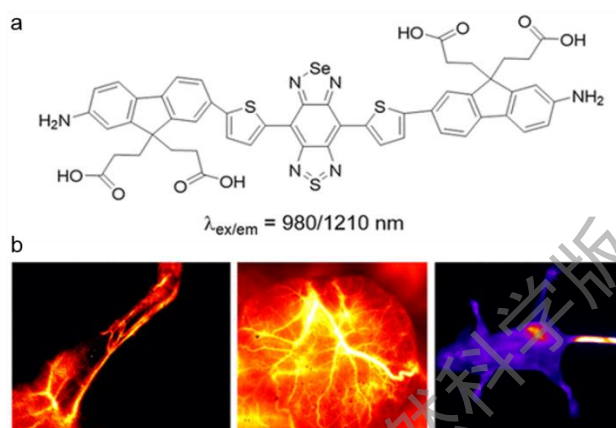


图 1 FM1210 的结构示意图 (a) 及 FM1210-NPs 用于血管及肿瘤的荧光显像 (b)<sup>[18]</sup>

Fig. 1 The structure of FM1210 (a) and fluorescence imaging for blood vessel and tumor with FM1210-NPs (b)<sup>[18]</sup>

揭示 BBTD 基荧光团的分子结构与光学行为之间的关系，也有助于开发具有长波长荧光发射的探针。为此，Yang 等<sup>[19]</sup>研究了 BBTD 核心两侧的共轭桥和电子供体对它们光学行为的影响。研究者发现，当将苯基噻吩共轭桥（例如 PT、PPT、PTT）置于 BBTD 芯的两侧时，它们的吸收在 640~860 nm 区域，而其发射约 1070 nm。当加入噻吩桥（TPAT）时，吸收和发射分别可达到 920 和 1150 nm。在苈吡咯（FP）官能团存在的情况下，由于吡咯的 -NH 与 BBTD 的氮原子之间形成了分子内氢键，吸收波长可达 1020 nm，发射光谱超过 1200 nm。这些结果表明，TPAT 和电子供体是延长荧光团吸收和发射的关键成分。基于此，Yang 等<sup>[19]</sup>选择 TPAT 和苯乙烯来放大共轭桥，N, N-二甲基氨基作为电子供体，将它们整合到 BBTD 支架中，从而获取了在 942 nm 处有一个很强的吸收峰、1302 nm 处有一个发射峰的目标分子 BBTD-1302。1302 nm 处的最大发射不仅有助于解决更深层肿瘤的成像问题，而且还避免了使用长通滤波器时荧光成像的亮度下降<sup>[13]</sup>。接着作者以聚乙二醇化表面活性剂对其进行功能化形成水分散性纳米粒子 BBTD-1302NPs。体外研究验证了 BBTD-1302NPs 的

高生物相容性和耐光降解性。基于 BBTD-1302NPs 的良好性能，作者在荷瘤裸鼠对 BBTD-1302NPs 的光热治疗能力进行了研究，结果显示经尾静脉注射 BBTD-1302NPs 和 980 nm 激光照射的小鼠肿瘤的生长受到抑制。

为了改善 NIR-II 荧光量子产率，目前还开发出多种具有屏蔽单元-供体-受体-供体-屏蔽单元 (shielding unit-donor-acceptor-donor-shielding unit, S-D-A-D-S) 结构的荧光团。引入屏蔽单元可以保护荧光团的共轭骨架免受分子间相互作用，从而提高量子产率。同时，供体单元也有助于改善 S-D-A-D-S 荧光团在水溶液中量子产率性能。例如，使用 3, 4-乙二氧基噻吩 (EDOT) 代替噻吩作为供体单元，可以使荧光探针水溶液中的量子产率从 0.002% 指数增加到 0.2% (相对于 IR-26, 在二氯乙烷中的量子产率为 0.05%)。具有增强疏水性的 3-辛基噻吩进一步作为 IR-FTAP 的第一供体，在水中的量子产率值提高了 0.53%<sup>[20]</sup>。尽管这种供体修饰可有效改善水溶液中的量子产率，但也会引起共轭主链更大的畸变，从而导致吸收移动，发射光谱以及吸收系数的降低。因此，为了有效地改善荧光团的亮度，在提高量子产率的同时应不牺牲吸收系数。基于此，Liang 等<sup>[21]</sup>设计并合成了以二辛基链取代的 3, 4-丙基二氧基噻吩 (PDOT) 为供体单元的新型 S-D-A-D-S NIR-II 荧光团 IR-FP8P，以增强量子产率和吸收系数。与 IR-FTAP 的 3-辛基噻吩相比，PDOT 供体的共轭主链扭曲较小。因此，IR-FP8P 实现了吸收光谱的红移和吸收系数的提高。此外，二辛基链取代的 PDOT 能很好地保护主链不与水相互作用，量子产率明显高于 IR-FEP。结果显示，IR-FP8P 在水溶液中的荧光量子产率为 0.6%，在水溶液中的峰值吸收系数为  $1.3 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。与 IR-FTAP 相比，亮度 (808 nm 激发) 增加了 5.7 倍以上。此外，IR-FP8P 可在 1300 nm 长通滤波器下对小鼠后肢血管进行成像，并观察到清晰的血管网络，信噪比约为 7。最后，通过偶联卵泡刺激素 (FSH) 制备了具有靶向能力的 FSH@FP8 荧光探针，可用于小鼠卵巢成像。

大多荧光分子探针聚集态时会由于平面结构分子间强  $\pi$ - $\pi$  相互作用，诱导荧光淬灭 (aggregation caused quenching, ACQ) 效应，使其在水溶液或生理条件下荧光亮度降低，从而限制了生物成像质量。2001 年，Tang 等<sup>[22]</sup>发现了与 ACQ 相反的一种奇特现象：聚集诱导发光 (aggregation induced emission, AIE)，即处于聚集状态的荧光探针强度大大高于分散态。因此，当赋予 NIR-II 荧光材料 AIE 特性，它将具有更高的荧光效率和光稳定性，同时大幅提升成像清晰度和分辨率。近期，Li 等<sup>[23]</sup>以苯并双噻二唑 (BBTD) 为电子受体、三苯胺 (TPA) 为电子供体、利用 AIE 活性分子转子，设计并合成了聚乙二醇化 NIR-II AIEgens。通过自组装技术获取了纳米颗粒 (粒径为 35 nm)，在约 1050 nm 处表现出最大荧光发射，在水中的最高量子产率为 10.3%。此外，该自组装的纳米颗粒相比于通过两亲性聚

合物包裹的对应物，表现出更小的多分散指数（PDI）值、更好的均一性以及更长久的胶体稳定性，在生物成像方面具有更好的潜力。接着，研究者利用此纳米探针在小鼠和兔模型中评估了这种 AIE NPs 的近红外荧光成像性能。成像结果显示，NIR-II 荧光成像在体分辨率达到约 38  $\mu\text{m}$ ，穿透深度约为 1 cm。该工作表明，高效自组装策略设计的 NIR-II AIE NPs 对血管相关疾病的诊断和治疗具有重要意义，为 NIR-II 荧光成像技术的转化应用提供了新的研究机会。

## 1.2 花菁类

基于聚次甲基骨架的花菁染料含有扩展  $\pi$  共轭体系，具有独特的共轭骨架结构。通过加长聚次甲基链、增加杂环的供体强度，或将杂原子从氧改变为其他硫族元素等方法，可以使染料吸收波长红移。与 D-A-D 型染料相比，花菁类染料合成过程相对简单，吸收强度较高 ( $\epsilon > 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )，特别是对近红外光有很强的吸收，因此很适用于近红外成像<sup>[24-25]</sup>。

由于循环时间短，菁类染料为血管成像提供的成像时间窗口通常小于 2 min。将染料与蛋白质进行生物结合可以增强循环时间，但这可能会产生猝灭效应而牺牲亮度。因此，需要发展一种新策略，在改善药代动力学特征的同时，又能确保 NIR-II 荧光团的高量子产率。Chen 等<sup>[26]</sup>通过白蛋白和花菁染料之间的工程化超分子组装，开发了一个自组装的、尺寸约为 50 nm 的 IR-783@BSA（图 2）。该复合物可以保持扭曲的构象，且 IR-783 与白蛋白之间的纳摩尔结合亲和力作用增强了扭曲的分子内电荷转移（TICT）过程和循环时间。循环时间增强使 IR-783@BSA 能够在注射后 3 h 内观测到亚 3  $\mu\text{m}$  宽的血管，同时具有超高的对比度，从而获得了高质量 NIR-II 成像。

