

近红外二区荧光宽场显微活体成像技术和应用

阙步军¹, 彭士屹¹, 耿伟航¹, 崔健², 胡森虎², 冯哲¹, 钱骏^{1*}

(1. 浙江大学先进光子学国际研究中心 光及电磁波研究中心 光电科学与工程学院现代光学仪器国家重点实验室, 浙江杭州 310058;
2. 宁波舜宇仪器有限公司, 浙江余姚 315400)

摘要: 近红外二区(900~1880 nm, the Second Near-Infrared Region, NIR-II)荧光宽场显微成像技术是当前大深度活体成像的一大研究热点,在基础研究和临床应用方面都拥有巨大的潜力。对比可见光(360~760 nm)和近红外一区(760~900 nm, the First Near-Infrared Region, NIR-I)的成像,NIR-II荧光宽场显微成像技术在活体层面具有更高的清晰度和更深的组织穿透。在NIR-II宏观成像基础上,对组织微结构清晰成像的需求迫使成像试剂持续发展,成像系统不断精进。目前,NIR-II荧光宽场显微成像技术在脉管显微造影、肿瘤精确分析、炎症准确追踪等生物应用上都获得一系列突破,相关研究对象包含啮齿类动物(如小鼠,大鼠)及灵长类动物(如狨猴,猕猴)等。将来随着仪器商业化和国产化突破,成像试剂安全性逐步提高,NIR-II荧光宽场显微成像应用价值将不断攀升。本文从NIR-II荧光成像的机制及优势展开讨论,综述NIR-II荧光宽场显微成像的系统特点和演进历史,以及其在不同生物模型上活体成像方面的最新探索和前景展望,以期推动NIR-II荧光宽场显微成像技术进一步普及。

关键词: 荧光成像; 近红外二区; 宽场显微成像; 大深度活体成像

中图分类号: O43

文献标识码: A

The fluorescence in vivo wide-field microscopic imaging technology and application in the second near-infrared region

QUE Bu-Jun¹, PENG Shi-Yi¹, GENG Wei-Hang¹, CUI Jian², HU Sen-Hu², FENG Zhe¹, QIAN Jun^{1*}

(1. State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentations, Centre for Optical and Electromagnetic Research, College of Optical Science and Engineering, International Research Center for Advanced Photonics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Ningbo Sunny Instruments Co., LTD., Yuyao 315400, China)

Abstract: The wide-field fluorescence microscopic imaging in the second near-infrared region (NIR-II, 900-1880 nm) is currently a hot spot for deep in vivo bioimaging, with great potential in both basic research and clinical applications. Compared to the visible (Vis, 360-760 nm) and the first near-infrared (NIR-I, 760-900 nm) region, NIR-II fluorescence in vivo wide-field microscopic imaging provides higher spatial resolution and deeper tissue penetration. On the basis of NIR-II macroscopic imaging, the demand for deciphering of tissue microstructure forces the continuous development of fluorescent agents and the imaging system. NIR-II wide-field microscopic imaging technology has achieved a series of breakthroughs in biological applications such as accurate vascular microscopy, tumor analysis and accurate inflammation tracking. The research objects include rodents (such as mice and rats) and non-human primates (such as marmosets and macaques). With the breakthrough of instrument commercialization and localization as well as the increasing biocompatibility of fluorescent probes in the future, the application values of NIR-II fluorescence wide-field microscopic imaging will continue to upsurge. This article discusses the mechanism and advantages of NIR-II imaging first, and then, reviews the characteristics and history of NIR-II fluorescence wide-field microscopic imaging, as well as its latest exploration and prospects for in vivo imaging on different biological models. The purpose is to promote the fur-

收稿日期: 2021-11-08, 修回日期: 2021-12-08

Received date: 2021-11-08, Revised date: 2021-12-08

基金项目: 国家自然科学基金(61975172, 82001874, 61735016); 中央高校基本科研基金(2020-KYY-511108-0007);

Foundation items: supported by the National Natural Science Foundation of China (61975172, 82001874, 61735016), Fundamental Research Funds for the Central Universities (2020-KYY-511108-0007).

作者简介(Biography): 阙步军(1982-), 男, 福建上杭人, 高级工程师, 工程博士在读, 主要研究领域为NIR-II荧光宽场显微成像技术、人工智能端边硬件, E-mail: 11830064@zju.edu.cn

*通讯作者(Corresponding author): E-mail: qianjun@zju.edu.cn

ther popularization of NIR-II fluorescence in vivo wide-field microscopic imaging.

Key words: fluorescence imaging, the second near-infrared region (NIR-II), wide-field microscopic imaging, large depth in vivo imaging

引言

荧光成像具备高灵敏度、非侵入性和无辐射的优点,已广泛应用于生命科学研究。荧光成像利用内生荧光(也称自发荧光)或者外加标记探针受激发出的荧光(诱发荧光)来获得图像,主要包括信号激发、信号收集和信号探测三个关键组件。当细胞或组织中加入荧光探针标记物后,特定波长的光源经由激发光路,照射标记物发出荧光。此时,自发荧光往往成为图像背景。接着,激发的荧光信号,通过发射光路的收集、分光、过滤和聚焦,进入光电探测器完成光电转换、信号放大、分析处理,最终完成图像展示。

传统的生物成像窗口为可见光和 NIR-I (the First Near-Infrared Region, NIR-I), 其中, 360~760 nm 属于可见光区域, 760~900 nm 为 NIR-I 波段。但在可见光和 NIR-I 波段的成像存在如下限制: 首先, 由于光在生物组织中传播时受到的吸收和散射作用影响, 成像深度和图像信背比 (Signal-to-Background Ratio, SBR) 不理想, 成像的对象常局限于细胞及厚度较薄的组织样品中; 其次, 生物组织存在自发荧光, 往往成为图像背景干扰, 也会导致图像信背比降低, 目标信号的清晰度下降; 第三, 可见光和 NIR-I 荧光的激发光波长更短, 光子能量更高, 激发光的安全阈值常常较低, 而过强的激发光所引起的生物组织吸收会导致组织受损。与可见光和 NIR-I 荧光成像相比, 近红外二区 (the Second Near-Infrared Region, NIR-II) 荧光成像因其波长较长, 在深层活体成像清晰度和激光功率安全方面优势明显。

近年来, NIR-II 荧光宽场显微术在高时间分辨率、高空间分辨率、高信背比和大深度组织穿透方面获得突破性发展, 这些得益于荧光探针和成像仪器设备的开发和改进。本文介绍 NIR-II 荧光宽场显微活体成像的机制特点、演进历史和系统进展, 以及希望通过介绍其在不同生物模型上的最新应用, 展现其临床试验的巨大潜力, 使 NIR-II 荧光宽场显微成像术在基础研究和临床应用上得到更进一步的普及。

1 NIR-II 荧光活体生物成像

传统的硅基传感器对长波长近红外区域的光子透明, 因为超过 1 100 nm 的光子能量低于传统 Si

基半导体材料的带隙能量。NIR-II 探测普遍使用的为 900~1 700 nm 范围内具有高量子效率的砷化镓 (InGaAs) 传感器, 这种传感器原来在工业检测、军事装备、安全防范等领域被广泛使用, 也被称为短波红外传感器 (Short Wave Infrared Radiation, SWIR)。

伴随着探测器性能的提升和荧光新探针的开发, NIR-II 的活体荧光成像迅速成为热点^[1-15]。斯坦福大学 Hongjie Dai 院士团队^[4]于 2009 年首次实现了 NIR-II 活体荧光成像, 展示了整只小鼠体内通过检测低剂量“交换”单壁碳纳米管 (Single-Walled Carbon Nanotubes, SWNT) (图 1(a)) 的固有近红外光致发光, 使用 InGaAs 相机在 1 000~1 700 nm 波长范围内成像, 清晰观察到皮下脉管系统中单壁碳纳米管的循环图像 (图 1(c)), 并且探测到小鼠内部深层器官肝脏和脾脏表现出更高的强度, 主要归因于纳米结构材料倾向于在网状内皮系统器官中积累。此外, 麻省理工学院的 Bawendi 院士团队^[16]报道了一类高质量的短波红外发射砷化镓量子点, 能对清醒小鼠进行全身成像, 并无接触测定休息状态的小鼠的每分钟心跳为 550 次、呼吸频率为 300 次。斯坦福的程震教授团队近年来也开展了 NIR-II 分子影像相关的研究工作, 开发了新的分子成像探针, 用于早期癌症检测、代谢和治疗^[17-23]。美国国立卫生研究院 (现新加坡国立大学) 陈小元教授团队利用 NIR-II 荧光成像的精准检测, 开发 NIR-II 探针和多重 NIR-II 活体成像精准诊疗系统^[24-28]。复旦大学张凡教授团队致力于掺铒 (Er³⁺) 稀土近红外探针开发^[29-32], 实现高信背比的 NIR-II 诊断、导航手术和寿命成像^[33]。苏州纳米所的王强斌教授团队围绕着含银低毒量子点开展 NIR-II 荧光活体影像技术^[6, 34-38], 实现了对活体组织原位、实时、高灵敏度和高信噪比的影像研究^[38]。武汉大学洪学传教授团队开展了小分子药物相关的 NIR-II 血管及肿瘤生物成像在重大疾病的早期诊断与药物研发^[2, 39-42], 南京邮电大学范曲立教授团队开发了一系列具有 NIR-II 发射性能的半导体聚合物^[43-46], 以及使用多模态成像型 NIR-II 近红外有机荧光探针开展病灶的光热治疗等应用^[47, 48]。NIR-II 活体成像技术的快速发展也给临床精准诊疗提供了良好契机。2019 年, 程震团队报导了 NIR-II 荧光内窥镜在结直肠癌

靶向成像中的应用^[19]。接着,2020年,田捷教授、程震教授和 Sanjiv Sam Gambhir 医生等,首次在可见光、NIR-I 和 NIR-II 的多窗口荧光成像引导下,进行人类肝癌手术^[49],开启了 NIR-II 临床应用的新纪元。

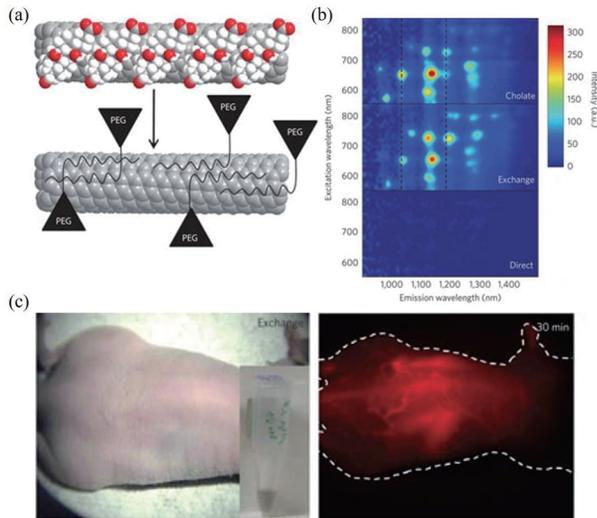


图1 首例 NIR-II 活体荧光成像, (a) 形成生物相容性纳米管交换过程示意图, 单壁碳纳米管(SWNTs) (灰色) 上的胆酸盐 (红色和白色球) 被透析并最终被磷脂-聚乙二醇(PL-PEG) 取代, (b) 光致发光对比激发光谱和交换后的峰红移, (c) 小鼠活体(左) 明场及(右) 近红外光致发光成像^[4]

Fig. 1 The first NIR-II in vivo fluorescence imaging, (a) schematic of the exchange process to form biocompatible nanotubes., cholate (red and white balls) on SWNTs (grey) is dialyzed and eventually replaced by phospholipid - polyethylene glycol (PL - PEG), (b) photoluminescence versus excitation spectra and how peaks are redshifted after exchange, (c) the picture (left) and the in vivo NIR-II photoluminescence (right) imaging of mice^[4]

