

新型稀土近红外荧光探针用于活体多重成像

李红雨, 张洪新

(复旦大学先进材料实验室, 上海 200438)

摘要 提出了激发/发射双维度的荧光编码和活体多通道成像技术, 开发了用于三通道活体成像的稀土近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)荧光探针 α -NaYbF₄: 8%Tm@NaYbF₄@NaYF₄(Yb/Tm), α -NaYbF₄: 2%Er@NaYbF₄@NaYF₄(Yb/Er)和 β -NaErF₄@NaYF₄(Er@Y). 其中, 纳米颗粒 Yb/Tm 在 915 nm 激光激发下, 可发射出 1640 nm 的长波近红外二区(NIR-II-L, 1500~1900 nm)荧光, 在 808 nm 激光激发下几乎无荧光输出; Yb/Er 在 915 nm 激光激发下, 可发射出 1532 nm 的 NIR-II-L 荧光, 在 808 nm 激光激发下几乎无荧光输出; Er@Y 在 808 nm 激光激发下, 可发射出 1525 nm 的 NIR-II-L 荧光, 在 915 nm 激光激发下仅有微弱信号输出. 通过稀土核壳纳米结构的设计实现了荧光强度 216 倍的增强, 在不同功率激发下, 纳米颗粒可保持独立激发和独立发射. 基于上述纳米颗粒的独特光学性质, 实现了三通道信息光学编码和活体高分辨检测, 该方法为光学信息存储和活体多重分析提供了新的工具和思路.

关键词 稀土荧光探针; 近红外二区; 活体成像; 多重成像

中图分类号 O657

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240181

Novel Rare Earth Near-infrared Fluorescent Probes for *in vivo* Multiplexed Imaging

LI Hongyu, ZHANG Hongxin*

(Laboratory of Advanced Materials, Fudan University, Shanghai 200438, China)

Abstract Fluorescence encoding and *in vivo* multiplexed imaging with dual-dimensions of excitation and emission are proposed. A series of second near-infrared (NIR-II, 1000—1700 nm) fluorescent probes [α -NaYbF₄: 8%Tm@NaYbF₄@NaYF₄(Yb/Tm), α -NaYbF₄: 2%Er@NaYbF₄@NaYF₄(Yb/Er) and β -NaErF₄@NaYF₄(Er@Y)] were developed for triple-channel *in vivo* imaging. Among them, Yb/Tm nanoparticles can emit 1640 nm long-wave second near-infrared fluorescence (NIR-II-L, 1500—1900 nm) under 915 nm laser excitation while no fluorescence signal can be detected under 808 nm excitation. Yb/Er can emit NIR-II-L fluorescence at 1532 nm under excitation of 915 nm laser while no fluorescence signal can be detected under 808 nm excitation. In contrast, Er@Y nanoparticles excited by an 808 nm laser can emit NIR-II-L fluorescence at 1525 nm, while a very weak signal can be detected under the excitation of 915 nm. The design of rare earth core-shell nanostructures successfully enhances the fluorescence intensity by 216 times. Under different power density excitations, the nanoparticles still maintain excellent optical properties of independent excitation/emission. Based on the unique optical properties of these nanoparticles, optical encoding and *in vivo* high-resolution detection with three channels have been achieved, providing new tools and solutions for optical information storage and *in vivo* multiplexed analysis.

Keywords Rare earth fluorescent probe; Second near-infrared window; *In vivo* imaging; Multiplexed imaging

生物荧光成像由于具有响应速度快和灵敏度高优点, 已经成为生命科学与医学研究的必备工

收稿日期: 2024-04-10. 网络首发日期: 2024-08-05.

联系人简介: 张洪新, 男, 博士, 研究员, 主要从事稀土近红外荧光探针及其在活体检测方面的研究. E-mail: zhanghx@fudan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22104017)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22104017).

具^[1-3]。2008年和2014年的诺贝尔化学奖分别授予了绿色荧光蛋白和超分辨显微成像技术的研究者,这两个领域与生物荧光成像紧密相关^[4-6]。随着研究的不断深入,科研工作者发现对生物进行体外细胞及离体组织层面的研究已无法满足对生命科学领域的探索需要^[7]。为了得到更准确的早期生理病理信息,活体成像成为了研究热点。

在活体光学成像技术中,荧光探针的激发与发射光子在穿透生物组织时,通常存在多种光物理过程,包括其与表面的镜面反射与漫反射、进入组织受到的散射和吸收作用以及生物组织的自发荧光^[8]。上述相互作用均导致实际采集信号与理论信号相差较大。随着研究的不断深入,研究者发现荧光探针发射波长越长,生物组织的散射越小,成像分辨率越高;荧光探针激发波长越长,生物组织的自发荧光越小,成像信噪比越高^[9]。2009年,Dai等^[10]报道了1200 nm发射的单壁碳纳米管可实现高分辨的肿瘤血管成像,长波长发射荧光探针成为了研究热点。随后,Nie等^[11]将1000~1700 nm波段的成像窗口定义为第二近红外活体成像窗口(NIR-II)。