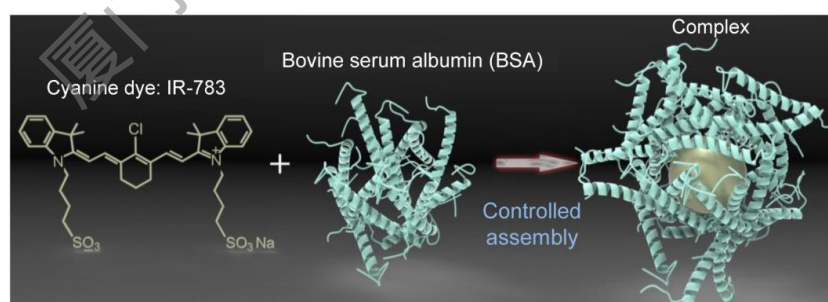


图 2 IR-783@BSA 复合物的结构简化设计<sup>[23]</sup>

Fig. 2 Simplified design for the formation of IR-783@BSA complex<sup>[23]</sup>

目前，NIR-II 菁类染料在生物成像中存在稳定性差、斯托克斯位移小或溶剂猝灭性等缺点。针对这些问题，Zhang 等<sup>[27]</sup>通过理性设计和理论计算相结合，提出构建 NIR-II 荧光

染料的新思路，即增大空间位阻和电子不对称性，并以此开发了一系列稳定、量子产率高、抗溶剂猝灭的新型菁荧光团（NIR II-RTs），其在水溶液中的吸收/发射峰高达 977/1008 nm。与传统的 NIR-II 七甲川菁相比，NIR II-RTs 具有较小的斯托克斯位移和对溶剂极性敏感的吸收带，在极性溶剂中表现出稳定而强烈的吸收。稳定性测试表明，NIR II-RTs 在生理环境中的化学稳定性和光稳定性均优于商用七甲川菁类似物 IR1061 和吲哚菁绿。这些特点使 NIR II-RTs 在生物成像应用中具有优异的高亮度和深层组织穿透性。另外，由于引入了羧酸官能团，新型染料 NIR II-RT3/4 可以通过螺旋环化作用产生一个强大的荧光开关机制，因此 NIR II-RT 染料可以设计作为可激活 NIR-II 荧光探针。作为概念的证明，该团队应用 NIR II-RT4 构建了一系列可靶向激活的 NIR-II 荧光探针（NIR II-RT-pH、NIR II-RT-ATP 和 NIR II-RT-Hg），用于生物相关物质的检测。特别是利用 NIR II-RT-ATP 探针，首次实现了高对比度药物性肝损伤小鼠肝脏 ATP 含量的实时监测。

通常，有机荧光染料仅通过结构修饰很难将最大吸收波长和发射波长红移至 1300 nm 以上，而 J-聚集体可以使单个分子的吸收/发射波长红移、吸收系数增强并减小斯托克斯位移。因此，为了获取更长吸收和发射波长的 NIR-II 探针，最近 Zhang 等<sup>[28]</sup>通过自组装 FD-1080 花菁染料和 1, 2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱（DMPC），成功地开发了一种新型的 NIR-II 探针 FD-1080 J-聚集体。FD-1080 J-聚集体在生理条件下表现出较高的亲水性和稳定性，最大吸收和发射波长均超过 1300 nm。进一步利用分子动力学模拟研究了磷脂 DMPC 与 FD-1080 在 J-聚集体形成过程中的相互作用。此外，还对 FD-1080 J-聚集体进行了 1500 nm 以上的光学成像，并成功地用于监测高血压大鼠在给药后颈动脉的动态变化，以评价降压药的疗效。

### 1.3 硼二吡咯烷（BODIPY）类

BODIPY 染料具有高的量子产率、优异的化学和光物理稳定性，在分子成像和药物传递方面发挥着重要作用<sup>[29-30]</sup>。经典的 BODIPY 吸收范围为 500~600 nm，并且具有相当小的 Stokes 位移（15~30 nm）。基于 BODIPY 的强吸电子性质，引入给电子基团可促使吸收和发射红移。例如，O'Shea 的研究小组<sup>[31]</sup>报告在 3, 5-位将己二甲胺基引入苯环，可使其在氯仿溶液中吸收和发射的最大值分别从 650 和 672 nm 显著红移到 799 和 823 nm。近年来，基于 BODIPY 的 NIR-II 型有机荧光材料也得到了迅速的发展。

氮杂 BODIPY（aza-BODIPY）的水溶性较差，限制了它们在活体研究中的应用。为了解决该问题，Sancey 等<sup>[32]</sup>报告了一种新策略，通过在硼原子上引入铵基，制备出了水溶性

aza-BODIPYs, 命名为 SWIR-WAZABY-01。因此, 无需亲水性包封或 PEG 辅助, SWIR-WAZABY-01 可直接用于肿瘤的 NIR-II 成像(图 3)。此外, 这种以 aza-BODIPY 为基础的染料可以在肿瘤中迅速到达和积累, 并在体内保留长达 1 周。

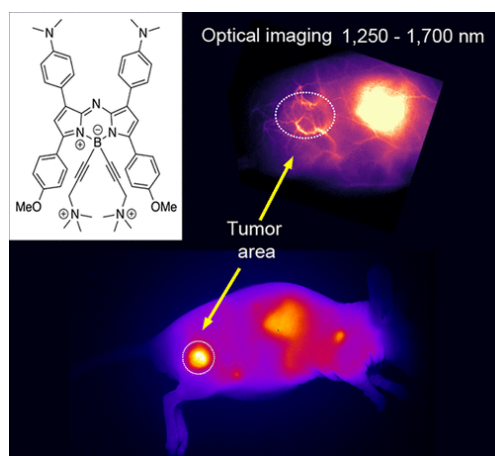


图 3 SWIR-WAZABY-01 的结构示意图及其在肿瘤荧光成像的应用<sup>[32]</sup>

Fig. 3 The structure of SWIR-WAZABY-01 and fluorescence imaging for tumor with SWIR-WAZABY-01<sup>[32]</sup>

最近, Li 等<sup>[33]</sup>利用分子工程开发出一类新的 aza-BODIPY 染料: NJ960、NJ1030 和 NJ1060。与经典的 aza BODIPY 相比, 该类分子在强 D-A 分子内电荷转移 (ICT) 效应的帮助下可将近红外发射红移到 NIR-II。此外, 该类染料具有很好的光物理性能, 如 Stokes 位移大、光稳定性好、水溶液中荧光亮度大等。其中 NJ-1060 在 NIR-II 发射光谱高达 1.0%, 并且体内 NIR-II 荧光成像结果证明 NJ-1060 具有高分辨率和深穿透成像能力。

#### 1.4 基于共轭聚合物的 NIR-II 染料

富电子供体和吸电子受体可使共聚物的带隙变小, 因此通过 D-A 交替共聚生成的共轭聚合物具有带隙小、易调整的优点, 是 NIR-II 探针设计的一种有效的途径。半导体聚合物点 (semiconductor polymer dots, Pdots) 是近年来出现的一种新型有机荧光材料。与传统荧光染料相比, Pdots 具有宽吸收、对称窄发射、高光亮度、高光稳定性及大斯托克斯位移。因此, 高荧光半导体聚合物组成的纳米颗粒被视为一种有效的荧光探针<sup>[34-35]</sup>, 在生物成像、分子检测、指导药物治疗等领域展现出广阔的应用前景。

尽管 Pdots 由于其可调的光学特性, 在生物成像和生物传感方面具有很强的实用价值, 但是与有机溶剂中的原始聚合物相比, 纳米粒子形式的半导体聚合物通常表现出荧光猝灭。猝灭可归因于链间和链内  $\pi$ - $\pi$  堆积的强烈相互作用, 从而导致非发射性激子和激基复合物的