尽管 NIR-II 荧光成像应用日趋广泛,但其成像窗口的定义却并不统一。长期以来,NIR-II 在学术界被定义为 1 000~1 700 nm。然而,工业领域认可的典型短波红外波段为 900~1 700 nm,因为基于 In-GaAs 的探测器可以实现从 900 nm 到 1 700 nm 的成像^[50],这两个相似区域的界限一直很模糊。特别是,大多数研究小组没有将 900~1 000 nm 纳入 NIR-II 区域。众所周知,穿透过高散射组织的光,可以分为三类:非散射的弹道光,弱散射的蛇形光和高散射的散射光。其中弹道光 and 蛇形光携带了组织内部信息,属于有用信号;而散射光子则属于背景信号,会降低图像信背比,不利于清晰成像。普遍认

为,光在生物介质中传播时的吸收衰减和散射干扰会导致能量损失。吸收损耗决定系统能否捕捉到信号,而散射信号会降低图像的清晰度^[51]。因此按照传统观点,理想的生物成像窗口需要具备最小光子吸收和最少散射两个基本特点。浙江大学钱骏教授团队^[51]模拟了 NIR 区域(至 2 340 nm)中的光子传播(图 2(b-g)),确认了活体成像中适度利用水对散射光子的吸收能提高信背比(图 2(h)),并将 NIR-II 窗口扩展为 900~1 880 nm,定义了 2 080~2 340 nm 为近红外三区。其中,1 400~1 500 nm 和 1 700~1 880 nm 分别被定义为 NIR-IIx 和 NIR-IIc 区域(图 2(a))。

2 NIR-II 荧光宽场显微成像系统

活体成像研究中,NIR-II 的宏观成像不仅可以实现主动脉和微小血管循环检测,也可以实现各类器官的成像,如心、肝、脾、肺、肾、肝、肠、胆道等。但是,组织的微结构观察和检测需要更大倍率的成像系统,以提高生物组织的空间分辨率和对比度,实现生物微结构的清晰成像。

Hongjie Dai 院士团队使用 808 nm 落射荧光激发^[52],搭建两个消色差透镜组成的放大聚焦光学系统(图 3(a)),通过穿透完整的皮肤和颅骨,在该窗口中实现了非侵入性的 1 300~1 400 nm 波段的鼠脑荧光成像,在大于 2 mm 的深度解析了小鼠脑血管系统。但这是一套介观成像系统(图 3(a)),放大倍率有限。临床上,大脑中动脉栓塞模型精确区分血管形态结构的变化(图 3(b)),脑内恶性肿瘤的特征识别和边界检测,都需要更高倍的显微成像系统实现精确解析。

NIR-II 荧光显微成像术,是将短波红外探测器与传统的荧光显微成像系统结合,可以满足微米级分辨率的成像效果。传统的可见光和 NIR-I 荧光显微成像系统具有高灵敏度、良好的时间分辨率和实时宽场图像的优点,但存在穿透能力低、自发荧光不可忽略和散射导致的空间分辨率低等问题。陈小元教授课题组使用 IR-783@BSA 荧光探针,比较小鼠脑血管的 NIR-I 和 NIR-II 显微成像效果,发现 NIR-II 窗口脉管更清晰,信背比对比 NIR-I 窗口更是增强近 2 倍(图 4)^[27]。

常见 NIR-II 荧光显微成像技术包括宽场显微术、共聚焦显微术、光片显微技术等。其中,宽场显微技术采用激光宽场照射激发,以二维面阵探测接收荧光信号。共聚焦显微术是利用共聚焦光阑(例

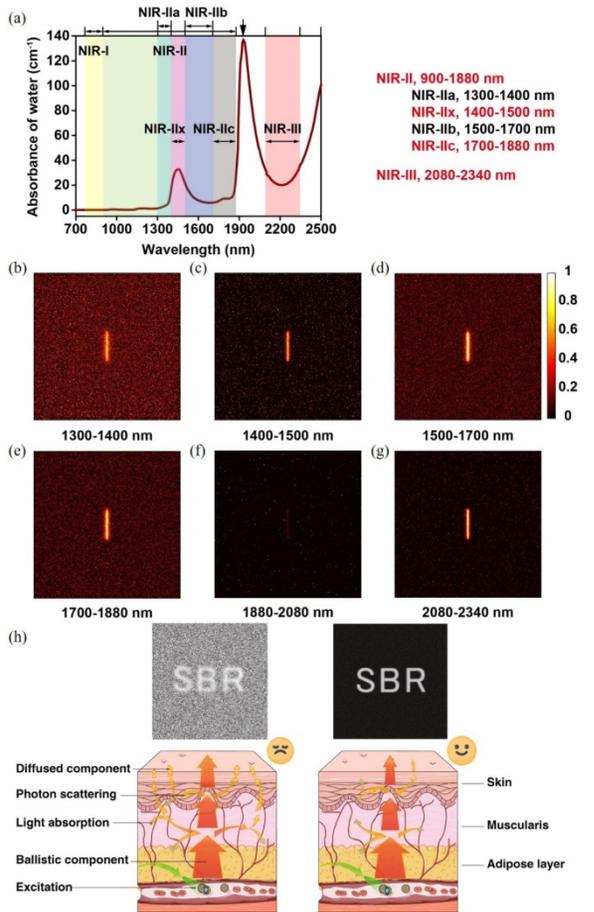


图2 定义并扩展 NIR-II 窗口为 900-1 880 nm, (a) 700~2 500 nm 内的水分子的吸收光谱, 灰色及黑色箭头指出吸收峰, (b-g) 1 300~1 400 nm, 1 400~1 500 nm, 1 500~1 700 nm, 1 700~1 880 nm, 1 880~2 080 nm, 2 080~2 340 nm 窗口内近红外生物组织成像的蒙特卡罗方法模拟结果, (h) 弹道光子和散射光子在组织中的传播以及荧光成像的信背比示意图, 较小光吸收(左)和适当光吸收(右)的生物组织对比^[51]
 Fig. 2 Perfecting and extending NIR-II window to 900~1 880 nm, (a) the light absorption spectrum of water within 700~2 500 nm, (b-g) the simulation results of NIR bio-tissue imaging via the Monte Carlo method in 1 300~1 400 nm, 1 400~1 500 nm, 1 500~1 700 nm, 1 700~1 880 nm, 1 880~2 080 nm, and 2 080~2 340 nm, (h) the schematic diagram of light propagation in tissue, the propagation of excited ballistic and diffused emission photons in the bio-tissue with small (left) and moderate (right) light absorption and the resulting SBRs of fluorescence imaging^[51]

如针孔)来减少进入探测器的离焦光,因此增强了对比度^[53]。但引入针孔的扫描共聚焦显微成像存在几点劣势,其一,由于焦点附近光线的遮挡,浪费了部分有用信号;其二,受限于市售的点探测器(如滨松公司 12397-75)的量子转换效率低,扫描点信

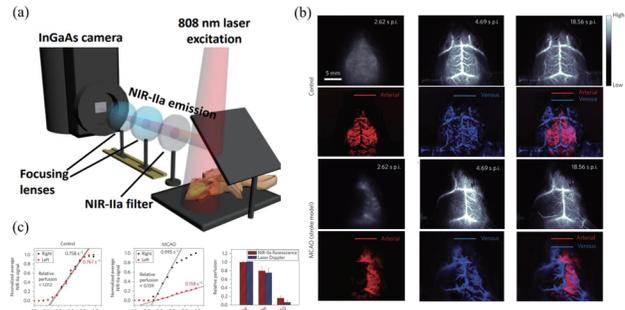


图3 NIR-II介观成像系统实现脑血管观察, (a)用于脑血管成像的 NIR-II 荧光成像系统示意图, (b)健康对照小鼠和大脑中动脉闭塞的小鼠脑血管系统的动态 NIR-IIa 荧光成像, (c) NIR-II 荧光宽场显微成像法与激光多普勒法血流灌注测试对比^[52]
 Fig. 3 NIR-II cerebrovascular mesoscopic imaging, (a) a schematic of the NIR-IIa imaging system for brain vascular imaging, (b) dynamic NIR-IIa fluorescence imaging of a control healthy mouse and a mouse with MCAO, (c) average blood perfusion measured by the NIR-II method (red) and laser Doppler blood spectroscopy (blue)^[52]

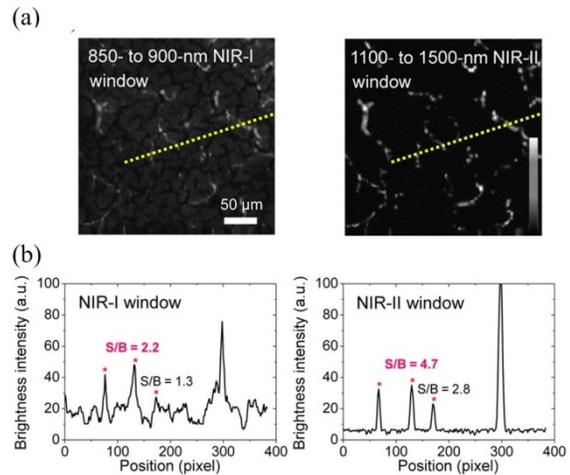


图4 NIR-II和 NIR-I 显微成像效果对比, NIR-II 荧光显微成像表现出两倍的信背比增强, (a)注射 IR-783@BSA 1 小时后,小鼠大脑的 NIR-I 和 NIR-II 窗口离体显微成像, 比例尺: 50 μ m, (b)同一位置 NIR-I 和 NIR-II 图像的横截面强度分布^[27]
 Fig. 4 Comparison of NIR-II and NIR-I microscope imaging, NIR-II imaging affords two times enhancement of SBR, (a) ex vivo microscope imaging of mouse brains at 1-hour post-injection of IR-783@BSA at both NIR-I and NIR-II windows, scale bar: 50 μ m, (b) cross-sectional intensity profile of NIR-I and NIR-II images at the same location^[27]

号停留时间不得不增加,因此成像速度并不理想。

光片显微术激发光是一片薄薄的光片,同时采用探测光路与照射光路的垂直设置来收集激发片层的信号。光片显微术改变了光激发和收集方式,光线通过柱透镜被调制成平面,并需要整个平面穿透样品。这对样品要求高,一般需要做光透明,因此光片显微实现脑血管成像挑战颇大。宽场显微对比前两者,时空分辨率高,并且操作简便。其一,对比扫描点探测器需要外置 X 轴和 Y 轴扫描装置配合,

面探测一次性生成二维图像,如 640 像素×512 像素的图像,从而,时间分辨率较高。其二,因为不需要光束聚焦以及点激发,对光束要求显著下降,操作简便友好。因此,虽然宽场显微术背景抑制不如共聚焦显微术和光片显微术,但由于其对样品要求和实验员要求显著降低,有利于推广应用,具备较好的前景。为了改善 NIR-II 背景抑制的效果,浙江大学钱骏教授课题组开展 NIR-IIx 区域荧光宽场显微