随着近红外二区荧光探针和活体成像技术的不断发展,实现了高分辨活体多重成像技术用于检测活体内多个通道的形态结构^[12]。因此,NIR-II活体荧光多重成像技术在生物学和基础医学研究领域受到了广泛关注^[13,14]。目前,用于活体多重检测的常见近红外二区探针包括有机小分子染料和镧系(Ln)稀土纳米颗粒等^[2,15]。2020年,Sletten等^[15]开发和改造了系列多甲川染料,其基于激发的独立性可实现活体近红外二区多通道检测,但该染料发射波长较短(< 1100 nm),使活体成像分辨率受限。2023年,Yang等^[14]报道了发射主峰接近1300 nm的四苯环化黄嘌呤染料,结合已报道的染料可实现活体多重成像,使分辨率进一步提升。由散射曲线可知,1300 nm处存在一定的光子散射,成像分辨率仍有上升空间^[9]。由于稀土纳米颗粒具有发射峰窄、荧光寿命长和斯托克斯位移大等光学性质,对其研究尤为广泛^[16,17]。然而,由于稀土能级较固定,稀土纳米颗粒的发射峰位置难以调控^[8]。目前仅有Tm(1640 nm)和Er(1525 nm)的NIR-II-L探针能够满足高分辨活体成像的需求^[13,18]。较少的荧光发射峰极大地限制了基于发射峰区分的活体成像检测通道。因此,为了实现高分辨多通道活体检测,亟需创制新的多重成像技术和荧光探针。

针对上述问题,本文提出了结合激发/发射双维度的荧光编码和活体多通道成像的方法。设计了在915 nm激光激发下1532和1640 nm发射的NIR-II-L荧光探针,二者可通过滤光片区分检测通道;以及在808 nm激光激发下仅有1525 nm发射的NIR-II-L荧光探针。通过核壳结构的设计,稀土荧光亮度可增强216倍,实现了高信噪比的光学成像。通过激发/发射双维度通道的组合实现了三通道的光学检测,并实现了体外三通道光学编码解析。在活体中,实现了皮下、血管和原位肿瘤的高分辨率多重成像,为活体多种生理过程的监控与检测提供了新的工具与思路。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

氯化钇($\text{YCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化镱($\text{YbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化铥($\text{TmCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氯化铒($\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、氧化铒(Er_2O_3)、氧化镱(Yb_2O_3)、氧化钇(Y_2O_3)和氧化铥(Tm_2O_3)均为分析纯;油酸(OA,纯度90%)、十八烯(ODE,纯度90%)、油胺(OM,纯度90%)和磷脂盐缓冲液(PBS, $\text{pH}=7.2\sim 7.6$),美国Sigma-Aldrich公司;三氟乙酸(TFA,纯度90%)、环己烷(纯度99.7%)、无水乙醇(分析纯)、无水甲醇(分析纯)、氢氧化钠(NaOH,分析纯)和氟化铵(NH_4F ,分析纯),国药集团化学试剂有限公司;磷脂-聚乙二醇(2000)-甲氧基(DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃,纯度98%),上海芃硕生物有限公司;Kit-8细胞计数试剂盒(CCK-8),美国APEX-BIO公司;BALB/c雌性小鼠(6~8周龄,平均质量约20 g),上海杰思捷实验室动物有限公司。

GrandARM300F型透射电子显微镜(TEM),日本电子株式会社;FLS980型红外光谱仪和FLS1000型红外光谱仪,英国爱丁堡仪器公司;808和915 nm连续半导体激光器,长春新产业光电技术有限公司;NIR-II-ST型近红外二区小动物活体成像系统,上海数联生物科技有限公司;NIRvana HS型近红外面阵相机,美国普林斯顿仪器;KDC-40型高速离心机,美国瓦里安公司。

1.2 实验过程

1.2.1 Ln-OA 前驱体的制备 在 100 mL 圆底三口烧瓶中加入 $\text{LnCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 mmol)、油酸 (20 mL) 和十八烯 (30 mL), 在真空 (1 Pa) 条件下搅拌, 加热至 140 °C 并保持 30 min, 至固体溶解, 形成充分脱水脱氧的浅黄色澄清透明油状液体, 自然冷却至室温, 得到 Ln-OA 前驱体 (100 mmol/L)。