形成<sup>[36, 37]</sup>。随着发射能量的降低，无辐射衰减率显著增加，很难获得高量子产率的 NIR-II 荧光团。最近，Wu 等<sup>[38]</sup>提出了一种双重荧光增强机制来增强 Pdots 的 NIR-II 荧光，通过分子工程策略开发了 9 种 NIR-II 半导体聚合物。在该研究中，一方面利用吩噻嗪单元的聚集诱导发射特性来减少聚集态聚合物的非辐射衰变路径，另一方面引入了大量的侧链基团，通过空间位阻来减弱链间和链内  $\pi$ - $\pi$  堆积产生的强烈相互作用，进一步增强荧光量子产率。基于这种双重增强策略，NIR-II-Pdots 在水溶液中的荧光量子产率约为 1.7%，比四氢呋喃溶液中的原始聚合物增强约 21 倍。小动物成像显示出活体小鼠头盖部荧光成像有显著改善，表明这种双重增强策略在设计活体荧光成像的 NIR-II 荧光团方面具有潜在的应用前景。

另外，针对 Pdots 在水溶液中往往会出现严重的荧光淬灭的问题，Zhou 等<sup>[39]</sup>报道了通过在聚合物受体的不同位置引入氟原子，利用分子调控 NIR-II 荧光增强策略，减少聚合物与水分子的相互作用和非辐射跃迁，从而提高 NIR-II 荧光量子效率（图 4）。在该工作中，作者分别以苯并二噻吩（BDT）和三唑[4,5-g]喹喔啉（TQ）衍生物为供体和受体，设计了两种含氟半导体聚合物。光物理实验结果显示：在 808 nm 光激发下，聚合物发射覆盖了 NIR-II，肩峰延伸超过 1300 nm；随着氟化程度的加深，聚合物发射光谱红移。随后，作者利用密度泛函理论表明氟化使激发态和基态之间的结构畸变变小，从而减少了非辐射弛豫，增强 Pdots 的荧光量子产率。最后，研究人员用 Pdots 进行小鼠颅骨肿瘤血管系统的活体荧光成像，获取了一系列高穿透深度和信背比的荧光图像。

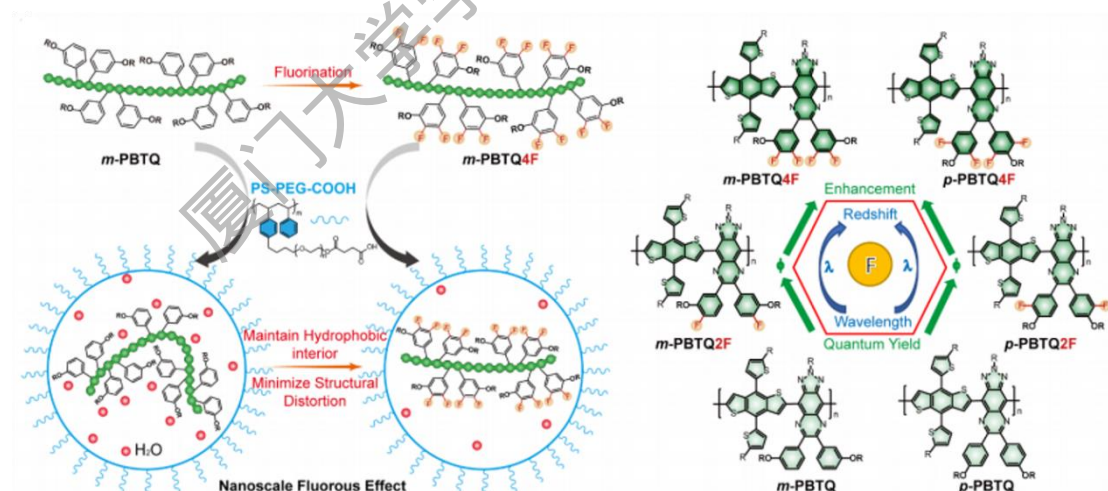


图 4 纳米尺度氟化效应的示意图<sup>[39]</sup>

Fig. 4 Schematic illustration of nanoscale fluorine effect<sup>[39]</sup>

表 1 有机 NIR-II 荧光探针的比较

Table 1 Comparison of organic NIR-II fluorescent probes



类型	NIR-II 荧光材料	激发波长 /nm	发射波长 /nm	量子产率/%	应用
BBTD 类	FM1210-NPs <sup>[18]</sup>	980	1210	0.04	肿瘤及血管系统的活体成像
	BBTD-1302NPs <sup>[19]</sup>	942	1302	2.40	肿瘤光热治疗
	IR-FP8P <sup>[21]</sup>	748	1040	0.60	小鼠后肢血管成像
	SA-TTB-PEG <sub>1000</sub> <sup>[23]</sup>	808	1050	10.30	血管相关疾病的诊断和治疗
	CH-4T-FBS <sup>[40]</sup>	808	1050	0.10	后肢血管系统和淋巴结的成像
	Q4-1 <sup>[41]</sup>	808	1100	0.20	小鼠器官成像
花菁类	IR-783@BSA <sup>[24]</sup>	785	1433	21.20	肿瘤成像
	NIRII-RTs <sup>[25]</sup>	977	1008	2.03	肝脏 ATP 含量的实时监测
	FD-1080 J-聚集体 <sup>[26]</sup>	1360	1370	0.06	监测颈动脉的动态变化, 评价降压药的疗效
	ICG <sup>[42]</sup>	782	880-1450	0.90	血管系统和后肢成像
BODIPY 类	SWIR-WAZABY-01 <sup>[32]</sup>	638	720-1200	2.50	肿瘤成像
	NJ-1060 <sup>[33]</sup>	808	1060	1.00	脑血管成像
	BD-1 <sup>[43]</sup>	1088	1120	0.20	/
共轭聚合物	m-PBTQ4F <sup>[39]</sup>	808	850-1400	3.20	小鼠颅骨肿瘤血管系统成像
	PDFT1032 <sup>[44]</sup>	808	1032	/	血管成像
	pDA-PEG <sup>[45]</sup>	808	1047	1.70	动脉血流的超快近红外成像

## 2 无机 NIR-II 荧光探针

与 NIR-II 有机小分子染料相比, NIR-II 纳米探针具有相对较高的量子产率和较低的光漂白敏感性, 在肝脏、肾脏、大脑和肺成像等领域具有独特的优势。目前, 已开发如量子点 (Quantum dots, QDs)、稀土纳米粒子 (Rare earth nanoparticles, RENPs)、单壁碳纳米管 (Single-walled carbon nanotubes, SWNTs)、金纳米团簇 (Au nanoclusters, AuNCs) 等材料作为近红外二区的探针<sup>[46-48]</sup>。在此, 我们介绍基于无机材料的 NIR-II 荧光探针的开发及其在生物成像领域的应用, 并重点关注近期新型无机 NIR-II 荧光探针的研究进展 (表 2 展示

了不同无机 NIR-II 荧光材料的关键参数和应用)。

## 2.1 稀土纳米材料

RENPs 具有较大的斯托克斯位移、最小的光漂白、狭窄和多峰值的发射特性以及可忽略的激发-发射带重叠, 因此受到越来越多的关注。并且, 由于可通过掺杂不同的稀土金属离子来调谐发射波长和延长的发光寿命<sup>[48-50]</sup>, RENPs 成为了 NIR-II 荧光成像的研究热点, 有着很广泛的应用前景。

由于具有很长的荧光寿命(ms 级别)以及很大的斯托克斯位移( $\geq 200$  nm), 镧系 RENPs 作为荧光探针被广泛使用。最近, Li 等<sup>[51]</sup>以 77.5:20:2.5 的摩尔比混合 1,2-二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、胆固醇(Chol)和聚乙二醇化脂质(DSPE-PEG<sub>2000</sub>)合成脂质体, 然后使用该脂质体进一步包覆 NIR-II 镧系荧光基团 RENPs, 得到了在 1064 和 1345 nm 处双发射, 斯托克斯位移大(分别为 264 和 545 nm)的 RENPs@Lips。RENPs@Lips 在 1064 nm 处的量子产率计算得出为 7.9%, 在 808 nm 激发下, 1345 nm 处的量子产率为 4.1%。此外, RENPs@Lips 显著增强了静脉排泄性和胶体稳定性, 并缩短了网状内皮系统中的停留时间。并且, 超过 90% 的 RENPs@Lips 静脉给药后 72 h 内可以从肝脏排出。与 RENPs@DSPE-mPEG 相比较, RENPs@Lips 的体内清除速度快、半衰期短。同时, 未发现明显的 RENPs@Lips 骨积聚, 这有助于减少骨系统滞留和体内更快的静脉清除。这些发现表明 RENPs@Lips 具有良好的生物相容性、良好的静脉内排泄性和优异的光化学性质, 适合于临床前评估和监测生理和病理过程, 促进其未来的临床转化。