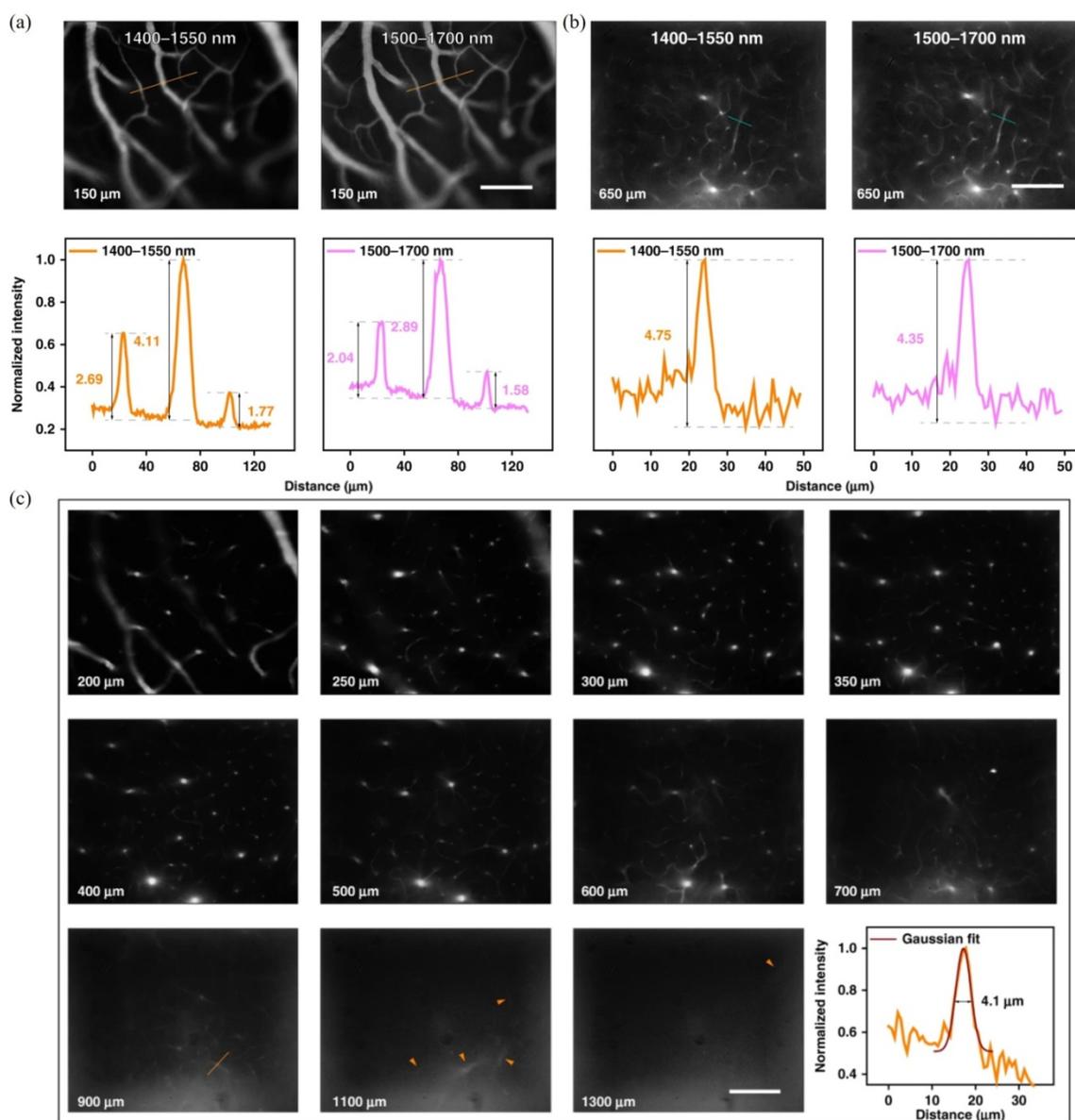


图5 波长>1 400 nm 的 NIR-II 荧光宽场脑血管显微成像,在 (a)150 μm 和 (b)650 μm 的深度下 1 400~1 550 nm 和 1 500~1 700 nm 波段内小鼠脑血管 25 x 显微成像比较,比例尺:300 μm, (c)不同深度下 1 400~1 550 nm 波段内 25 x 脑血管显微成像,比例尺:100 μm^[51]

Fig. 5 NIR-II in vivo fluorescence wide-field microscopic vascular imaging beyond 1 400 nm, the comparison of 1 400-1 550 nm and the 1 500-1 700 nm 25 x cerebrovascular microscopic imaging in the mouse at the depth of (a) 150 μm and (b) 650 μm, scale bar: 300 μm, (c) 25 x microscopic imaging in 1 400-1 550 nm at different depths in the mouse brain, scale bar: 100 μm^[51]

脑成像,证明此波段具有出色的光学切片能力。在1 400~1 550 nm窗口内,光的水吸收极大地抑制了背景(图5(a)),因此,900 μm 深处的直径仅为4.1 μm 微小毛细管仍可区分,甚至1.3 mm深处血管仍可识别(图5(c))。NIR-IIx荧光宽场活体显微成像的断层扫描性能媲美扫描显微系统,操作却无需复杂的激发和采集模式。

Hongjie Dai院士团队和钱骏团队先后在宽场显微成像领域做出努力,在实验室搭建荧光宽场显微成像系统,报导了多种生物模型和不同器官功能的研究^[4, 16, 54]。相比可见光显微系统,NIR-II荧光宽场显微成像系统亟需商用化和国产化,以便于NIR-II活体成像的产研落地和快速推广。钱骏教授团队与舜宇光学合作,开发出新型NIR-II荧光正置显微成像系统(图6),可实现宽场激发、面阵探测,具备成像深度大、时间分辨高、空间分辨好、操作简便等优势,可实现深层组织的高倍探测,已满足商用要求。此系统先后被相关科研院所购置,已在宫颈癌靶向化疗^[55]、小鼠脑血管^[51]研究等领域得到应用和报导。



图6 NIR II-MS 近红外二区活体显微影像系统

Fig. 6 NIR II-MS the second near-infrared region in vivo microscopic imaging system

3 NIR-II 荧光宽场显微成像的应用

基于NIR-II荧光成像的大深度、高分辨率等优势,诸多生物医学应用得以开发。其中,活体大深度显微成像不仅能够对脉管系统、组织器官清晰破译,而且能够获取生物体内生命活动细微过程的动态信息,具有对生理和行为动态观察的巨大潜力。随着生物模型从小鼠、大鼠等简单啮齿类动物逐步发展到猕猴、猕猴等复杂灵长类动物,NIR-II荧光宽场显微相关应用逐步逼近临床转化标准。但随着生物体型越来越大,组织深度越来越大,NIR-II荧光宽场成像的系统要求和技术挑战也越来越高。

3.1 小鼠的脑血管成像、脑功能成像、肿瘤和炎症检测成像

恶性肿瘤与脑血管疾病是人类健康的两大威胁。中风、癌症等疾病中的异常血流通常会导致缺氧,因此,大脑中血流量的量化至关重要。常规测量血流的方法,要么缺乏解析单个毛细血管分辨率的能力,要么成像速度太慢无法获取大量的血流信息。NIR-II荧光宽场显微系统提供高时间分辨率和高空间分辨率,足以实现脑血管实时解析成像^[54],并可以实现血流速度和心跳周期的测量。Bawendi院士团队介绍了一类砷化铟量子点,通过NIR-II荧光宽场显微系统对健康组织和肿瘤边缘的血流进行动态成像,由此生成了小鼠正常和异常脉管系统的z切片图像,观察到肿瘤边缘显示出不规则血管和振荡的“钟摆”血流,而健康大脑半球则显示出正常的血管网络和规律的血流。接着,课题组通过多通道粒子图像测速方法,获得肿瘤边缘和健康大脑的定量血流图(图7(a)左)。众所周知,大组织深度下,双光子显微成像具有出色的生物结构解析能力^[56]。有特色的是,在该工作中,课题组将NIR-II荧光宽场显微成像与双光子成像进行比较,发现这种增强焦平面对比度方法产生的静态z截面图像媲美双光子显微成像效果(图7(a)右)。钱骏教授团队等同样针对血流测速开展工作^[57],静脉注射IR820(0.5 mg/mL, 200 μL)后,使用NIR-II荧光宽场显微系统监测小鼠脑血管结构和实时血液流动,实时获取150 μm 深度处的毛细血管血流速度为725 $\mu\text{m}/\text{s}$ 。同时,研究人员使用NIR-II荧光宽场显微系统记录开颅小鼠头骨下方0~800 μm 深度下脑血管图像,并在800 μm 的深度下区分出直径仅6.1 μm (半高全宽)的毛细血管。值得一提的是,此实验中,为了跟踪更小的脉管,研究人员使用70倍

物镜,在 300 μm 深度识别了直径 2.5 μm 的毛细血管(图 7(b))。相关数据表明,NIR-II 荧光宽场显微系统不仅可以获得丰富的小鼠毛细血管结构,也可以借助高时间分辨率测定血流速度。

血管造影方法可提供血管状态的有用信息,用于监测疾病过程,如脑血栓前后的血管结构变化及血流动力学改变。这有助于癌症和心血管疾病的早期诊断和治疗。然而,目前活体细小脉管系统和血流动力学的监测方法差强人意。例如,计算机断层扫描和磁共振成像分辨特征只能低至 100 μm 量级,并且扫描时间长、后处理复杂、数据记录困难。NIR-II 荧光宽场显微成像技术能以高时空分辨率实现深层组织血管可视化,是解决此类问题的更优方案。钱骏教授及唐本忠院士课题组开发了一种近红外聚集诱导发射(Aggregation-Induced Emission, AIE)纳米颗粒^[54],借助 NIR-II 荧光宽场显微成像系统,对小鼠大脑中的光致血栓形成缺血(Photo-Thrombotic Ischemia, PTI)和血脑屏障(Blood-Brain Barrier, BBB)损伤过程实现了精确监测(图 8(a))。除了细小的光致血栓,荧光宽场显微系统也可以对中脑动脉栓塞(Middle Cerebral Artery Occlusion, MCAO)造模后大血栓的形成精准检测。钱骏教授课题组,使用荧光宽场显微系统,借助 IR820 小分子有机染料,实施高对比度和大穿透深度 NIR-II 荧光脑血管造影,获得开颅小鼠高清晰的 MCAO 造

模前后的血管变化(图 8(b))。该研究揭示了高生物相容性和生物可排泄的 IR-820 在功能性血管造影治疗诊断方面具有巨大潜力。此外,钱骏教授、浙江大学医学院附属邵逸夫医院李恭会教授及浙江大学医学院附属妇产科医院张丹教授课题组合作,在不需要对小鼠进行开颅手术的条件下,利用一种临床批准的染料吲哚菁绿(ICG),通过 NIR-II 荧光宽场显微系统进一步观察到脑栓塞后小鼠脑血管的变化^[58]。基于穿颅的高分辨率 NIR-II 荧光宽场显微脑血管成像,在完整颅骨状态下实现脑血栓诊断,意味着临床应用可行性进一步提高。小鼠脑血栓性缺血实时跟踪的探索为原位探索脑疾病的发病机制开拓了新方向。

肿瘤和炎症性病变的检测和诊断仍是临床的巨大挑战,而 NIR-II 荧光宽场显微系统亦可用于肿瘤的精准检测。Bawendi 院士课题组^[16]使用近红外量子点,借助 NIR-II 荧光宽场显微系统的高时间分辨率,通过透明颅窗,以 30 fps 的帧率对小鼠大脑中的多形性胶质母细胞瘤成像,并使用主成分分析的方法将图像的时间序列去卷积,以区分预先标记的肿瘤、动脉血管和静脉血管,由此来观察肿瘤如何影响血管网络。张凡教授课题组进一步通过双通道荧光造影,对肿瘤基质和血管进行区分。研究人员将 NIR-II 荧光探针 CEA-OMe 应用于活体肿瘤显微成像(图 9(a)),同时使用 ICG 作为血管造影剂

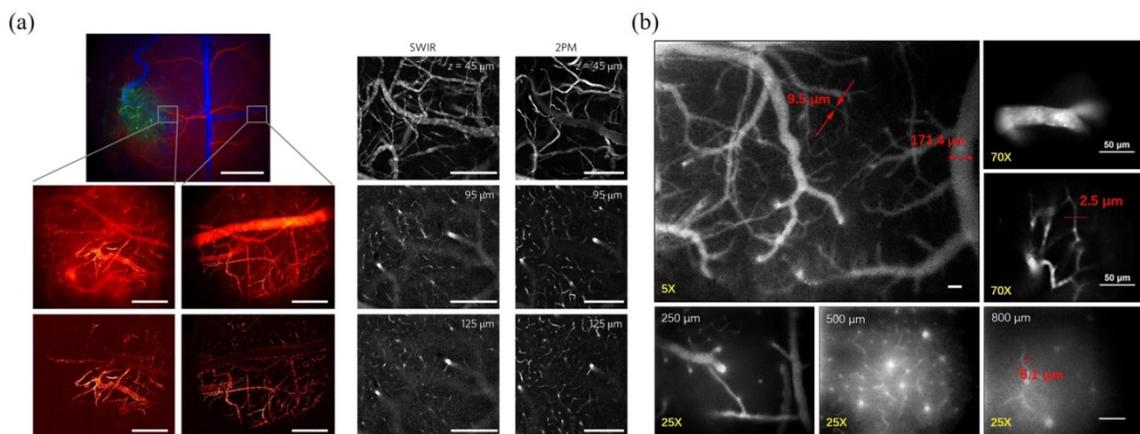


图 7 实时、高分辨 NIR-II 脑血管成像, (a) 使用 NIR-II 量子点实现脑血管成像及其与双光子荧光成像的对比, 比例尺: 左上, 1 500 μm , 左下, 330 μm , 右, 200 μm , (b) 5 x, 25 x, 70 x 小鼠的活体 NIR-II 荧光显微脑血管成像, 比例尺: 5x 成像, 100 μm , 25x 成像, 100 μm , 70x 成像, 50 μm ^[57]