1.2.2 Ln-TFA 前驱体的制备 以三氟乙酸钇 (Y-TFA) 的合成为例. 称取适量 Y_2O_3 置于三口圆底烧瓶中, 加入去离子水 (摩尔数为 Y_2O_3 的 3 倍), 常温下缓慢搅拌 (300 r/min); 缓慢滴加三氟乙酸 (摩尔数为 Y_2O_3 的 1.5 倍), 将温度计套管放入热电偶以监控混合体系温度, 用直型冷凝管使体系冷凝回流, 剩余瓶口用橡胶塞密封, 将体系加热至 70 °C, 缓慢搅拌. 待 Y_2O_3 完全溶解, 混合体系澄清透明后, 进行热过滤, 将滤液收集于 100 mL 烧杯中. 通过灼烧法, 将滤液加热至 110 °C 并充分搅拌, 使溶液完全挥发, 得到 Y-TFA 结晶. 值得注意的是, 加热至出现大量固体时, 应停止加热, 利用余热将剩余水分蒸干, 同时用玻璃棒快速搅拌使蒸发充分, 最后获得白色粉末状 Y-TFA 结晶. 三氟乙酸铽 (Yb-TFA)、三氟乙酸铒 (Er-TFA) 和三氟乙酸铥 (Tm-TFA) 均按照上述方法制备.

1.2.3 β - NaErF_4 纳米颗粒的制备 β - NaErF_4 纳米颗粒参照文献 [19] 报道的热分解法制备. 在 100 mL 圆底三口烧瓶中加入 $\text{ErCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol)、油酸 (16 mL) 和十八烯 (24 mL), 放入高温磁子, 将温度计套管放入热电偶以监控混合体系温度, 将直型冷凝管辅助体系接入史兰克线, 剩余瓶口以橡胶塞密封. 在真空 (0.01 mbar) 条件下搅拌, 加热至 140 °C 并保持 30 min 至固体溶解, 形成充分脱水脱氧的浅黄色澄清透明油状液体, 自然冷却至低于 50 °C. 快速加入 8 mL 溶有 NaOH (2.5 mmol) 和 NH_4F (4.0 mmol) 的甲醇溶液, 将体系缓慢加热至 50 °C 并保持 1 h. 结束保温后, 在真空 (1 Pa) 条件下搅拌, 加热至 140 °C 并保持 30 min, 充分除去体系中所有低沸点溶剂及氧气. 将该体系切换至高纯氩气保护状态, 并以 10 °C/min 的速率升温至 290 °C 并保持 100 min. 自然冷却至室温后, 加入 5 mL 无水乙醇使产物析出, 离心分离 (4500 r/min, 25 °C, 5 min), 用无水乙醇/环己烷混合溶液 (体积比 $\geq 2:1$) 洗涤产物 2 次, 将其分散于环己烷 (100 mmol/L) 中, 该纳米晶可作为下一步外延生长的“种子”备用.

1.2.4 β - NaErF_4 @ NaYF_4 (Er@Y) 壳结构纳米颗粒的制备 参照前文 [20,21] 报道的注射法制备 Er@Y 核壳结构纳米颗粒. 在 100 mL 圆底三口烧瓶中加入 1.2.2 节的纳米晶-环己烷溶液 (2 mL)、油酸和十八烯, 按照上述方法搭建装置, 在真空 (0.01 mbar) 条件下搅拌, 加热至 100 °C 并保持 15 min, 去除体系中所有低沸点溶剂及氧气, 将该体系切换至高纯氩气保护状态, 并以 10 °C/min 的速率升温至 280 °C. 以 3 mL/h 的注射速率向该体系中加入前驱体 ($V_{\text{Y-OA}}:V_{\text{Na-OA}}=2:1$), 通过滴加不同物质的量的前驱体调控 NaYF_4 壳层的厚度, 滴毕, 在 280 °C 保持 30 min. 自然冷却至室温后, 加入 5 mL 无水乙醇使产物析出, 将沉淀离心分离 (4500 r/min, 25 °C, 5 min), 用无水乙醇/环己烷混合溶液 (体积比 $\geq 2:1$) 洗涤产物 2 次, 并将其分散于环己烷 (100 mmol/L) 中. 值得注意的是, 溶剂油酸和十八烯的体积对颗粒不同晶面的生长速率具有显著影响, 从而改变材料的形貌状态, 因此需对其进行适当调整, 可获得具有理想形貌的材料.

1.2.5 α - NaYbF_4 :Ln 纳米颗粒的制备 α 相材料参照前文 [21] 报道的一锅法进行制备. 在 100 mL 圆底三口烧瓶中加入 Ln-TFA (1 mmol, Ln = Er/Tm)、Na-TFA (1 mmol, 136.01 mg)、油酸 (5 mL)、油胺 (5 mL) 和十八烯 (10 mL), 放入高温磁子, 将温度计套管放入热电偶以监控混合体系温度, 将直型冷凝管辅助体系接入史兰克线, 剩余瓶口以橡胶塞密封. 在真空 (1 Pa) 条件下搅拌, 加热至 100 °C 并保持 15 min, 至固体溶解, 形成充分脱水脱氧的浅黄色澄清透明油状液体. 将该体系切换至高纯氩气保护状态, 以 20 °C/min 的速率升温至 310 °C 并保持 15 min. 自然冷却至室温后, 加入 5 mL 无水乙醇使产物析出, 将沉淀离心分离 (4500 r/min, 25 °C, 5 min), 用无水乙醇/环己烷混合溶液 (体积比 $\geq 2:1$) 洗涤产物 2 次, 并将其分散于 10 mL 环己烷 (100 mmol/L) 中作为外延生长的“种子”备用.