据报道, 稀土元素 Yb/Er 共掺杂纳米颗粒(ErRENPs)在 980 nm 激光下具有 1530 nm 的发光特性, 并表现出斯托克斯位移大(高达 450 nm)、寿命长、光稳定性好等优点, 被认为是新一代近红外探针的有利候选者。但是, Er<sup>3+</sup>离子容易发生能量转移到纳米晶体表面的现象, 导致严重的发光猝灭。最近, Li 等<sup>[52]</sup>采用了 Nd<sup>3+</sup>敏化 Yb<sup>3+</sup>的体系, 在 Ce<sup>3+</sup>内离子的辅助下将能量转移到发光中心 Er<sup>3+</sup>上。在该工作中, 在内核中掺杂 Er<sup>3+</sup>离子作为激活剂, 并在核心层和中间层混合 Yb<sup>3+</sup>离子作为敏化剂。之后, 在 NaYbF<sub>4</sub>:Er 核纳米晶中进一步掺杂 Ce<sup>3+</sup>离子以增强 NIR-II 发射, 并通过调节掺杂离子来优化纳米粒子的发光性能。通过引入聚乙二醇配体, 提高了纳米颗粒的水溶性(图 5), 实现了较长的血液循环时间。最后, 通过采集水溶性纳米探针的 NIR-II 荧光信号, 可以应用于肿瘤的高分辨率追踪和成像。

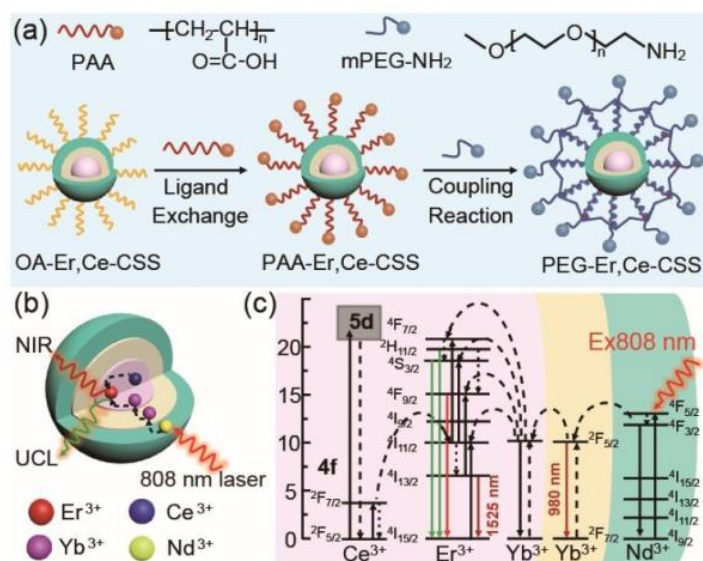


图 5  $\text{NaYbF}_4:\text{Er,Ce}@\text{NaYF}_4:\text{Yb}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$  核壳纳米颗粒的合成过程 (a)、结构示意图 (b) 及其能量传递简化机制 (c) [52]

Fig. 5 Synthesis (a) and the structure illustration (b) of  $\text{NaYbF}_4:\text{Er,Ce}@\text{NaYF}_4:\text{Yb}@\text{NaYF}_4:\text{Nd}$  core-shell-shell nanoparticles, and the simplified mechanism (c) of its energy-transfer<sup>[52]</sup>

## 2.2 量子点

量子点具有宽激发光谱、窄发射光谱、高量子产率、抗光漂白等优点，在活体生物成像中具有很高的时空分辨率，因此引起了人们的广泛关注。并且，通过对如  $\text{PbS}$ 、 $\text{CdSe}$ 、 $\text{Ag}_2\text{S}$  等量子点的尺寸和形状上进行微调，可以调节其药代动力学和组织分布<sup>[53-54]</sup>。

目前主要研究的用于 NIR-II 荧光成像的量子点主要为 II-VI 族和 IV-VI 族半导体材料，如  $\text{CdSe}$ 、 $\text{CdTe}$  和  $\text{PbSe}$  等，但是其中含有的重金属元素（如  $\text{Cd}^{2+}$  和  $\text{Pb}^{2+}$  等）极大地限制了其后续的生物医学应用<sup>[53]</sup>。因此，开发具有良好生物相容性且高效发光的新型 NIR-II 荧光量子点是当前生物标记领域的研究热点和难点。Wang 等<sup>[55]</sup>在 NIR-II 成功地合成了具有强吸光度的石墨烯量子点（graphene quantum dots, GQDs），并讨论了其在肿瘤光热治疗中的潜在生物医学应用。首先，他们以苯酚分子为单前驱体，过氧化氢为氧化剂，在 9 T 外加强磁场作用下，采用一步溶剂热法合成了 9T-GQDs。外加强磁场用于控制反应体系中氧的溶解浓度和苯酚分子分解过程中超氧自由基的生成，从而形成具有大量 C=O 键和较大共轭体系的 GQDs，吸收峰位于约 1070 nm 处。合成的 9T-GQDs 具有丰富的亲水基团、良好的水溶性和较小的粒径分布（3.6 nm）。此外，对 9T-GQDs 的细胞毒性和生物安全性进行了体外和体内实验，证明了其具有良好的生物相容性。最后，在 NIR-II 光照射下通过荧光引导光热

治疗在体外杀伤肿瘤细胞和在体内抑制肿瘤生长。

硫化铅 (PbS) 量子点具有多种独特的特性, 包括窄带隙、大玻尔半径、在近红外区可调谐和强发射特性, 使其应用于光电子器件、传感器和活体成像等多个领域<sup>[53]</sup>。目前胶体制备窄粒径 PbS 量子点的方法已经得到了很好的发展, 但是在较高的温度下, 该方法制备的纳米晶很不稳定。此外, 由于表面易被氧化, 其光学性质对空气和水相当敏感, 因此限制了它们在生物成像中的应用。Zhang 等<sup>[56]</sup>通过阳离子掺杂工艺, 制备一系列高质量的锌掺杂 PbS 量子点。他们发现, 锌掺杂后可以形成掺杂态, 降低了主体 PbS 的能隙, 有效增强了 PbS 量子点的量子产率、光致发光寿命, 并改善了量子点在高温下的荧光稳定性。这种阳离子掺杂策略为制备波长更长的更小粒子提供了一种新的方案, 可批量制备一系列波长覆盖整个 NIR-II 的高质量量子点, 为近红外光学成像提供了新的工具。同时, 聚乙二醇化的量子点可用于活体小鼠的脑血管无创高分辨荧光成像, 实现了在毛细血管水平上高分辨率的脑血管无创近红外成像 (图 6)。

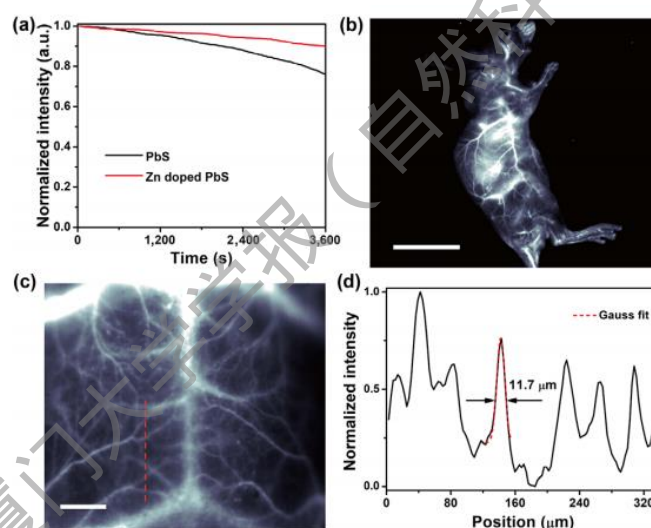


图 6 聚乙二醇化锌掺杂 PbS 量子点在 NIR-II b 窗口的无创活体成像<sup>[57]</sup>

Fig. 6 PEGylated Zn-doped PbS QDs for noninvasive *in vivo* imaging in NIR-II b window<sup>[57]</sup>