Fig. 7 Real-time and high-resolution NIR-II microscopic imaging of brain vessels, (a) intravital imaging of cerebral vasculatures using QD composite particles and the comparison with the two-photon microscopy (2PM)^[16], scale bars: left up, 1 500 μm , left down, 300 μm , right, 200 μm , (b) in vivo NIR-II fluorescence microscopic cerebrovascular imaging of a mouse with a cranial window at the magnifications of 5 x, 25 x and 70 x, scale bars: 5x, 25x imaging, 100 μm , 70x imaging, 50 μm ^[57]

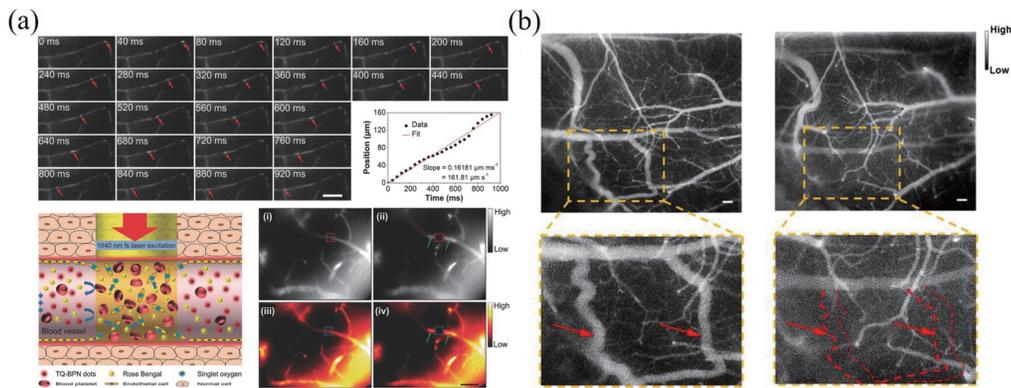


图8 NIR-II荧光宽场显微成像系统用于血流动力学研究和小鼠脑血栓性缺血的实时跟踪,(a)上:对于一个随机挑选的信号点,记录下它随时间变化在血管(血管直径为 $4.4 \mu\text{m}$)中的位置变化,并绘制位置时间函数曲线图,下:左图为双光子激发诱导血栓性缺血的示意图,右图为鼠脑血管的NIR-II荧光显微成像结果,(i)为血栓形成前;(ii)为血栓形成后,(iii)和(iv)分别为(i)(ii)的伪彩色图,(b)静脉注射IR-820后小鼠的NIR-II荧光宽场显微成像结果,左为血栓形成前;右为MCAO血栓形成后^[54, 57],比例尺: $100 \mu\text{m}$

Fig. 8 Study of hemodynamics utilizing NIR-II fluorescence microscopic imaging and monitoring of thrombotic ischemia in the mouse brain in real-time, (a) upper: changing of locations of a randomly chosen point signal in a blood capillary (diameter = $4.4 \mu\text{m}$) with a curve of position as a function of time plotted on a graph, lower: on the left is a schematic diagram illustrating the two-photon excitation induced PTI, on the right is the NIR-II fluorescence microscopic images of brain blood vessels before (i) and after (ii) PTI induction, while (iii) and (iv) are just the heat maps of (i) and (ii) respectively, (b) NIR-II fluorescence microscopic images of brain blood vessels from a mouse intravenously injected with IR-820, while images on the left are the normal brain, images on the right are the brain with MCAO^[54, 57], scale bar: $100 \mu\text{m}$

获得双色荧光图像(图9(b)),肿瘤细胞中的CEAF-OMe荧光信号(红色)被特异性激活,与血管中的ICG信号(绿色)能明显区分(图9(c))。这种方法可以避免术中出血引起的严重荧光污染,有助于肿瘤精确切除^[59]。

此外,NIR-II荧光宽场显微系统也可以进一步监测肿瘤的高渗透滞留效应(Enhanced Permeability and Retention, EPR)。唐本忠院士、钱骏教授等^[54]将AIE纳米颗粒TQ-BPN注射进入具有旧肿瘤(4周)和新肿瘤(2周)的小鼠体内,使用NIR-II荧光宽场显微系统来识别不同生长阶段的肿瘤(图10(a)、10)。注射5分钟内,旧肿瘤和新肿瘤都无法清晰分辨,在血管外几乎检测不到荧光信号(图10(d))。24小时后,旧肿瘤仍不能分辨,而新肿瘤清晰可见(图10(d))。课题组注意到新肿瘤血管外有大量荧光聚集体,与旧肿瘤形成鲜明对比。实验结果可以用肿瘤EPR效应来解释(图10(c))。对比旧肿瘤和正常组织,新肿瘤生长得更快,在肿瘤区域形成了许多新生的血管来提供营养和氧气,并且这些排列不良的有缺陷的内皮细胞组成的新血管具有宽窗孔。因此,AIE纳米颗粒可以从血管内扩散到血管外的组织里,产生更亮的荧光区域。由此

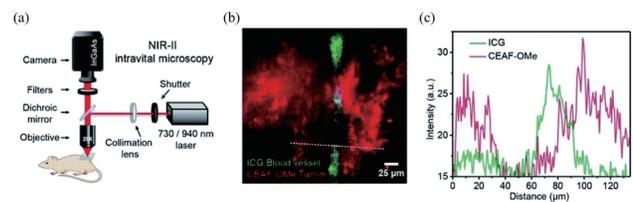


图9 NIR-II活体肿瘤显微成像系统,(a)NIR-II荧光显微系统示意图,(b)CT26肿瘤基质和血管的双色NIR-II荧光显微图像,红色:CEAF-OMe($50 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{L}$), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 940/1200\sim 1700 \text{ nm}$;绿色:ICG($50 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{L}$), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 730/1000\sim 1700 \text{ nm}$,比例尺: $25 \mu\text{m}$, (c)沿着(b)中白色虚线的横截面强度分布^[59]

Fig. 9 In vivo NIR-II microscopic tumor imaging, (a) the schematic diagram of NIR-II fluorescence microscopy system (b) two-color NIR-II fluorescence microscopic image of CT26 tumor stroma and vessel, red: CEAF-OMe ($50 \mu\text{M}$, $200 \mu\text{L}$), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 940/1200\sim 1700 \text{ nm}$, green: ICG ($50 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{L}$), $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 730/1000\sim 1700 \text{ nm}$, scale bar: $25 \mu\text{m}$, (c) cross-sectional intensity profile along the white dashed line in (b)^[59]

可见,NIR-II荧光宽场显微系统凭借穿透深度大和成像实时的优点,能够清晰地原位显示肿瘤部位的EPR效应,这将有利于早期肿瘤检测和转移研究。

生物医学研究中,一般通过制作病理切片来研

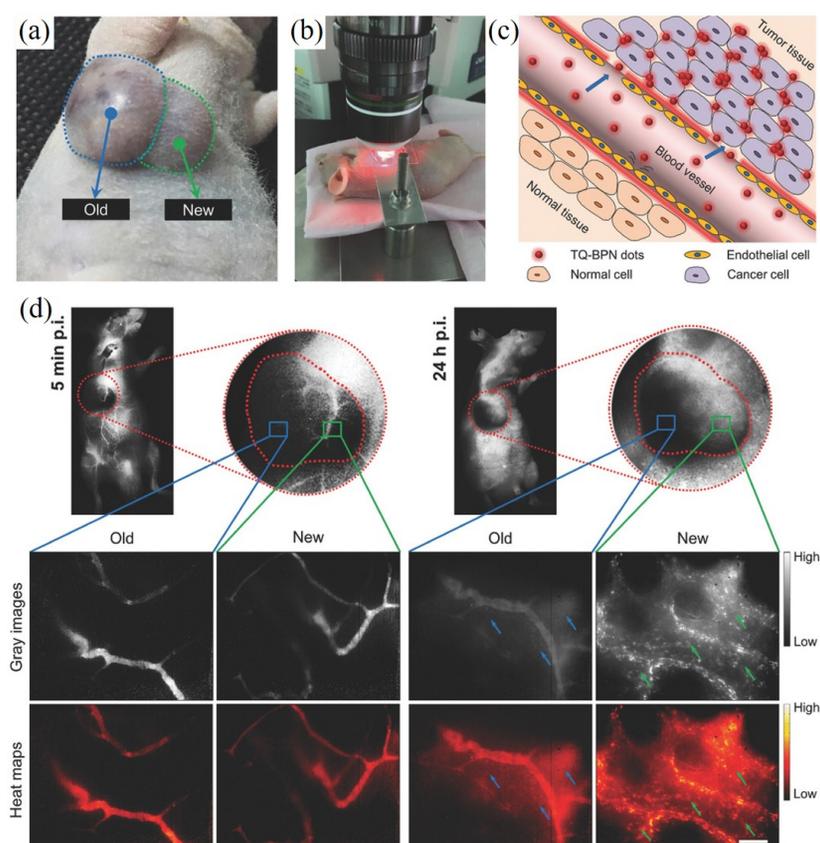


图 10 使用 NIR-II 荧光成像在肿瘤部位原位显示高渗透长滞留 (EPR) 效应, (a) 用于活体荧光显微成像的荷瘤小鼠的照片。左边是旧肿瘤, 右边是新肿瘤, (b) 显示肿瘤部位显微成像的照片, (c) EPR 效应的示意图, (d) 荧光显微成像术, 用于可视化不同时间点新旧肿瘤中的 EPR 效应, 深度 = $180 \mu\text{m}$, 比例尺表示 $100 \mu\text{m}$ ^[54]

Fig. 10 In situ NIR-II fluorescence imaging of the enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor sites, (a) a photograph of the tumor sites on a tumor mouse used for in vivo microscopic imaging, the left is an old tumor while the right is a new one, (b) another photograph to show the microscopic imaging on tumor sites, (c) the schematic diagram to illustrate the EPR effect, (d) visualization of EPR effect in an old and new tumor at different time via NIR-II fluorescence microscopic imaging, depth = $180 \mu\text{m}$, the scale bar indicates $100 \mu\text{m}$ ^[54]

究纳米颗粒在炎症部位蓄积作用。但是, 病理切片需要进行机器脱水, 切片的过程会损失并破坏聚集纳米颗粒的分布。王强斌教授课题组, 使用纳米探针 A&MMP@Ag₂S-AF7P, 对比 NIR-II 荧光宽场显微成像术和传统标准 H&E 染色方法, 发现两种方法在癌组织上可以实现肿瘤区域的精确共定位 (图 11)^[60]。唐本忠院士、钱骏教授、林辉教授、齐迹教授等^[61]在 AIE 纳米探针 (BPN-BBTD 纳米颗粒) 的辅助下, 首次将 NIR-II 荧光宽场显微成像方法用于追踪炎症性肠病 (Inflammatory Bowel Diseases, IBD), 监测炎症严重程度并检测 IBD 小鼠模型对药物干预的反应 (图 12)。利用图 12(a)-(d) 展示的显微成像系统, 研究人员对结肠段进行检测。研究人员充分利用 NIR-II 荧光宽场显微系统空间分辨率高的特点, 上下移动电动载物台, 记录 0~350 μm 不同深度

的图像, 检测到 BPN-BBTD 纳米颗粒主要积累在黏膜和黏膜下层 (图 12(g))。为了更好地揭示黏膜和黏膜下层荧光区域的形态及规律, 将两个结肠段制成切片并用于 H&E 染色。结合 H&E 染色和 NIR-II 荧光成像, 研究者同样发现纳米颗粒积聚在黏膜和黏膜下层, 并集中在炎症细胞聚集部位 (图 12(h) 和图 12(i))。该方法提供了一种无需病理切片即可快速、准确解析纳米颗粒在组织中分布规律的途径, 并且这种方法保留了纳米颗粒分布的空间关系, 与病理切片可以形成良性互补。NIR-II 荧光宽场显微术不仅在病理切片上表现出优异的潜力, 在细胞成像领域也具备独到优势。王强斌教授课题组, 使用纳米探针 APP-Ag₂S-RGD 对癌细胞的靶向能力, 通过荧光引导的细胞减灭术实现了肿瘤精确切除^[62]。