1.2.6 α - NaYbF_4 :Ln@ NaYbF_4 核壳结构纳米颗粒的制备 按照设计的组分比例, 配制了适合的 Yb-TFA 甲醇溶液. 将 Yb-TFA 甲醇溶液、适量油酸和十八烯以及 1.2.5 节中作为“种子”的环己烷分散 α - NaYbF_4 :Ln 纳米颗粒溶液加入至 100 mL 圆底三口烧瓶中, 按照上述方式搭建装置, 在真空 (1 Pa) 条

件下搅拌, 加热至 100 °C 并保持 15 min, 去除体系中所有低沸点溶剂及氧气, 使体系呈澄清透明的浅黄色油状液体. 将该体系切换至高纯氩气保护状态, 以 10 °C/min 的速率升温至 290 °C 并保持 60 min. 自然冷却至室温后, 加入 5 mL 无水乙醇使产物从体系中析出, 将沉淀离心分离 (4500 r/min, 25 °C, 5 min), 用无水乙醇/环己烷混合溶液 (体积比 $\geq 2:1$) 洗涤产物 2 次, 并将其分散于环己烷 (100 mmol/L) 中, 该纳米晶将作为下一步外延生长的“种子”备用.

1.2.7 α -NaYbF₄:Ln@NaYbF₄@NaYF₄ 核壳结构纳米颗粒的制备 α -NaYbF₄:Ln@NaYbF₄@NaYF₄ 多层核壳结构纳米颗粒与上述核壳结构纳米颗粒的制备方法基本相同, 仅需将 Ln-TFA 甲醇溶液替换为适量的 Y-TFA 甲醇溶液, 通过调节 Y-TFA 的加入量可实现对该层壳层厚度的调控. 值得注意的是, 在 Y-TFA 加入量增大时, 应适当延长反应体系在保持 290 °C 的时间, 以获得更好的外延生长效果.

1.2.8 纳米颗粒绝对量子产率的测试 3 种稀土纳米颗粒在环己烷溶液中的绝对量子产率可通过集成红外积分球的荧光光谱仪测试得出. 其原理是通过激发/发射光子在积分球整个表面多次反复的反射/散射等过程, 测出平均光子强度; 再根据有无纳米颗粒时激发和发射光子的强度变化计算出绝对量子产率. 激发光源分别为 808 和 915 nm 的半导体激光器. 量子产率采用标准 Fluoracle 软件计算 (详见 <https://www.edinst.com/products/fluoracle-software-photoluminescence-control-and-analysis/>).

1.2.9 纳米颗粒转水相表面修饰 上述稀土纳米颗粒均保存于环己烷中, 无法直接用于生物体, 因此需要将其通过表面磷脂修饰转至水相中^[22]. 具体操作步骤如下: 量取 1 mL 纳米颗粒环己烷分散液 (100 mmol/L), 加入 1 mL 无水乙醇, 离心 (10000 r/min, 5 min) 使其完全沉降, 去除上层清液后, 用 1 mL 三氯甲烷使其分散. 将该分散液和适量磷脂-聚乙二醇 (2000)-甲氧基 (DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃) 的三氯甲烷分散液 (25 mg/mL) 置于茄型瓶中, 充分混合后, 旋转蒸发去除三氯甲烷, 在瓶底形成均匀的 DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃-纳米晶膜. 将该体系加热至 85 °C, 并利用相同温度的去离子水 (10 mL) 进行水化处理, 即获得在水中均匀稳定分散的稀土纳米造影剂. 为了实现更好的成像效果, 通过高速离心 (10000 r/min, 15 min) 对其进行浓缩处理, 最终体积为 1 mL (100 mmol/L).

1.2.10 细胞毒性研究 使用 Kit-8 细胞计数试剂盒 (CCK-8) 测试了稀土纳米颗粒对 HEK-293 细胞的毒性. 首先, 将约 10⁴ 个细胞分别孵育在 96 孔板中, 随后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次, 将不同浓度的水相稀土纳米颗粒孵育在对应孔板中, 并保持不同时间. 该试剂盒中的 WST-8 被活细胞中的脱氢酶还原, 得到黄色产物. 通过微孔板读取器 (Bio-Tek, SYNERGY2), 采用量热法评估质量. 基于在 450 nm 处的吸光度值进行统计分析. 计算细胞生长活力的公式: $\text{Cell viability (\%)} = (A_{\text{exp}}/A_{\text{control}}) \times 100$ (A_{exp} 为处理组的平均吸光度值, A_{control} 为对照组的平均吸收值).