### 2.3 惰性金属纳米材料

由于惰性金属基 (如 Au 和 Pt) 发射体不易引起荧光猝灭, 因此很适用于 NIR-II 成像。金纳米团簇 (AuNCs) 是其中一个典型的代表。AuNCs 具有比肾脏排泄阈值更小的尺寸、良好的光稳定性、易于修饰、优异的光热活性和多样性等多种独特的优势, 因此成为极具发展前景的新型 NIR-II 探针<sup>[57-58]</sup>。例如, 考虑到胃肠道的酸性和酶生物环境可能会导致大多数纳米发射体的荧光猝灭, Wang 等<sup>[59]</sup>提出合成惰性金属基发射体用于胃肠道近红外成像,

以克服潜在的荧光淬灭问题。首先，他们通过构建核糖核酸酶-A (RNase-A, 由巯基和芳香族氨基酸组成)封装 AuNCs(图7),得到了具有一个完美的高斯型发射峰的RNase-A@AuNCs, 峰中心位于 1050 nm, 半峰全宽 (FWHM) 约为 205 nm, 与大多数报道的新型金属基成像剂相比, 该发射峰相对狭窄, 且 RNase-A@AuNCs 的量子产率为 1.9%。将 RNase-A@AuNCs 暴露于胃肠道模拟液和哺乳动物细胞中以评估稳定性和生物安全性, 结果表明 RNase-A@AuNCs 具有高稳定性和良好的生物相容性。与两个已报告的近红外发射体 (Ag<sub>2</sub>S 和 NaYF<sub>4</sub>:Er/Yb) 相比, RNase-A@AuNCs 胃肠道灵敏度提高 50 倍以上。这项研究首次将蛋白电晕技术使用在 AuNCs 上, 将激发波长红移到 NIR-II 区域, 并使用一个肠癌模型来证明 AuNCs 作为肿瘤诊断显像剂的潜在效用。

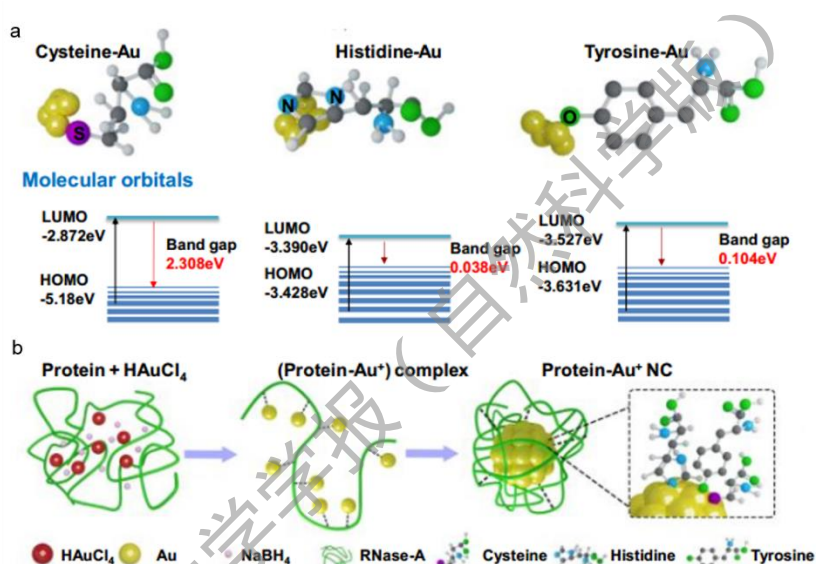


图7 Cys/His/Tyr-Au 复合材料的带隙及 RNase-A@AuNCs 的合成路线<sup>[60]</sup>

Fig. 7 Band gaps of Cys/His/Tyr-Au composites and synthesis route of RNase-A@AuNCs<sup>[60]</sup>

近期, Cheng 等<sup>[60]</sup>合成了粒径约为 3.3 nm 左右的具有 25 个金原子和 18 个肽配体的新型金纳米团簇 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub>, 具有 NIR-II 发射。由于天冬氨酸和四(亚氨基乙酸)等羧酸可以作为天然骨靶向配体, 因此, 研究人员假设 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub> 中丰富的羧酸侧链能使其与骨结合, 从而作为一种新型的骨显像 NIR-II 探针。在该实验中, 研究人员首次发现 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub> 与羟基磷灰石具有良好的体外结合能力。结合 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub>, NIR-II 荧光成像能高分辨率和对比度地描绘出体内骨结构。基于此, 作者探讨了以 Au<sub>25</sub>(SG)<sub>18</sub> 作为骨组织术中 NIR-II 荧光导航的潜在价值。

除了具有 NIR-II 成像能力外, 带裸金原子的 AuNCs 还可通过形成金硫共价键与某些含

巯基的物种如谷胱甘肽 (GSH) 发生反应<sup>[61]</sup>。Yu 等<sup>[62]</sup>开发出一种双功能的热释光纳米药物 (AuNCs-Pt), 利用 AuNCs 来递送 Pt (IV)。一方面, AuNCs-Pt 的 NIR-II 成像能力保证了高分辨率的肿瘤深部模型中铂转运的有效可视化; 另一方面, AuNCs-Pt 通过 Au-S 键来结合 GSH, 以清除胞内 GSH, 从而有效地使肿瘤细胞对铂类药物敏感。结果证明, AuNCs-Pt 能够消除高危害的深部肿瘤, 并减轻人体来源的肝癌异种移植的肿瘤负担。因此, AuNCs-Pt 可作为一种诊疗一体化纳米药物, 最大限度地利用铂依赖性化疗的同时, 通过高分辨率 NIR-II 成像来监测铂在深部组织中的运输。

## 2.4 单壁碳纳米管

单壁碳纳米管 (SWCNT) 直径约为 1 nm, 长度可为几百至几千纳米, 在分散剂的帮助下, 可溶解在水溶液中。SWCNT 的斯托克斯位移较大, 在近红外波段具有良好的光稳定性和荧光发射, 长期作为光学生物传感器。此外, 得益于良好的光热转化效率和光敏特性, SWCNT 已广泛应用于光热和光动力疗法。近年来, 由于其固有的宽 NIR-II 荧光发射, SWCNT 越来越多地用于体内成像。例如, Dai 的团队<sup>[63]</sup>将 SWCNTs 作为第一代 NIR-II 荧光探针应用于活体荧光成像, 并获得了更深层组织穿透力和更高的时间和空间分辨率 (<300 ms, 约 10  $\mu\text{m}$ ) 在 NIR-II。此外, SWCNTs 还应用于高性能血流动力学成像、全身血液循环和淋巴系统跟踪、肿瘤手术指导等领域<sup>[64]</sup>。

由于 NIR-II b (1500~1700 nm) 具有最低的光散射, 因此在 NIR-II b 进行活体生物成像能提供更高的空间分辨率、更深的组织穿透以及更好的信号/背景比。目前, 大多数 NIR-II 的 SWNTs 直径分布为 0.7~1.1 nm, 荧光发射范围为 1000~1400 nm<sup>[65, 66]</sup>。而具有更大直径的 SWNTs 能够在更长波长区域实现高分辨率的荧光成像。最近, Dai 及其团队<sup>[67]</sup>通过激光气化 (LV) 合成了平均直径范围约为 0.96~1.24 nm 的 NIR-IIb 发射体 SWNT。在 LV 合成过程中, 将炉温从 950°C 升高至 1125°C, 使 SWNT 的平均直径从约 0.9 nm 变为 1.4 nm。结果发现, 与先前广泛使用的 HiPCO-SWNT 相比, 由于带隙较小和平均直径较大, LV 纳米管在 1500~1700 nm 区域显示出更高的荧光。利用该 SWNT 作为体内 NIR-II b 荧光造影剂, 发现小鼠后肢和大脑 (颅骨和头皮完整) 的活体血管成像的空间分辨率约为 4 mm, 深度可达 3 mm (图 8)。