除了 NIR-II 荧光宽场显微成像技术在活体大深度生物结构检测方面的巨大优势,本小节也揭示了其在细胞、切片、薄离体组织等结构的精准解析能力。

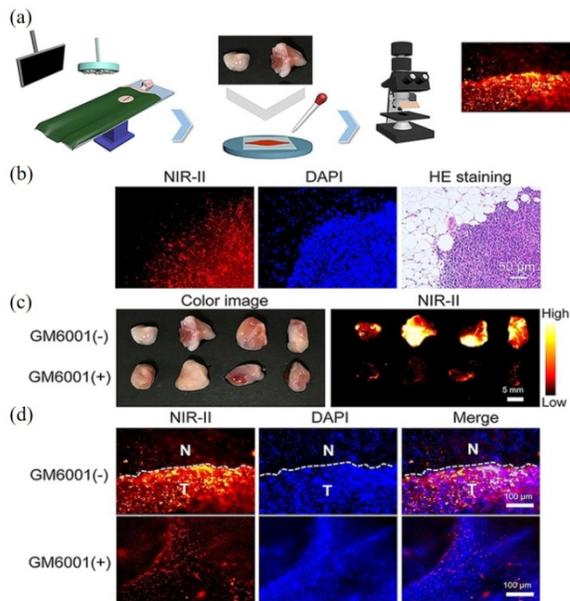


图 11 使用 NIR-II 荧光宽场显微术实现离体肿瘤的快速无干扰组织分析, (a) 术中组织快速病理检查流程图, (b) 荷瘤小鼠身上切除的癌组织的 NIR-II 荧光宽场显微图像和 H&E 染色, (c) NIR-II 荧光和明场图像, 对比未经治疗和经过抑制剂 GM6001 治疗的患者切除的肿瘤结节, T = 肿瘤组织, N = 正常组织^[60]

Fig. 11 Rapid unperturbed-tissue analysis for ex vivo tumor by NIR-II wide-field fluorescence microscopy, (a) the schematic diagram of rapid pathological examination of intraoperative tissues, (b) NIR-II fluorescence microscopic images and H&E staining of cancer tissues excised from tumor-bearing mice, (c) NIR-II fluorescence and brightfield images, comparing the tumor nodules resected by patients treated without or with MMP inhibitor GM6001, T = tumor tissue, N = normal tissue^[60]

在临床手术中,胆囊切除带来的医源性肝外胆管损伤并发症后果严重。尽管基于 X 射线的胆管造影可以降低胆道损伤的发生率,但辐射损伤和专业依赖阻碍了其进一步的临床应用。NIR-II 荧光高对比度显示胆道成像技术,能有效减轻胆道解剖变异和胆管损伤的风险。钱骏教授课题组,发现 ICG 与胆汁中的蛋白质成分结合后可发出增强的 NIR-II_b 荧光信号,研究者采用三种不同倍率的物镜实施高清晰的胆道显微成像。随后,课题组又报道了 AIE 纳米颗粒作为胆道造影剂,在 NIR-II_b 窗口实现

高质量具有精确诊断能力的胆管造影^[63, 64],揭示 NIR-II 荧光宽场显微系统用于胆道术中诊断的潜力^[65]。

3.2 大鼠的脑血管成像

一些研究表明,大鼠的大脑拥有默认模式网络,对比小鼠,其大脑与人类的大脑更相似^[66, 67]。因此,清楚地破译大鼠脑血管系统更有意义^[66, 68, 69]。但 NIR-II 荧光成像很少用于大鼠成像,主要是由于体型大(大鼠体积通常是小鼠 10 倍左右),光散射强,组织深度高以及缺乏合适的荧光探针。其一,体型大意味着生物样本固定困难和操作复杂,现有显微系统一般无法满足要求,需要对系统载物平台做改造和升级;其二,体型大也意味着成像试剂注射量增加,因此对探针的安全毒性和代谢就提出更高的要求;其三,组织深度高,带来更强的散射,荧光强度就会减弱,需要有更亮的探针和更高效的成像系统。

唐本忠院士、钱骏教授等^[70]首次报道了活体大鼠的血管系统和器官 NIR-II 荧光成像,获得了 NIR-II (>1 200 nm) 大鼠荧光宽场显微成像脑血管图,能够分辨 700 μm 深度内细至 9.1 μm 的毛细血管(图 13)。这项成果有利于检测大型动物的脑部疾病。此外,课题组使用 NIR-II 显微技术监测了大鼠的脑血栓形成,首次利用荧光技术原位观察大鼠脑血管疾病。相关结果表明,基于明亮的纳米探针的 NIR-II 成像可以促进大鼠脑血栓形成的实时跟踪,并有助于更好地了解大型动物脑部疾病的发病机制和过程。

3.3 狨猴的脑血管成像

大型动物(如狨猴)的 NIR-II 荧光成像技术的探索有利于临床转化。普通狨猴是一种人类行为和疾病研究的潜在模型。其一,狨猴在药理活性、治疗靶点、药物暴露量、动力学和代谢等方面与人类相似性较高,被广泛应用于纳米医学研究;其二,狨猴体型小,仅需少量的测试试剂即可完成一项研究计划;其三,狨猴繁殖快,能提供足够的动物数量来支持研究。

狨猴神经活动和脑血流调节的研究,有利于揭开人类大脑疾病的神秘面纱。钱骏教授、高利霞教授及唐本忠院士等^[71]首次在非人类灵长类动物中进行了穿薄颅骨大深度脑血管显微成像(如图 14 所示)。首先,狨猴的颅骨需要先做磨薄处理。接着,狨猴被固定在 X 轴和 Y 轴方向可调节的二维平移台

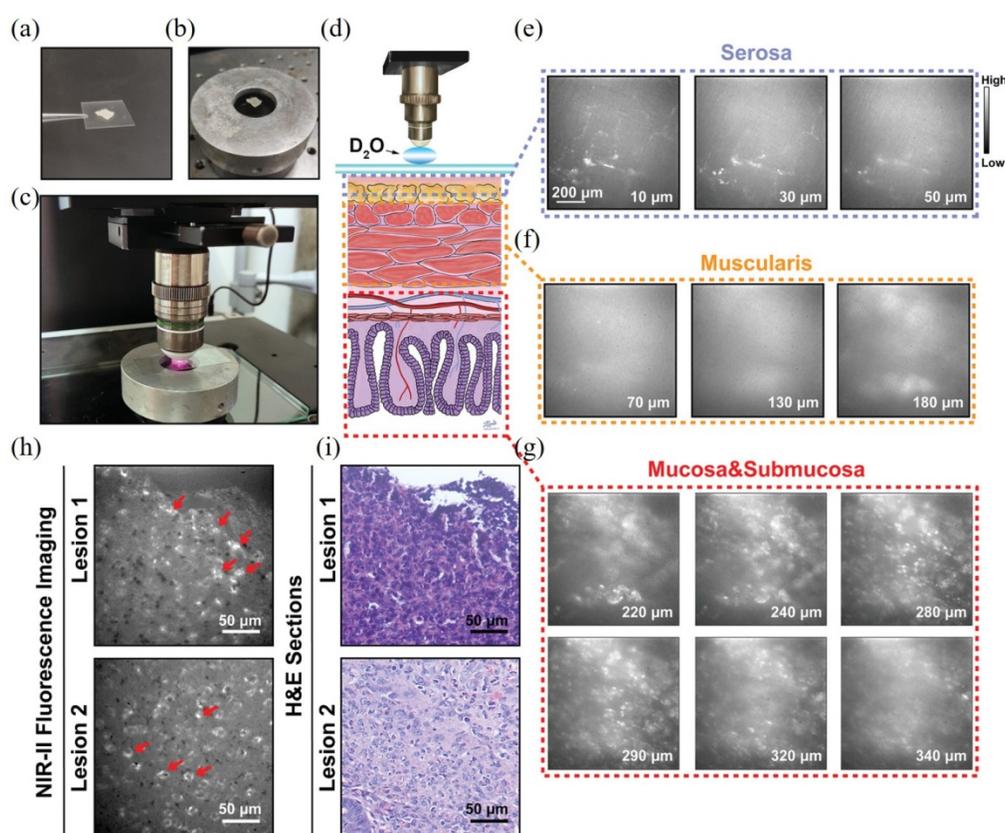


图 12 病变肠段 NIR-II 荧光宽场显微术, (a) 结肠段置于盖玻片上, (b) 在盖玻片下放置一个金属环, (c) 结肠段 NIR-II 荧光宽场显微成像示意图, (d) 结肠壁解剖结构示意图, (e) 不同深度的浆膜图像 (比例尺: 200 μm), (f) 肌层在不同深度的图像, (g) 不同深度黏膜及黏膜下层图像, (h) 两个选定病灶的 NIR-II 荧光宽场显微图像, (i) 两个病灶的 H&E 染色结果^[61]

Fig. 12 Diseased intestinal segment NIR-II fluorescence wide-field microscopy, NIR-II fluorescence wide-field microscopy on diseased intestinal segment with high spatial resolution, (a) the colonic segment was placed on a coverslip, (b) a metal annulus was placed under the coverslip, (c) a photograph of the NIR-II fluorescence wide-field microscopic imaging on the colonic segment, (d) the schematic diagram to illustrate the anatomical structure of colon wall, (e) images of the serosa taken at different depths (scale bar: 200 μm), (f) images of the muscularis at different depths, (g) images of mucosa and submucosa at different depths, (h) NIR-II fluorescence wide-field microscopic images of two selected lesions, (i) the two lesions with H&E staining^[61]

上, 调节后使得待观察颅窗位于显微物镜正下方, 并静脉注射纳米探针。然后, 研究人员使用 793 nm 激光落射照明, 并收集 1 100 nm 以上的荧光信号, 借助 NIR-II 宽场显微系统获取猕猴的脉管系统清晰图像。

课题组继续跟踪猕猴毛细血管的周期性跳动, 测量和计算获得猕猴的呼吸频率为 0.64 Hz、心率为 3.30 Hz。通过锁定一个典型的微小皮质区域, 研究人员使用 25 倍物镜进一步进行 NIR-II 穿薄颅骨脑血管造影, 最终在近 700 μm 深度实现清晰成像, 并且清楚地识别 200 μm 深处直径为 5.2 μm 的毛细血管 (图 14(n))。同时, 课题组进行了猕猴脑血管流速检测 (图 15(c)) 和血栓形成的无创监测 (图 15(d)-(h)), 血栓过程中其他侧支的血流停滞

和回流都被 NIR-II 荧光宽场显微成像系统清晰地捕捉和记录。NIR-II 荧光宽场显微成像实现的血栓监测方法, 操作简单、有效信号损失小, 有助于确定中风的关键因素: 梗阻部位和梗阻范围, 提高诊断的准确性。

3.4 猕猴的脑血管成像

猕猴是一种具有类人皮质和组织的动物模型。灵长类动物和大鼠之间的一个显著差异是, 大部分大脑皮层被组织成集成神经元反应的模块化功能单元 (称为列或域)^[72, 73]。这种灵长类动物特有的功能结构表明其血管结构可能具有特殊性以满足代谢和血液动力学需求。此外, 不同于大鼠, 大型动物的颅窗并不总是水平的, 这对大型动物脑成像工作来说是一大挑战。钱骏教授、Anna Wang Roe 教