1.2.11 成像实验的前期准备 体外编码实验是将探针以一定图案规律滴入至透明的 96 孔板中, 不同的探针组合成不同的荧光图案. 探针环己烷溶液的浓度为 0.01 mol/L, 每个孔中滴入约 50 μ L 对应的探针. 在文字“如意”图案制备中, 通过加入无水乙醇将环己烷相的纳米探针沉淀并离心分离, 再溶解于等体积的氯仿中. 将 1 mL 100 mmol/L 氯仿溶液与 10 mL 聚二甲基硅氧烷 (PDMS, 道康宁 SYLGARD 184) 搅拌混合均匀, 加入固化剂 (与 PDMS 质量比为 1:10), 搅拌均匀后加入至模具中, 将模具置于 80 °C 真空烘箱中 12 h, 样品固化后可用于成像. 活体成像实验中, 将脱毛后的 BALB/c 雌性小鼠腹部朝上固定在黑色纸板上 (纸板上黏有红外吸收型的黑色胶带, Thorlabs, 型号: T743-2.0), 随后将 Yb/Er 和 Er@Y 探针分别注射于小鼠皮下和肿瘤部位, 探针剂量为 50 μ L 0.0025 mmol. Yb/Tm 探针通过尾静脉注射方式打入小鼠血管中, 探针剂量为 200 μ L 0.01 mmol.

2 结果与讨论

2.1 稀土纳米颗粒的形貌表征

利用 TEM 对纳米颗粒的尺寸形貌进行了表征. 由 TEM 照片可见, 合成的 β -NaErF₄, α -NaYbF₄:2%Er 和 α -NaYbF₄:8%Tm 稀土纳米颗粒粒径均一, 形貌规整 (图 1). 后续进行了多次核壳结构外延生长, 得到的 β -NaErF₄@NaYF₄, α -NaYbF₄:Ln@NaYbF₄ 和 α -NaYbF₄:Ln@NaYbF₄@NaYF₄ 纳米颗粒均呈

均一粒径且形貌规整(见本文支持信息中图S1)。不同壳层的包覆使纳米颗粒的尺寸增大,说明了外延生长包覆的有效性,同时可观察到较清晰的核壳结构,确保了后续光谱测试的准确性。采用HAADF-STEM对纳米颗粒的核壳结构和元素分布进行了表征,结果显示,颗粒具有较好的核壳结构和对应的元素(见本文支持信息中图S2)。对材料的晶相进行了表征,并与JCPDS标准卡进行了比对,结果表明,Er@Y为标准的六方相,Yb/Tm和Yb/Er为立方相结构(见本文支持信息中图S3)。

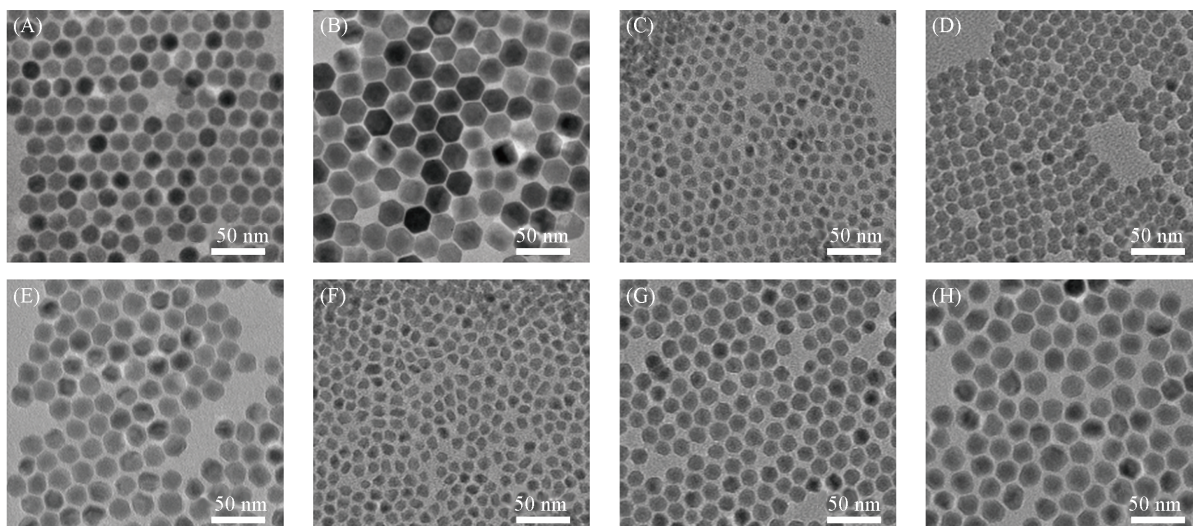


Fig. 1 TEM images of β - NaErF_4 (A), β - NaErF_4 @ NaYF_4 (B), α - NaYbF_4 :8%Tm(C), α - NaYbF_4 :8%Tm@ NaYbF_4 (D), α - NaYbF_4 :8%Tm@ NaYbF_4 @ NaYF_4 (E), α - NaYbF_4 :2%Er(F), α - NaYbF_4 :2%Er@ NaYbF_4 (G) and α - NaYbF_4 :2%Er@ NaYbF_4 @ NaYF_4 (H) nanoparticles