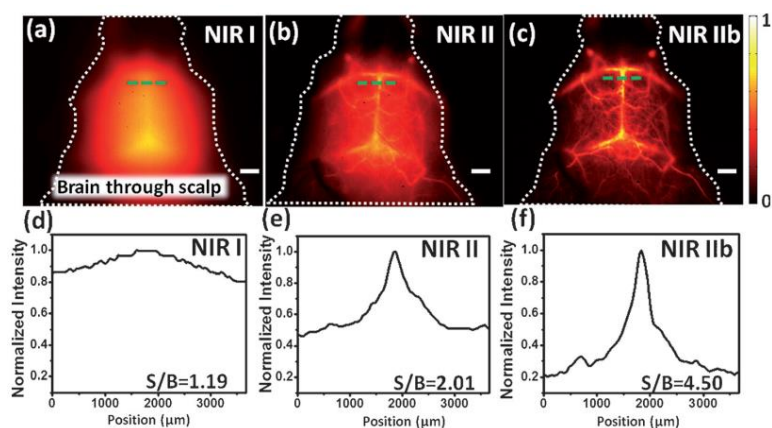


图 8 在 NIR- I (a)、NIR- II (b) 和 NIR- II b (c) 区域的小鼠脑血管荧光图像，以及相应的 SBR 分析 (d-f) [67]

Fig. 8 Fluorescence images of the cerebrovasculature of mice in the NIR- I (a), NIR- II (b), and NIR- II b (c) regions, with the corresponding SBR analysis shown in (d-f)[67]

SWCNT 的体内潜在毒性问题是阻碍临床转化的一大障碍，为了克服该问题，Okazaki 等<sup>[68]</sup>利用磷脂聚乙二醇包裹掺氧的 SWCNT 得到 o-SWCNT-PEG，并研究 o-SWCNT-PEG 给药后的生物反应。首先，他们证明在 980 nm 光激发下 o-SWCNT-PEG 可以发射 1300 nm 的 NIR-II 荧光，适合用于体内 NIR-II 荧光成像。之后，将 o-SWCNT-PEG 经静脉注射到活体小鼠体内，作为血管成像的对比剂，研究了造影探针在体内的滞留时间、生物分布、毒性等生物学特征。结果发现，经尾静脉注射后，o-SWCNT-PEG 在血管内循环时间约为 3 h，大部分在 1 d 内从体内清除。另外，使用 LC-MS 对主要代谢物和脂质代谢进行分析，结果发现实验动物的免疫反应可忽略不计，并且几乎所有生物标志物在给药后 1 个月恢复到正常值。该研究表明，磷脂聚乙二醇包裹的 o-SWCNT 是一种生物相容性良好的探针，有效克服 SWCNT 的毒性问题，可用于 NIR-II 波长范围内的血管造影成像。

表 2 无机 NIR-II 荧光探针的比较

Table1 Comparison of inorganic NIR- II fluorescent probes

类型	NIR-II 荧光材料	激发波长/nm	发射波长/nm	量子产率/%	应用
稀土纳	RENPs@Lips <sup>[47]</sup>	800	1064/1345	7.90/4.10	原位肿瘤血管成像
米材料	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :Yb, Er <sup>[69]</sup>	980	1550	/	器官显像
	NaYF <sub>4</sub> :Yb:Er@NaYF <sub>4</sub> <sup>[70]</sup>	980	1525	/	肿瘤早期发现
	NaYbF <sub>4</sub> :Er,Ce@	808	1530	/	肿瘤的高分辨率追踪和成像
	NaYF <sub>4</sub> :Yb@NaYF <sub>4</sub> :Nd <sup>[48]</sup>				

量子点	9T-GQDs <sup>[51]</sup>	1064	/	16.67	影像导向的癌症治疗
	Zn-doped PbS-PEG <sup>[52]</sup>	1550	1630	50.00	脑血管高分辨荧光成像
	Ag <sub>2</sub> S-6PEG <sup>[71]</sup>	808	1200	15.50	肿瘤显像
	Ag <sub>2</sub> S-PEG <sup>[72]</sup>	808	1200	16.00	淋巴引流成像, 血液成像
	Ag <sub>2</sub> S@SiO <sub>2</sub> <sup>[73]</sup>	785	1135	22.70	肿瘤成像
惰性金属纳米材料	RNase-A@AuNCs <sup>[55]</sup>	808	1050	1.90	肠癌显像
	Au <sub>25</sub> (SG) <sub>18</sub> <sup>[56]</sup>	808	1050	0.27	骨组织术中荧光导航
	AuNCs-Pt <sup>[58]</sup>	808	945/1035	0.04	诊疗一体化, 消除高危害的深部肿瘤
单壁碳纳米管	Chiral SWCNTs <sup>[65]</sup>	725	850-1350	/	血管成像
	SWCNTs-mPEG <sup>[66]</sup>	808	1100-1400	0.10	肿瘤成像
	LV SWCNTs <sup>[67]</sup>	808	1200-1800	0.01	高倍率脑血管成像
	SWCNTs-DSPE-mPEG <sup>[74]</sup>	808	1100-1700	0.10	视频速率活体成像
	SWCNTs-cholesterol <sup>[75]</sup>	808	900-1500	0.40	活体肿瘤血管成像

## 4 结论与展望

有机 NIR-II 材料通过调节分子结构可以有效地优化光谱学性质, 并且易降解、生物毒性小, 在体内成像应用具有很大的潜力。花菁类 NIR-II 荧光团合成过程相对简单, 通过延长聚次甲基链、增加杂环的供体强度, 可使发射波长红移。D-A-D 型生色团具有较大的斯托克斯位移 (约 200 nm) 和较高的成像质量, 在 1000 nm 以上具有优异的光致发光和电致发光性能。并且, 通过调节 D-A-D 荧光团的受体和供体结构可以有效地改变吸收和发射光谱特征。值得注意的是, 上述两类小分子染料具有生物相容性好、循环时间短、体内代谢快等优点, 避免了长期毒性问题。但存在量子产率较低、水溶性和生物体内稳定性较差等不足。因此, 往往需要通过改造来提高水溶性, 例如将小分子染料包裹在聚合物基质中, 但这大大增加了它们的大小, 超过了 40 kDa 的肾脏清除阈值。因此, 需通过合理的策略消除上述障碍。共轭聚合物具有高度离域的  $\pi$ -共轭主链和可配置的侧链, 这赋予了它们可调节的光物理性质和多功能性。此外, 共轭聚合物通常具有吸收系数大、荧光量子产率高、光稳定性好等优点, 但尚存在如分子量和分子结构不确定性等问题。总体而言, 有机 NIR-II 荧光团具有优良的光学性能、良好的生物相容性、低毒性等特点, 并且其理化性质可通过结构修饰来调节, 因此在未来临床中具有很大的应用前景。

近年来国内外科学家开发出一系列性能优异的无机 NIR-II 荧光纳米探针。与小分子荧

光体相比,无机纳米荧光体如量子点和金纳米簇显示出较高的量子产率和较低的光漂白敏感性,常被用于肝脏、肾脏、大脑和肺成像。然而,这些材料容易在肝/脾部位滞留和积累,不易被机体排泄。SWCNTs 在 NIR-II 具有强荧光性,能实现深层组织穿透和高空间分辨率荧光成像。但是,SWCNTs 的溶解度和生物相容性较差,这导致在表面改性之前无法直接用于生物成像。RENPs 由于其大斯托克斯位移、窄和多峰发射光谱、可忽略的激发-发射带重叠以及优异的光稳定性而受到越来越多的关注。但是,与大多数报道的 NIR-II 无机纳米材料一样,在网状内皮系统中滞留时间长和无法从活体清除增加了潜在的安全隐患,是未来生物学应用和转化中不可忽视的障碍。

与传统的 NIR-I 成像技术和其他医学成像方法相比,NIR-II 生物成像技术不仅成像深度更深,而且可以更好地避免组织自发荧光和光子散射等背景干扰。目前,已经成功合成和制备了有机小分子材料、共轭聚合物、无机纳米材料(稀土纳米材料、半导体量子点、单壁碳纳米管)等多种近红外二区材料。NIR-II 材料由于其独特的优异性,不仅可以作为生物医学造影剂,而且可用于光热和光动力治疗、药物递送、手术指导和移植干细胞的跟踪等领域。