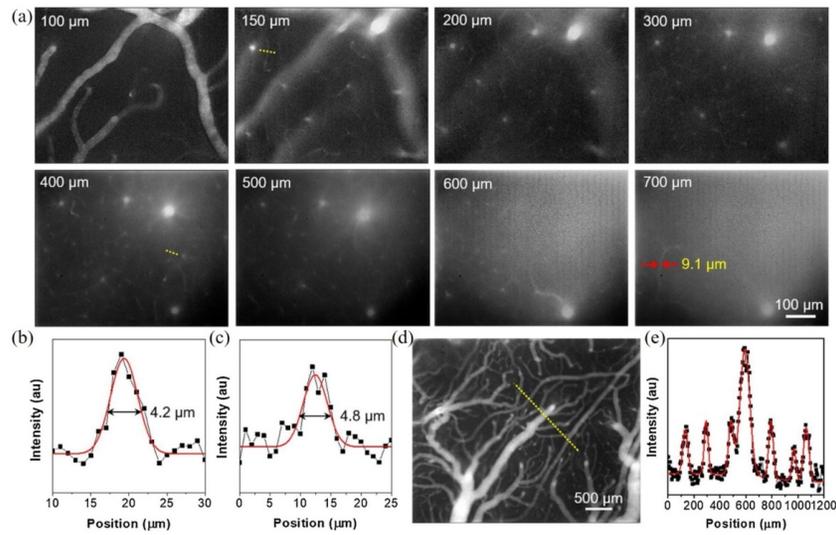


图 13 NIR-II大鼠脑血管造影, (a)静脉注射 AIE 纳米颗粒的大鼠,不同深度下的 NIR-II($>1\ 200\ \text{nm}$)荧光宽场显微脑血管图,红色箭头表示直径为 $9.1\ \mu\text{m}$ 的毛细血管,深度为 $700\ \mu\text{m}$, (b)和(c)中血管的横截面强度和半峰全宽对应于图(a)中黄色虚线, (d)大视场大鼠脑血管在 $150\ \mu\text{m}$ 深度的 NIR-II 荧光图像和(e)不同大小的血管的横向强度对应于(d)中的黄色虚线^[70]

Fig. 13 NIR-II rat cerebral angiography, (a) in vivo NIR-II ($>1\ 200\ \text{nm}$) fluorescence microscopic imaging of brain vasculature of a rat intravenously injected with AIE dots at different depths, the red arrows demonstrate a blood capillary (diameter = $9.1\ \mu\text{m}$) at the depth of $700\ \mu\text{m}$, the cross-sectional intensity profiles and full width at half maximum (FWHM) of the blood vessels which correspond to the dotted yellow lines in (a) are plotted in (b) and (c), (d) NIR-II fluorescence image of brain vasculature of rats treated with AIE dots at the depth of $150\ \mu\text{m}$ in wide field of view and (e) the cross-sectional intensity profiles of the blood vessels in different sizes corresponding to the dotted yellow line in (d)^[70]

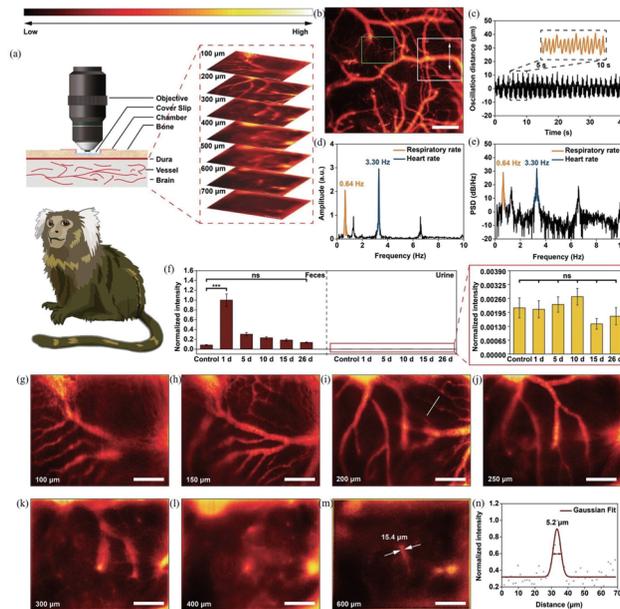


图 14 高空间分辨率的狨猴穿颅脑血管显微系统, (a)头骨磨薄狨猴显微成像系统示意图, (b)5 x NIR-II 荧光宽场显微脑血管图像,比例尺: $300\ \mu\text{m}$, (c)皮质血管位置时间函数图, (d)图c时域信号的快速傅里叶变换, (e)图c时域信号的功率谱密度, (f)狨猴粪便和尿液的标准化光致发光强度, (g-m)狨猴薄头骨下方不同深度($100\sim 600\ \mu\text{m}$)的脑血管显微图像,比例尺: $100\ \mu\text{m}$, (n) $200\ \mu\text{m}$ 处血管直径分析高斯拟合^[71]

Fig. 14 High-spatial-resolution through-thin-skull cerebrovascular microscopic imaging in marmosets, (a) the schematic diagram of the microscopic imaging system of the thinned-skull marmoset, (b) 5 x NIR-II fluorescence microscopic cerebrovascular image, scale bar: $300\ \mu\text{m}$, (c) the plot of cortical vessel position time function, (d) the fast Fourier transformation of time-domain signals in Fig. (c), (e) the power spectral density of Fig. (c), (f) the normalized PL intensity of the feces and urine from the marmosets, (g-m) microscopic images of different depths ($100\sim 600\ \mu\text{m}$) of cerebral blood vessels of the thinned-skull marmoset, scale bar: $100\ \mu\text{m}$, (n) the analysis of the vessel at the depth of $200\ \mu\text{m}$ ^[71]

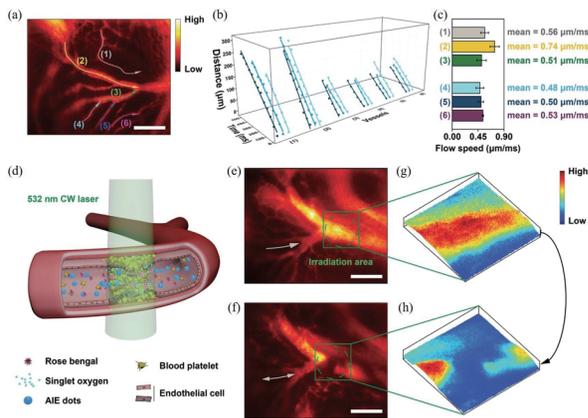


图15 穿薄颅骨的狨猴皮质高时间分辨率的血流监测和血栓观察,(a)脑血管系统和六条示例血管的25 x显微图像,比例尺:100 μm , (b)血管中荧光点信号时间位置距离关系图, (c)图(a)的6条血管平均血流量, (d)532 nm 激光激发的PTI 诱导示意图, (e)PTI 诱导前,脑血管的 NIR-II 荧光宽场显微图像,比例尺:100 μm , (f)PTI 诱导后,脑血管的 NIR-II 荧光显微图像,比例尺:100 μm , (g)PTI 诱导前照射区域的3D NIR-II 荧光强度分布, (h)PTI 诱导后照射区域的3D NIR-II 荧光强度分布,白色箭头代表PTI 诱导前后的流动方向,PTI 引起血流方向的变化^[71]

Fig. 15 Through-thinned-skull cortical blood flow monitoring and observation of the PTI induced thrombosis in marmosets, (a) 25 x microscopic images of the cerebrovascular system and six sample blood vessels, scale bar: 100 μm , (b) the plot of the time, position and distance of the fluorescent point signal in the blood vessel, (c) the average blood flow of the 6 vessels in Fig. (a), (d) the schematic of PTI induction by 532 nm laser excitation, (e) NIR-II fluorescence microscopic image of cerebral blood vessels before PTI induction, scale bar: 100 μm , (f) NIR-II fluorescence microscopic image of cerebral blood vessels after PTI induction, scale bar: 100 μm , (g) 3D NIR-II fluorescence intensity distribution in the illuminated area before PTI induction, (h) the 3D NIR-II fluorescence intensity distribution of the illuminated area after PTI induction, the white arrows represent the flow direction before and after PTI induction, PTI causes a change in the direction of blood flow^[71]

授及奚望副教授等展开合作^[74],使用 ICG 作为 NIR-II 荧光探针,开发了具有高时间分辨率的宽场显微系统,首次实现 NIR-II 荧光宽场显微狨猴脑血管成像,并测量了狨猴血流速度和心跳周期(图16)。在此工作中,利用 NIR-II 荧光宽场显微系统高时间分辨率、操作方便、大穿透深度和高信背比等优点,研究者对狨猴脑血管系统的微毛细血管系统进行成像,在 300 μm 大深度处识别出 7.8 μm 直径的毛细

血管。

在系统改造上,课题组在原系统基础上设计了一个适用于灵长类大动物的三维可调节 NIR-II 荧光宽场显微系统。由于猕猴大脑尺寸较大,目标成像区域可能位于前后或中间倾斜的平面中。为了满足这一需求,课题组将整个光学系统安装在一个多向可调支架上。这种可灵活平移和旋转的系统,使显微物镜可垂直于猕猴颅窗(图16(a))。该系统实现了25帧/秒的高时间分辨率的猴脑血管功能成像,可以精确计算毛细血管的血流速度和监测心脏脉冲周期(图16(b)-(f))。在25倍放大的视场中,研究者以每秒25帧(FPS)的速度连续跟踪那些沿着毛细血管移动、来自 ICG 的 NIR-II 荧光亮点(图16(e))。通过在不同图像帧上绘制该点的位置,研究者确定了该毛细血管的脑血流平均速度为 0.65 mm/s。视场内其他两个毛细血管的血流速度也用相同的方式确定为 0.21 mm/s 和 0.39 mm/s (图16(d))。

借助宽场显微面探测的大视场优势,研究者同时评估了视场中多个毛细血管的流动特性。因为静脉从分支收集血液,而动脉将血液分配到分支^[75],所以根据流动方向能够识别血管类型属于静脉或动脉(图17(a))。在一个心脏脉冲期间,研究者使用 NIR-II 荧光显微成像系统可以观察到明/暗边界的最高和最低位置,以及亮/暗边界位置的波动,通过绘制每个脉冲峰值的时间点并进行线性拟合,就获得了猕猴 2 Hz 的心跳频率结果(图17(b))。同时使用生理监测器测量得到的周期为每分钟 120 个脉冲,与荧光宽场显微图像序列计算获得心跳脉冲数据完全一致。这表明, NIR-II 荧光宽场显微成像系统的高时间分辨率不仅可提供大血管的脉搏信息,也可同步监测小血管中的血流速度。由此可见,经过进一步优化的 NIR-II 荧光宽场显微系统可以实现从啮齿类到非人灵长类大动物的多模型大深度精准检测。

NIR-II 荧光宽场显微系统拥有高时间分辨率以监测动态生物过程,提供高空间分辨率以观察微小生物结构、精准定位药物分布,还具备大成像深度。同时,该系统对比其他显微成像系统(如共聚焦显微术、光片显微术)易于上手使用并且成本适中,便于在活体研究和临床实践中推广。通过相关研究团队的努力,实现了从小鼠、大鼠、狨猴到猕猴,从脑血管、肿瘤血管到炎症组织及离体细胞、组

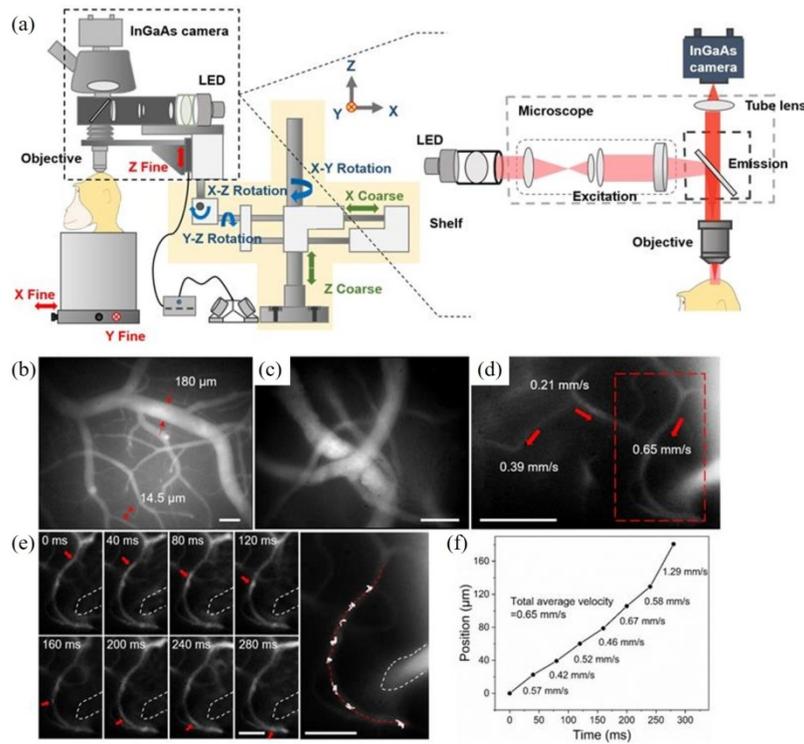


图 16 猕猴的 NIR-II 荧光宽场显微脑血管成像, (a) 适用于大动物的 NIR-II 荧光宽场显微系统, (b) 3 x 脑血管显微图像, (c) 25 x 脑血管显微图像, (d) 3 根采样血管血流速度, (e) 毛细血管内荧光点信号跟踪的逐帧显示, 右图标记跟踪位置, (f) 荧光点位置的时间函数的图, 比例尺表示, (b), (c), (d): 100 μm, (e): 50 μm^[74]