2.2 稀土纳米颗粒的光谱学表征

为了得到稀土 Er^{3+} 纳米颗粒独立激发发射的 1525 nm 荧光,测试了 Er^{3+} 和 Yb^{3+} 离子的吸收光谱。如图 2(A)所示, Er^{3+} 在 800 和 980 nm 处均有明显的光子吸收, Yb^{3+} 离子在 900~1000 nm 处具有较强的吸收。因此,利用 Yb^{3+} 吸收光谱范围较宽的性质,选择 915 nm 激光作为激发源,以 Yb^{3+} 作为敏化离子激

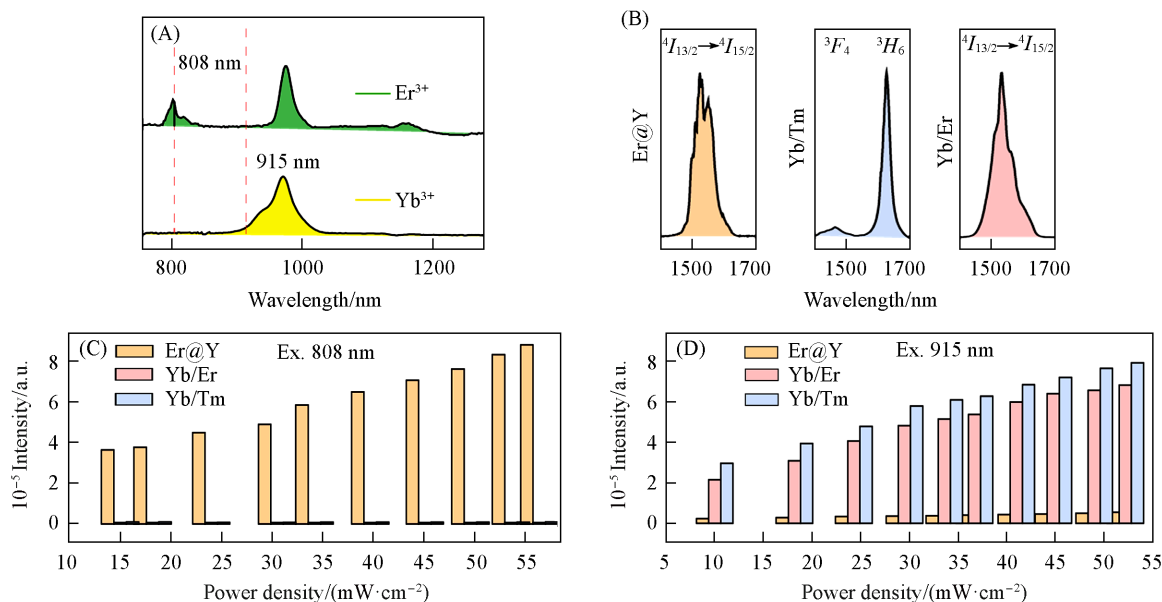


Fig. 2 Absorption spectra of Er^{3+} and Yb^{3+} ions from 700 nm to 1300 nm(A), emission spectra of Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoparticles excited by 808 nm and 915 nm lasers(B), emission intensity of Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoparticles excited by 808 nm(C) and 915 nm(D) laser with increased power density

活 Er^{3+} 在 1525 nm 处的荧光 [$\alpha\text{-NaYbF}_4:2\%\text{Er@NaYbF}_4\text{@NaYF}_4(\text{Yb/Er})$]. 由于 Er^{3+} 对 915 nm 光子的吸收能力较弱, 在 915 nm 光激发下, 纯 Er^{3+} 掺杂纳米体系 (Er@Y) 的 1525 nm 荧光非常弱. 同时, 在 808 nm 光激发下, 由于 Er@Y 纳米颗粒中 Er^{3+} 含量较高, 其 1525 nm 荧光较强, 而 Yb/Er 纳米颗粒对 808 nm 光子吸收较弱, 因此该颗粒几乎无荧光. 同样的原理适用于 $\alpha\text{-NaYbF}_4:8\%\text{Tm@NaYbF}_4\text{@NaYF}_4(\text{Yb/Tm})$ 纳米颗粒. 实验中, 3 种颗粒中发光离子的浓度均采用前文^[13]报道的最佳浓度以保证荧光强度最优.