本文概述了新型 NIR-II 荧光材料的设计思路及其多样化的生物应用。虽然 NIR-II 荧光材料的发展丰富了我们对 NIR-II 生物成像领域的认识和应用,但目前的工作主要集中在基础研究上,在临床上的应用还有很长的路要走。总体来说,NIR-II 荧光材料的开发设计要考虑以下几点:首先最值得关注的问题是,生物相容性差及潜在的生物毒性可能会对人体生理功能产生变化,损害人体健康;其次,NIR-II 荧光材料的低荧光量子产率、短发射波长、化学合成过程繁琐耗时等缺点会阻碍 NIR-II 荧光材料的产业化发展;最后,除了通过合理的策略消除上述障碍外,NIR-II 材料在动物模型中的活性、毒理学和药代动力学评价测试,对于 NIR-II 荧光成像的进一步发展至关重要。

## 参考文献:

- [1] 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.
- [2] BHAVANE R, STAROSOLSKI Z, STUPIN I, et al. NIR-II fluorescence imaging using indocyanine green nanoparticles[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8.
- [3] CROCE A C, BOTTIROLI G. Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis[J]. *European Journal of Histochemistry*, 2014, 58(4): 320-337.
- [4] CHEN G, ZHANG Y, LI C, et al. Recent Advances in Tracking the Transplanted Stem Cells Using

- Near-Infrared Fluorescent Nanoprobes: Turning from the First to the Second Near-Infrared Window[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2018, 7(20).
- [5] CHO S S, SALINAS R, DE RAVIN E, et al. Near-Infrared Imaging with Second-Window Indocyanine Green in Newly Diagnosed High-Grade Gliomas Predicts Gadolinium Enhancement on Postoperative Magnetic Resonance Imaging[J]. *Molecular Imaging and Biology*, 2020, 22(5): 1427-1437.
- [6] 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).
- [7] CHEN G, TIAN F, LI C, et al. In vivo real-time visualization of mesenchymal stem cells tropism for cutaneous regeneration using NIR-II fluorescence imaging[J]. *Biomaterials*, 2015, 53(265-273).
- [8] LANGEVIN M A, PONS T, RITCEY A M, et al. Near-infrared emitting AgInTe<sub>2</sub> and Zn-Ag-In-Te colloidal nanocrystals[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2015, 10.
- [9] LI B H, LU L F, ZHAO M Y, et al. An Efficient 1064 nm NIR-II Excitation Fluorescent Molecular Dye for Deep-Tissue High-Resolution Dynamic Bioimaging[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2018, 57(25): 7483-7487.
- [10] 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.
- [11] LI X L, JIANG M Y, LI Y B, et al. 808 nm laser-triggered NIR-II emissive rare-earth nanoprobes for small tumor detection and blood vessel imaging[J]. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2019, 100(260-268).
- [12] HEMMER E, BENAYAS A, LEGARE F, et al. Exploiting the biological windows: current perspectives on fluorescent bioprobes emitting above 1000 nm[J]. *Nanoscale Horizons*, 2016, 1(3): 168-184.
- [13] DING F, ZHAN Y B, LU X J, et al. Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging[J]. *Chemical Science*, 2018, 9(19): 4370-4380.
- [14] WAN H, DU H T, WANG F F, et al. Molecular Imaging in the Second Near-Infrared Window[J]. *Advanced Functional Materials*, 2019, 29(25).
- [15] HONG G, ANTARIS A L, DAI H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging[J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, 1(1).
- [16] SUN Y, DING M, ZENG X, 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.
- [17] ZHANG R, WANG Z, XU L, et al. Rational Design of a Multifunctional Molecular Dye with Single Dose and Laser for Efficiency NIR-II Fluorescence/Photoacoustic Imaging Guided Photothermal Therapy[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(19): 12476-12483.
- [18] FANG Y, SHANG J, LIU D, 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.
- [19] YE F, HUANG W, LI C, et al. Near-Infrared Fluorescence/Photoacoustic Agent with an Intensifying Optical Performance for Imaging-Guided Effective Photothermal Therapy[J]. *Advanced Therapeutics*, 2020, 170: 1-10.
- [20] YANG Q, HU Z, ZHU S, 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.
- [21] MA H, LIU C, HU Z, et al. Propylenedioxy Thiophene Donor to Achieve NIR-II Molecular Fluorophores with Enhanced Brightness[J]. *Chemistry of Materials*, 2020, 32(5): 2061-2069.
- [22] 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.
- [23] LIU S J, OU H L, LI Y Y, et al. Planar and Twisted Molecular Structure Leads to the High Brightness of Semiconducting Polymer Nanoparticles for NIR-IIa Fluorescence Imaging[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2020, 142(35): 15146-15156.
- [24] 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).
- [25] DING F, FAN Y, SUN Y, et al. Beyond 1000 nm Emission Wavelength: Recent Advances in Organic and Inorganic Emitters for Deep-Tissue Molecular Imaging[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(14).
- [26] TIAN R, ZENG Q, ZHU S J, et al. Albumin-chaperoned cyanine dye yields superbright NIR-II fluorophore with enhanced pharmacokinetics[J]. *Science Advances*, 2019, 5(9).
- [27] 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 ed in English)*, 2020.
- [28] SUN C X, LI B H, ZHAO M Y, et al. J-Aggregates of Cyanine Dye for NIR-II in Vivo Dynamic Vascular Imaging beyond 1500 nm[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(49): 19221-19225.
- [29] KIM T, PARK S, CHOI Y, et al. A BODIPY-Based Probe for the Selective Detection of Hypochlorous Acid in Living Cells[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2011, 6(6): 1358-61.
- [30] REN C, DENG X, HU W, et al. A near-infrared I emissive dye: toward the application of saturable absorber and multiphoton fluorescence microscopy in the deep-tissue imaging window[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(35): 5111-4.
- [31] MCDONNELL S, O'SHEA D. Near-Infrared Sensing Properties of Dimethylamino-Substituted BF<sub>2</sub>-Azadipyromethenes[J]. *Organic Letters*, 2006, 8(16): 3493-3496.
- [32] GODARD A, KALOT G, PLIQUETT J, et al. Water-Soluble Aza-BODIPYs: Biocompatible Organic Dyes for High Contrast In Vivo NIR-II Imaging[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2020, 31(4): 1088-92.
- [33] BAI L, SUN P, LIU Y, et al. Novel aza-BODIPY based small molecular NIR-II fluorophores for in vivo imaging[J]. *Chemical Communications*, 2019, 55(73): 10920-3.
- [34] WU C, CHIU D T. Highly Fluorescent Semiconducting Polymer Dots for Biology and Medicine[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2013, 52(11): 3086-3109.
- [35] JIANG Y, MCNEILL J. Light-Harvesting and Amplified Energy Transfer in Conjugated Polymer Nanoparticles[J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117(2): 838-859.
- [36] LI J, RAO J, PU K. Recent progress on semiconducting polymer nanoparticles for molecular imaging and cancer phototherapy[J]. *Biomaterials*, 2018, 155(217-235).
- [37] SUO Y, WU F, XU P, et al. NIR-II Fluorescence Endoscopy for Targeted Imaging of Colorectal Cancer[J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2019, 8(23).