Fig. 16 NIR-II fluorescence wide-field microscopic imaging of cerebral vessels in rhesus monkeys, (a) NIR-II fluorescence wide-field microscopy system suitable for large animals, (b) 3 x cerebrovascular microscopic image, (c) 25 x cerebrovascular microscopic image, (d) blood flow velocity of the 3 sampling vessels, (e) the tracking frame display of the fluorescent signal in the capillary, picture on the right marks the tracking position, (f) the plot of fluorescent position as a function of time, scale bars in (b), (c) and (d): 100 μm, scale bars in (e): 50 μm^[74]

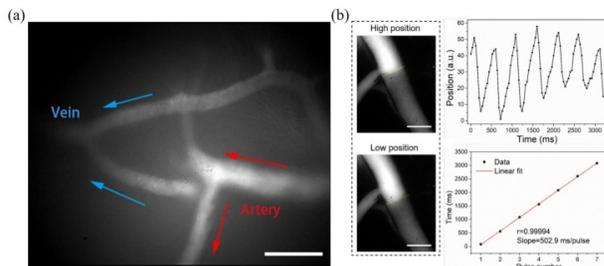


图 17 猕猴动静脉测定和心跳脉冲计算, (a) NIR-II 荧光宽场脑血管显微图像血流方向显示和动静脉测定, 深度 180 μm, 比例尺表示 100 μm, (b) 猕猴脑血管的 NIR-II 荧光宽场显微图像和心脏脉冲周期高斯拟合图, 深度 130 μm, 比例尺表示 100 μm^[74]

Fig. 17 Rhesus arteriovenous measurement and heart pulse calculation, (a) NIR-II fluorescence wide-field cerebrovascular microscopic image of blood flow direction and arteriovenous measurement, depth = 180 μm, scale bar: 100 μm, (b) NIR-II fluorescence wide-field microscopic images of cerebral blood vessels of the rhesus macaque and Gaussian fitting graph of heart pulse period, depth = 130 μm, scale bars: 100 μm^[74]

织切片等的 NIR-II 荧光宽场显微成像, 证明了 NIR-II 荧光宽场显微成像技术的巨大潜力。

4 结语

总体来说, 得益于成像试剂日益丰富, 光学探测器持续提升, 系统成像光路和电路的创新改进, NIR-II 荧光宽场显微成像技术不断在更大的成像深度、更优的信背比、更高的空间分辨率、更快的成像速度上得到创新、改进和突破。首先, 材料技术进步, 碳纳米管、共轭聚合物、半导体量子点、有机纳米颗粒^[76-79]、小分子有机染料和稀土掺杂纳米材料等 NIR-II 荧光探针陆续得到开发和应用。其次, 芯片制备工艺和制冷散热技术的进步使高量子效率、大像元、低噪声、宽动态的探测器得以研制和量产。另外, 成像系统从专业实验室独立搭建改进, 走向校企合作开发普惠商用。NIR-II 荧光宽场显微成像系统有望在各种生物和材料研究实验室推广, 甚至在医学机构和医院临床获得普及和应用。

NIR-II 荧光宽场显微成像系统操作简便,具备在医学研究、临床诊断和手术治疗领域作为活体成像的基础工具的潜力。随着脑血管、肿瘤血管到器官组织越来越丰富的生物应用,啮齿类到灵长类越来越复杂的生物模型得到报导,可以预见的是,更丰富和更复杂的临床应用将会得到开发和实现。

总之,活体成像在成像深度和信背比方面持续精进的需求,推动了 NIR-II 荧光宽场显微活体成像系统和技术的蓬勃发展。成像光路的优化,荧光探针的创新都大大促进了成像性能的提升,但 NIR-II 荧光宽场显微成像技术未来仍需在以下方面进一步提升:(1) NIR-II 荧光宽场显微成像技术受限于背景的离焦信号影响,空间分辨率仍然不够理想,成像效果在同一深度不如共聚焦显微术。为了进一步抑制背景,考虑到 1 450 nm 处存在能有效抑制背景信号的水的强吸收, NIR-II_x 波段具备最佳成像潜力。但是,可用于 NIR-II_x 并且临床适用的成像试剂仍有待开发。(2) 部分荧光试剂存在免疫摄取和生物自清除方面的安全问题,对生物应用造成潜在的长期毒性。这影响了 NIR-II 荧光宽场显微成像进一步临床大规模应用。(3) NIR-II_c 波段适用,同时具备高量子效率的近红外探测器仍有待开发和完善。尤其这几年,随着国际形势变化,科研级别的高端仪器受到美国政府 EAR 出口管制,进口采购越发困难。实现科研级别的 NIR-II 成像探测器、滤光片、激发光源,乃至整个系统设计和后端软件配套的自主可控,是一个系统性亟需攻克的问题。(4) NIR-II 荧光宽场显微成像术可以与其他成像手段^[80](如光声成像等)融合^[81-85],多模态成像利用不同模态的优势以克服单一模态的缺点,从而破译更多的生物信息,提高诊断准确性。可以预见的是,随着更多研究者和临床工作者的加入, NIR-II 荧光宽场显微成像技术将引领脑血管健康评估、癌症早期筛查、离体组织检测等进一步的临床应用。

References

- [1] ZHANG M, YUE J, CUI R, *et al.* Bright quantum dots emitting at ~1,600 nm in the NIR-II_b window for deep tissue fluorescence imaging [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, **115**(26): 6590-5.
- [2] ANTARIS A L, CHEN H, CHENG K, *et al.* A small-molecule dye for NIR-II imaging [J]. *Nature Materials*, 2016, **15**(2): 235-42.
- [3] 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**(1): 1171.
- [4] WELSHER K, LIU Z, SHERLOCK S P, *et al.* A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice [J]. *Nature Nanotechnology*, 2009, **4**(11): 773-80.
- [5] YANG Q, MA Z, WANG H, *et al.* Rational Design of Molecular Fluorophores for Biological Imaging in the NIR-II Window [J]. *Advanced Materials*, 2017, **29**(12): 1605497.
- [6] ZHANG Y, HONG G, ZHANG Y, *et al.* Ag₂S Quantum Dot: A Bright and Biocompatible Fluorescent Nanoprobe in the Second Near-Infrared Window [J]. *ACS Nano*, 2012, **6**(5): 3695-702.
- [7] ZHU S, HERRAIZ S, YUE J, *et al.* 3D NIR-II Molecular Imaging Distinguishes Targeted Organs with High-Performance NIR-II Bioconjugates [J]. *Advanced Materials*, 2018, **30**(13): 1705799.
- [8] WANG W, MA Z, ZHU S, *et al.* Molecular Cancer Imaging in the Second Near-Infrared Window Using a Renal-Excreted NIR-II Fluorophore-Peptide Probe [J]. *Advanced Materials*, 2018, **30**(22): 1800106.
- [9] WAN H, MA H, ZHU S, *et al.* Developing a Bright NIR-II Fluorophore with Fast Renal Excretion and Its Application in Molecular Imaging of Immune Checkpoint PD-L1 [J]. *Advanced Functional Materials*, 2018, **28**(50): 1804956.
- [10] WANG F, MA Z, ZHONG Y, *et al.* In vivo NIR-II structured-illumination light-sheet microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2021, **118**(6): e2023888118.
- [11] YANG Z, FAN X, LIU X, *et al.* Aggregation-induced emission fluorophores based on strong electron-acceptor 2, 2'-(anthracene-9, 10-diylidene) dimalononitrile for biological imaging in the NIR-II window [J]. *Chemical Communications*, 2021, **57**(25): 3099-102.
- [12] YANG Z, FAN X, LI H, *et al.* A Small-Molecule Diketopyrrolopyrrole-Based Dye for in vivo NIR-II_a Fluorescence Bioimaging [J]. *Chemistry - A European Journal*, 2021, **27**(57): 14240-9.
- [13] WANG W, FENG Z, LI B, *et al.* Er³⁺ self-sensitized nanoprobes with enhanced 1525 nm downshifting emission for NIR-II_b in vivo bio-imaging [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2021, **9**(12): 2899-908.
- [14] FAN X, LI Y, FENG Z, *et al.* Nanoprobes-Assisted Multichannel NIR-II Fluorescence Imaging-Guided Resection and Photothermal Ablation of Lymph Nodes [J]. *Advanced Science*, 2021, **8**(9): 2003972.
- [15] YU X, YING Y, FENG Z, *et al.* Aggregation-induced emission dots assisted non-invasive fluorescence hystero-graphy in near-infrared II_b window [J]. *Nano Today*, 2021, **39**: 101235.
- [16] BRUNS O T, BISCHOF T S, HARRIS D K, *et al.* Next-generation in vivo optical imaging with short-wave infrared quantum dots [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2017, **1**(4): 0056.
- [17] ZHENG Z, JIA Z, QU C, *et al.* Biodegradable Silica-Based Nanotheranostics for Precise MRI/NIR-II Fluorescence Imaging and Self-Reinforcing Antitumor Therapy [J]. *Small*, 2021, **17**(10): 2006508.