为了证实上述方案的可行性, 分别测试了 3 种纳米颗粒在 808 和 915 nm 激光激发下的荧光光谱. 如图 2(B) 所示, 在 808 nm 激光激发下, Er@Y 纳米颗粒发射出了较强的 1525 nm 荧光; 在 915 nm 激光激发下, Yb/Tm 和 Yb/Er 分别发射出了较强的 1640 和 1532 nm 荧光. Yb^{3+} 敏化体系选用 α 晶型是为了得到更强的稀土下转换荧光^[23]. 在不同晶型下, Er^{3+} 的下转换荧光发射峰位置略有偏差^[23,24]. 此外, Er@Y 在 915 nm 激光以及 Yb/Tm 和 Yb/Er 在 808 nm 激光激发下的荧光光谱均显示出较弱甚至消失的荧光发射, 表明设计的纳米荧光探针具有无串扰的独立激发/发射性质, 可初步满足激发/发射双维度的荧光编码.

为了验证上述 Er@Y , Yb/Tm 和 Yb/Er 纳米颗粒光学性质的可靠性, 测试了 808 和 915 nm 不同功率密度激发下的荧光光谱 (见本文支持信息中图 S4 和图 S5). 当 808 nm 激光功率密度由 10.0 mW/cm^2 上升至 52.2 mW/cm^2 时, Er@Y 在 1525 nm 处的荧光强度高于 Yb/Tm 和 Yb/Er 分别在 1640 和 1532 nm 处的荧光强度 [图 2(C)]. 当 915 nm 激光功率密度由 15.0 mW/cm^2 上升至 56.4 mW/cm^2 时, Yb/Tm 和 Yb/Er 分别在 1640 和 1532 nm 处的荧光强度高于 Er@Y 在 1525 nm 处的荧光强度 [图 2(D)]. 上述结果表明, Er@Y , Yb/Tm 和 Yb/Er 纳米颗粒的荧光在 808 nm 和 915 nm 激光激发下可被区分.

荧光强度是影响光学成像信噪比的关键因素, 为了使 3 种纳米颗粒满足活体生物应用, 通过制备核壳结构以提高稀土下转换荧光的强度^[25]. 对于 $\beta\text{-NaErF}_4$ 纳米颗粒, 由于 Er^{3+} 离子含量高, 表面猝灭严重, 因此通过表面惰性层包覆可显著地阻止能量传递至颗粒表面缺陷/羟基等猝灭中心^[26]. 基于此, 在 $\beta\text{-NaErF}_4$ 纳米颗粒表面包裹 NaYF_4 惰性层, 其 1525 nm 处荧光增强约 42.3 倍 (见本文支持信息中图 S6), 通过近红外积分球测得的绝对荧光量子产率约 21.65% (见本文支持信息中图 S7). 对于 Yb^{3+} 敏化体系, 采用 915 nm 激光激发并不是 Yb^{3+} 的最佳吸收位置, 因此在 $\text{NaYbF}_4:\text{Ln}$ 表面包覆一层 Yb^{3+} 离子以增强纳米颗粒对 915 nm 激光激发光的吸收能力. 在此基础上包覆一层惰性层以降低纳米颗粒表面猝灭效应. 基于此结构设计, 其在 1532 和 1640 nm 处的荧光分别增强了 15.6 和 216 倍 (见本文支持信息中图 S6), 绝对荧光量子产率分别为 25.81% 和 17.33% (见本文支持信息中图 S8 和图 S9). 其中, 不同离子增强倍数的差异源于发光离子浓度和离子类型的不同^[27,28]. 上述策略不仅增强了稀土下转换荧光强度, 还为高亮度稀土纳米颗粒的开发和设计提供了新思路.

2.3 纳米颗粒发光机理的探讨

在稀土发光过程中, 荧光强度 I 与激光功率 P 的 n 次方成正比 ($I \propto P^n$), 其中 n 为发射一个荧光光子所需的激发光光子数量^[29]. 在对数坐标下, 斜率为荧光发射过程所需的光子数 n . 因此, 为了探明 Er@Y , Yb/Tm 和 Yb/Er 颗粒的荧光发射机理, 首先测试了 3 种纳米颗粒在对应激光激发下的功率依赖关系. 如图 3(A) 所示, Er@Y , Yb/Tm 和 Yb/Er 颗粒对应曲线的斜率分别为 0.84, 0.83 和 0.78, 均接近 1, 说明 3 种颗粒的激发光均为单光子过程. 其中, 斜率不完全等于 1 是由于稀土离子间存在交叉弛豫等能量猝灭过程所致^[30]. 根据 n 的数值和稀土的能级结构初步判断出 3 种颗粒的能量传递过程. 对于 Er@Y [图 3(B)], Er^{3+} 离子吸收了 808 nm 光子, 通过声子辅助的无辐射弛豫的形式, 电子从 $^4I_{9/2}$ 跃迁至 $^4I_{13/2}$ 能级, 最后电子从 $^4I_{13/2}$ 跃迁至 $^4I_{15/2}$ 能级并辐射出 1525 nm 的光子^[26]. 对于 Yb/Tm [图 3(C)], Yb^{3+} 离子吸收了 915 nm 光子, 通过声子辅助的形式将能量传递至相邻的 Tm^{3+} 离子, 激活 Tm^{3+} 离子 3H_5 能级, 3H_5 能级的电子通过无辐射弛豫的形式跃迁至 3F_4 能级, 最后电子从 3F_4 跃迁到 3H_6 能级并辐射出 1640 nm 的光子^[13]. 对于 Yb/Er , Yb^{3+} 离子吸收了 915 nm 光子, 通过声子辅助的形式将能量传递至相邻的 Er^{3+} 离子, 激活 Er^{3+} 离子 $^4I_{11/2}$ 能级, $^4I_{11/2}$ 能级的电子通过无辐射弛豫的形式跃迁至 $^4I_{13/2}$ 能级, 最后电子从 $^4I_{13/2}$ 跃迁至 $^4I_{15/2}$ 能级并辐射出 1532 nm 的光子^[21].