- [38] ZHANG Z, FANG X, LIU Z, et al. Semiconducting Polymer Dots with Dual-Enhanced NIR-II Fluorescence for Through-Skull Mouse-Brain Imaging[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020, 59(9): 3691-3698.
- [39] LIU Y, LIU J, CHEN D, et al. Fluorination Enhances NIR-II Fluorescence of Polymer Dots for Quantitative Brain Tumor Imaging[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020.
- [40] ANTARIS L, CHEN H, DIAO S, et al. A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 15269.
- [41] SUN Y, QU C, CHEN H, et al. Novel benzo-bis(1,2,5-thiadiazole) fluorophores for in vivo NIR-II imaging of cancer[J]. *Chemical Science*, 2017, 7: 6203-6207.
- [42] STAROSOLSKI Z, BHAVANE R, GHAGHADA K, et al. Indocyanine green fluorescence in second near-infrared (NIR-II) window[J]. *PLoS One*, 2017, 12: e0187563.
- [43] NI Y, LEE S, SON M, et al. A Diradical Approach towards BODIPY-Based Dyes with Intense Near-Infrared Absorption around  $\lambda=1100$  nm[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2016, 55(8): 2815-9.
- [44] SHOU K, QU C, SUN Y, et al. Multifunctional biomedical imaging in physiological and pathological conditions using a NIR-II Probe[J]. *Advanced Functional Material*, 2017, 27: 1700995.
- [45] HONG G, ZOU Y, ANTARIS A, et al. Ultrafast fluorescence imaging in vivo with conjugated polymer fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4206.
- [46] TAKEUCHI T, IIZUMI Y, YUDASAKA M, et al. Characterization and Biodistribution Analysis of Oxygen-Doped Single-Walled Carbon Nanotubes Used as in Vivo Fluorescence Imaging Probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30(5): 1323-1330.
- [47] MA Z, ZHANG M, YUE J, et al. Near-Infrared IIb Fluorescence Imaging of Vascular Regeneration with Dynamic Tissue Perfusion Measurement and High Spatial Resolution[J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, 28(36).
- [48] NACZYNSKI D J, TAN M C, RIMAN R E, et al. Rare earth nanoprobe for functional biomolecular imaging and theranostics[J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2014, 2(20): 2958-2973.
- [49] WAN H, YUE J, ZHU S, et al. A bright organic NIR-II nanofluorophore for three-dimensional imaging into biological tissues[J]. *Nature Communications*, 2018, 9.
- [50] LI X, WANG R, ZHANG F, et al. Nd<sup>3+</sup> Sensitized Up/Down Converting Dual-Mode Nanomaterials for Efficient In-vitro and In-vivo Bioimaging Excited at 800 nm[J]. *Scientific Reports*, 2013, 3.
- [51] LI D, HE S, WU Y, et al. Excretable Lanthanide Nanoparticle for Biomedical Imaging and Surgical Navigation in the Second Near-Infrared Window[J]. *Advanced Science*, 2019, 6(23).
- [52] CAO C, WU N, YUAN W, et al. Ln(3+)-doped nanoparticles with enhanced NIR-II luminescence for lighting up blood vessels in mice[J]. *Nanoscale*, 2020, 12(15): 8248-8254.
- [53] BAKUEVA L, GORELIKOV I, MUSIKHIN S, et al. PbS quantum dots with stable efficient luminescence in the near-IR spectral range[J]. *Advanced Materials*, 2004, 16(11): 926-929.
- [54] YANG H-Y, ZHAO Y-W, ZHANG Z-Y, et al. One-pot synthesis of water-dispersible Ag<sub>2</sub>S quantum dots with bright fluorescent emission in the second near-infrared window[J]. *Nanotechnology*, 2013, 24(5).
- [55] LIU H, LI C, QIAN Y, et al. Magnetic-induced graphene quantum dots for imaging-guided photothermal



- therapy in the second near-infrared window[J]. *Biomaterials*, 2020, 232.
- [56] SHI X, CHEN S, LUO M-Y, et al. Zn-doping enhances the photoluminescence and stability of PbS quantum dots for in vivo high-resolution imaging in the NIR-II window[J]. *Nano Research*, 2020, 13(8): 2239-2245.
- [57] YAO Q, YUAN X, FUNG V, et al. Understanding seed-mediated growth of gold nanoclusters at molecular level[J]. *Nature Communications*, 2017, 8.
- [58] WU Z, YAO Q, CHAI O J H, et al. Unraveling the Impact of Gold(I)-Thiolate Motifs on the Aggregation-Induced Emission of Gold Nanoclusters[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020, 59(25): 9934-9939.
- [59] WANG W, KONG Y, JIANG J, et al. Engineering the Protein Corona Structure on Gold Nanoclusters Enables Red-Shifted Emissions in the Second Near-infrared Window for Gastrointestinal Imaging[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2020.
- [60] LI D L, LIU Q, QI Q R, et al. Gold Nanoclusters for NIR-II Fluorescence Imaging of Bones[J]. *Small*, 2020, 16(43).
- [61] LIU H, HONG G, LUO Z, et al. Atomic-Precision Gold Clusters for NIR-II Imaging[J]. *Advanced Materials*, 2019, 31(46).
- [62] YANG Y, YU Y, CHEN H, et al. Illuminating Platinum Transportation While Maximizing Therapeutic Efficacy by Gold Nanoclusters via Simultaneous Near-Infrared-I/II Imaging and Glutathione-Scavenging[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(10): 13536-13547.
- [63] WELSHER K, LIU Z, SHERLOCK S P, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice[J]. *Nature Nanotechnol*, 2009, 4: 773-780.
- [64] GHOSH D, BAGLEY A F, NA Y J, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111: 13948-13953.
- [65] YOMOGIDA Y, TANAKA T, ZHANG M, et al. Industrial-scale separation of high-purity single-chirality single-wall carbon nanotubes for biological imaging[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12056.
- [66] ROBINSON J, HONG G, LIANG Y, et al. In Vivo Fluorescence Imaging in the Second Near-Infrared Window with Long Circulating Carbon Nanotubes Capable of Ultrahigh Tumor Uptake[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2012, 134: 10664-10669.
- [67] DIAO S, BLACKBURN J, HONG G, et al. Fluorescence Imaging In Vivo at Wavelengths beyond 1500 nm[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2015, 54: 14758-14762.
- [68] TAKEUCHI T, IIZUMI Y, YUDASAKA M, et al. Characterization and biodistribution analysis of oxygen-doped single-walled carbon nanotubes used as in vivo fluorescence imaging probes[J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2019, 30: 1323-1330.
- [69] KAMIMURA M, KANAYAMA N, TOKUZEN K, et al. Near-infrared (1550 nm) in vivo bioimaging based on rare-earth doped ceramic nanophosphors modified with PEG-b-poly(4-vinylbenzylphosphonate)[J]. *Nanoscale*, 2011, 3: 3705-3713.
- [70] ZEVON M, GANAPATHY V, KANTAMNENI H, et al. CXCR-4 Targeted, Short Wave Infrared (SWIR) Emitting Nanoprobes for Enhanced Deep Tissue Imaging and Micrometastatic Cancer Lesion

- Detection[J]. *Small*, 2015, 11: 6347–6357.
- [71] HONG G, ROBINSON J, ZHANG Y, et al. In Vivo Fluorescence Imaging with Ag<sub>2</sub>S Quantum Dots in the Second Near-Infrared Region[J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2012, 124: 9956-9959.
- [72] LI C, ZHANG Y, WANG M, et al. In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag<sub>2</sub>S quantum dots in the NIR-II window[J]. *Biomaterials*, 2014: 35, 393-400.
- [73] TANG R, XUE J, XU B, et al. Tunable ultrasmall visible-to-extended near-infrared emitting silver sulfide quantum dots for integrin-targeted cancer imaging[J]. *ACS Nano*, 2015, 9: 220-230.
- [74] WELSHER K, SHERLOCK S, DAI H, et al. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108: 8943-8948.
- [75] WELSHER K, LIU Z, SHERLOCK S, et al. A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice[J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, 4: 773-780.

## Research progress in design and application of the second near-infrared window fluorescence probes

HUANG Yanfang, LI Zijing\*

(Center for Molecular Imaging and Translational Medicine, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

**Abstract:** Fluorescence imaging with high spatial-temporal resolution and high sensitivity provides a powerful tool for visualizing dynamic biological processes. Compared with the first near-infrared window (NIR- I ), the second near-infrared window (NIR- II ) imaging shows lower spontaneous background fluorescence, deeper tissue penetrability and higher signal to background ratio. Therefore, NIR- II fluorescence imaging could promote accurate diagnosis for deep diseases. NIR- II fluorescent probe is the basis of NIR- II fluorescence imaging. At present, a series of NIR- II fluorescent probes based on organic and inorganic materials have been developed, including organic small molecule dyes, organic nanoparticles based on small molecule dyes, conjugated polymers, quantum dots, rare earth doped nanoparticles and single-walled carbon nanotubes. This paper reviews the recent research progress of NIR- II fluorescent probe and its application in biomedical field.

**Keywords:** fluorescence imaging; second near-infrared window; fluorescence probes; organic small molecule dyes