- [18] ZHANG X, HE S, DING B, *et al.* Cancer cell membrane-coated rare earth doped nanoparticles for tumor surgery navigation in NIR-II imaging window [J]. *Chem Eng J*, 2020, **385**: 123959.
- [19] 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): 1900974.
- [20] LI D, LIU Q, QI Q, *et al.* Gold Nanoclusters for NIR-II Fluorescence Imaging of Bones [J]. *Small*, 2020, **16**(43): 2003851.
- [21] SHOU K, QU C, SUN Y, *et al.* Multifunctional Biomedical Imaging in Physiological and Pathological Conditions Using a NIR-II Probe [J]. *Advanced Functional Materials*, 2017, **27**(23): 1700995.
- [22] LI D, QU C, LIU Q, *et al.* Monitoring the Real-Time Circulatory System-Related Physiological and Pathological Processes In Vivo Using a Multifunctional NIR-II Probe [J]. *Advanced Functional Materials*, 2020, **30**(6): 1906343.
- [23] QU C, XIAO Y, ZHOU H, *et al.* Quaternary Ammonium Salt Based NIR-II Probes for In Vivo Imaging [J]. *Advanced Optical Materials*, 2019, **7**(15): 1900229.
- [24] WANG C, FAN W, ZHANG Z, *et al.* Advanced Nanotechnology Leading the Way to Multimodal Imaging-Guided Precision Surgical Therapy [J]. *Advanced Materials*, 2019, **31**(49): 1904329.
- [25] 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): 4141-51.
- [26] TIAN R, MA H, ZHU S, *et al.* Multiplexed NIR-II Probes for Lymph Node-Invaded Cancer Detection and Imaging-Guided Surgery [J]. *Advanced Materials*, 2020, **32**(11): 1907365.
- [27] TIAN R, ZENG Q, ZHU S, *et al.* Albumin-chaperoned cyanine dye yields superbright NIR-II fluorophore with enhanced pharmacokinetics [J]. *Science advances*, **5**(9): eaaw0672.
- [28] 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): 1802546.
- [29] WANG R, LI X, ZHOU L, *et al.* Epitaxial Seeded Growth of Rare-Earth Nanocrystals with Efficient 800 nm Near-Infrared to 1525 nm Short-Wavelength Infrared Downconversion Photoluminescence for In Vivo Bioimaging [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, **53**(45): 12086-90.
- [30] LEI X, LI R, TU D, *et al.* Intense near-infrared-II luminescence from NaCeF₄:Er/Yb nanoprobes for in vitro bioassay and in vivo bioimaging [J]. *Chemical Science*, 2018, **9**(20): 4682-8.
- [31] LIU L, WANG S, ZHAO B, *et al.* Er³⁺ Sensitized 1530 nm to 1180 nm Second Near-Infrared Window Upconversion Nanocrystals for In Vivo Biosensing [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2018, **57**(25): 7518-22.
- [32] WANG T, WANG S, LIU Z, *et al.* A hybrid erbium(III) - bacteriochlorin near-infrared probe for multiplexed biomedical imaging [J]. *Nature Materials*, 2021, **20**(11): 1571-8.
- [33] FAN Y, WANG P, LU Y, *et al.* Lifetime-engineered NIR-II nanoparticles unlock multiplexed in vivo imaging [J]. *Nature Nanotechnology*, 2018, **13**(10): 941-6.
- [34] YANG H, LI R, ZHANG Y, *et al.* Colloidal Alloyed Quantum Dots with Enhanced Photoluminescence Quantum Yield in the NIR-II Window [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, **143**(6): 2601-7.
- [35] LI C, ZHANG Y, WANG M, *et al.* In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag₂S quantum dots in the NIR-II window [J]. *Biomaterials*, 2014, **35**(1): 393-400.
- [36] LI C, LI F, ZHANG Y, *et al.* Real-Time Monitoring Surface Chemistry-Dependent In Vivo Behaviors of Protein Nanocages via Encapsulating an NIR-II Ag₂S Quantum Dot [J]. *ACS Nano*, 2015, **9**(12): 12255-63.
- [37] YANG H, HUANG H, MA X, *et al.* Au-Doped Ag₂Te Quantum Dots with Bright NIR-IIb Fluorescence for In Situ Monitoring of Angiogenesis and Arteriogenesis in a Hindlimb Ischemic Model [J]. *Advanced Materials*, 2021, **33**(37): 2103953.
- [38] ZHANG Y, ZHANG Y, HONG G, *et al.* Biodistribution, pharmacokinetics and toxicology of Ag₂S near-infrared quantum dots in mice [J]. *Biomaterials*, 2013, **34**(14): 3639-46.
- [39] 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): 3489-93.
- [40] 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*, 2016, **7**(9): 6203-7.
- [41] ZHOU H, ZENG X, LI A, *et al.* Upconversion NIR-II fluorophores for mitochondria-targeted cancer imaging and photothermal therapy [J]. *Nature Communications*, 2020, **11**(1): 6183.
- [42] ZHENG Y, LI Q, WU J, *et al.* All-in-one mitochondria-targeted NIR-II fluorophores for cancer therapy and imaging [J]. *Chemical Science*, 2021, **12**(5): 1843-50.
- [43] LI J, JIANG R, WANG Q, *et al.* Semiconducting polymer nanotheranostics for NIR-II/Photoacoustic imaging-guided photothermal initiated nitric oxide/photothermal therapy [J]. *Biomaterials*, 2019, **217**: 119304.
- [44] ZHANG W, SUN X, HUANG T, *et al.* 1300 nm absorption two-acceptor semiconducting polymer nanoparticles for NIR-II photoacoustic imaging system guided NIR-II photothermal therapy [J]. *Chemical Communications*, 2019, **55**(64): 9487-90.
- [45] TANG Y, LI 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*, 2019, **55**(1): 27-30.
- [46] YIN C, LI X, WANG Y, *et al.* Organic Semiconducting Macromolecular Dyes for NIR-II Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy [J]. *Advanced Functional Materials*, 2021, **31**(37): 2104650.
- [47] WANG Q, DAI Y, XU J, *et al.* All-in-One Phototheranostics: Single Laser Triggers NIR-II Fluorescence/Photoacoustic Imaging Guided Photothermal/Photodynamic/Chemo Combination Therapy [J]. *Advanced Functional*

- Materials*, 2019, **29**(31): 1901480.
- [48] WANG Q, XIA B, XU J, *et al.* Biocompatible small organic molecule phototheranostics for NIR-II fluorescence/photoacoustic imaging and simultaneous photodynamic/photothermal combination therapy [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2019, **3**(4): 650–5.
- [49] HU Z, 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): 259–71.
- [50] MARC P H, DOUGLAS S M. Overview of SWIR detectors, cameras, and applications; proceedings of the ProcSPIE, F, 2008 [C].
- [51] FENG Z, TANG T, WU T, *et al.* Perfecting and extending the near-infrared imaging window [J]. *Light: Science & Applications*, 2021, **10**(1): 197.
- [52] HONG G, DIAO S, CHANG J, *et al.* Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window [J]. *Nature Photonics*, 2014, **8**(9): 723–30.
- [53] LIAO J, YIN Y, YU J, *et al.* Depth-resolved NIR-II fluorescence mesoscope [J]. *Biomed Opt Express*, 2020, **11**(5): 2366–72.
- [54] QI J, SUN C, ZEBIBULA A, *et al.* Real-Time and High-Resolution Bioimaging with Bright Aggregation-Induced Emission Dots in Short-Wave Infrared Region [J]. *Advanced Materials*, 2018, **30**(12): 1706856.
- [55] ALIFU N, RONG M, LIJUN Z, *et al.* A Novel TMTP1-modified Theranostic Nanoplatfor for Targeted in Vivo NIR-II Fluorescence Imaging-guided Chemotherapy of Cervical Cancer [J]. *Research Square*, 2021, <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-818556/v1>.
- [56] NI H, WANG Y, TANG T, *et al.* Quantum Dots assisted In Vivo Two-photon microscopy with NIR-II Emission [J]. *Photonics Research*, 2021, <https://doi.org/10.1364/PRJ.441471>.
- [57] FENG Z, YU X, JIANG M, *et al.* Excretable IR-820 for in vivo NIR-II fluorescence cerebrovascular imaging and photothermal therapy of subcutaneous tumor [J]. *Theranostics*, 2019, **9**: 5706–19.
- [58] YU X, FENG Z, CAI Z, *et al.* Deciphering of cerebrovasculatures via ICG-assisted NIR-II fluorescence microscopy [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2019, **7**(42): 6623–9.
- [59] HE Y, WANG S, YU P, *et al.* NIR-II cell endocytosis-activated fluorescent probes for in vivo high-contrast bioimaging diagnostics [J]. *Chemical Science*, 2021, **12**(31): 10474–82.
- [60] ZHAN Y, LING S, HUANG H, *et al.* Rapid Unperturbed-Tissue Analysis for Intraoperative Cancer Diagnosis Using an Enzyme-Activated NIR-II Nanoprobe [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2021, **60**(5): 2637–42.
- [61] FAN X, XIA Q, ZHANG Y, *et al.* Aggregation-Induced Emission (AIE) Nanoparticles-Assisted NIR-II Fluorescence Imaging-Guided Diagnosis and Surgery for Inflammatory Bowel Disease (IBD) [J]. *Advanced Healthcare Materials*, 2021: 2101043.
- [62] WEN Q, ZHANG Y, LI C, *et al.* NIR-II Fluorescent Self-Assembled Peptide Nanochain for Ultrasensitive Detection of Peritoneal Metastasis [J]. *Angewandte Chemie (International ed in English)*, 2019, **58**(32): 11001–6.
- [63] WU D, LIU S, ZHOU J, *et al.* Organic Dots with Large π -Conjugated Planar for Cholangiography beyond 1500 nm in Rabbits: A Non-Radioactive Strategy [J]. *ACS Nano*, 2021, **15**(3): 5011–22.
- [64] WU D, XUE D, ZHOU J, *et al.* Extrahepatic cholangiography in near-infrared II window with the clinically approved fluorescence agent indocyanine green: a promising imaging technology for intraoperative diagnosis [J]. *Theranostics*, 2020, **10**(8): 3636–51.
- [65] HE M, WU D, ZHANG Y, *et al.* Protein-Enhanced NIR-IIb Emission of Indocyanine Green for Functional Bioimaging [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2020, **3**(12): 9126–34.
- [66] LU H, ZOU Q, GU H, *et al.* Rat brains also have a default mode network [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, **109**(10): 3979.
- [67] SILVIS S M, DE SOUSA D A, FERRO J M, *et al.* Cerebral venous thrombosis [J]. *Nature Reviews Neurology*, 2017, **13**(9): 555–65.
- [68] CAI X, BANDLA A, MAO D, *et al.* Biocompatible Red Fluorescent Organic Nanoparticles with Tunable Size and Aggregation-Induced Emission for Evaluation of Blood - Brain Barrier Damage [J]. *Advanced Materials*, 2016, **28**(39): 8760–5.
- [69] SNYDER J S, CHOE J S, CLIFFORD M A, *et al.* Adult-Born Hippocampal Neurons Are More Numerous, Faster Maturing, and More Involved in Behavior in Rats than in Mice [J]. *The Journal of Neuroscience*, 2009, **29**(46): 14484.
- [70] QI J, ALIFU N, ZEBIBULA A, *et al.* Highly stable and bright AIE dots for NIR-II deciphering of living rats [J]. *Nano Today*, 2020, **34**: 100893.
- [71] FENG Z, BAI S, QI J, *et al.* Biologically Excretable Aggregation-Induced Emission Dots for Visualizing Through the Marmosets Intravitally: Horizons in Future Clinical Nanomedicine [J]. *Advanced Materials*, 2021, **33**(17): 2008123.
- [72] HUBEL D H, WIESEL T N. Ferrier lecture - Functional architecture of macaque monkey visual cortex [J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 1977, **198**(1130): 1–59.
- [73] RAKIC P. Specification of cerebral cortical areas [J]. *Science*, 1988, **241**(4862): 170–6.
- [74] CAI Z, ZHU L, WANG M, *et al.* NIR-II fluorescence microscopic imaging of cortical vasculature in non-human primates [J]. *Theranostics*, 2020, **10**(9): 4265–76.
- [75] SAKADŽIĆ S, MANDEVILLE E T, GAGNON L, *et al.* Large arteriolar component of oxygen delivery implies a safe margin of oxygen supply to cerebral tissue [J]. *Nature Communications*, 2014, **5**(1): 5734.
- [76] WEN Q, ZHANG Y, LI C, *et al.* NIR-II Fluorescent Self-Assembled Peptide Nanochain for Ultrasensitive Detection of Peritoneal Metastasis [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **58**(32): 11001–6.
- [77] YANG T, TANG Y A, LIU L, *et al.* Size-Dependent Ag₂S Nanodots for Second Near-Infrared Fluorescence/Photoacoustics Imaging and Simultaneous Photothermal Therapy [J]. *ACS Nano*, 2017, **11**(2): 1848–57.

- [78] ZHANG M, ZHENG W, LIU Y, *et al.* A New Class of Blue-LED-Excitable NIR-II Luminescent Nanoprobes Based on Lanthanide-Doped CaS Nanoparticles [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, **58** (28) : 9556-60.
- [79] LI J-B, LIU H-W, FU T, *et al.* Recent Progress in Small-Molecule Near-IR Probes for Bioimaging [J]. *Trends in Chemistry*, 2019, **1**(2) : 224-34.
- [80] GUO B, FENG Z, HU D, *et al.* Precise Deciphering of Brain Vasculatures and Microscopic Tumors with Dual NIR-II Fluorescence and Photoacoustic Imaging [J]. *Advanced Materials*, 2019, **31**(30) : 1902504.
- [81] ZHANG Q, ZHOU H, CHEN H, *et al.* Hierarchically Nanostructured Hybrid Platform for Tumor Delineation and Image-Guided Surgery via NIR-II Fluorescence and PET Bimodal Imaging [J]. *Small*, 2019, **15** (45) : 1903382.
- [82] ZANZONICO P B. Benefits and Risks in Medical Imaging [J]. *Health Physics*, 2019, **116**(2) : 135-7.
- [83] GRESPAN L, FIORINI P, COLUCCI G. The Route to Patient Safety in Robotic Surgery [M]. Springer, Cham.
- [84] WEISSLEDER R. A clearer vision for in vivo imaging [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**(4) : 316-7.
- [85] LEI X, ZHEN C, HUA Z, *et al.* Preparation and Preliminary Molecular Imaging Study of ^{124}I in-situ Labeled Organic Melanin Nanoparticles [J]. *ACTA CHIMICA SINICA*, (夏雷,程震,朱华,等. 124 源位标记有机黑色素纳米粒子的制备及初步分子影像研究. *化学学报*) 2019, **77**(2) : 172-8.