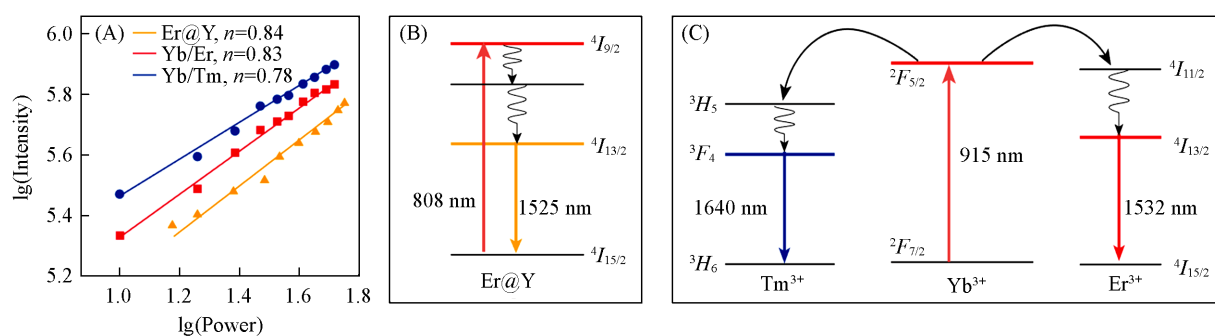


Fig. 3 Dependence of emission intensities of Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er on laser power density(A), the energy transfer pathway of Er@Y nanoparticles excited 808 nm laser(B) and the energy transfer pathway of Yb/Tm and Yb/Er nanoparticles excited 915 nm laser(C)

2.4 纳米颗粒体外编码研究

基于3种稀土纳米颗粒优异的独立激发和独立发射的光谱性质,对其三通道成像效果进行了验证.利用自主搭建的近红外二区荧光成像系统^[31],将3种纳米颗粒的环己烷溶液(100 mmol/L)分别置于2 mL离心管中进行实验.荧光成像结果如图4(A)所示,在915 nm激光激发和1600 nm长通滤光片下,探测器仅检测到Yb/Tm通道下的1640 nm荧光;在915 nm激光激发和1600 nm短通滤光片下,探测器仅检测到Yb/Er通道下的1532 nm荧光;在808 nm激光激发和1400 nm长通滤光片下,探测器仅检测到Er@Y通道下的1525 nm荧光.上述结果表明,设计的3种纳米颗粒实现了三通道的独立荧光检测.对3组强度分布数据进行提取[图4(B)],可见每个通道均为相对纯净的荧光发射.Yb/Tm通道的荧光强度占比约为93%(见本文支持信息中表S1);Yb/Er和Er@Y通道的荧光强度占比均大于99%(见本文支持信息中表S1),说明3个通道的荧光发射相对独立且无串扰,适用于多通道光学成像.其中,Yb/Tm通道荧光强度占比略低的原因是,在915 nm激光激发下,由于Er³⁺的发射峰较宽.积分面积较大,1600 nm长通滤光片难以完全滤掉Er³⁺的1532 nm的荧光所致[图4(B)中最左侧图].尽管如此,从成像角度看,Yb/Tm, Yb/Er和Er@Y纳米颗粒可用于光学多重成像检测.

为了验证3种纳米颗粒三通道独立成像的稳定性,改变激光器的输出功率,将激光器的功率密度从5 mW/cm²增加至40 mW/cm²,采集了10个功率位置30组荧光照片(见本文支持信息中图S10).由此可见,Yb/Tm, Yb/Er和Er@Y的3个荧光通道完全保持独立性,通道间无荧光串扰,说明3种纳米颗粒三通道成像具有优异的检测稳定性.值得注意的是,由于纳米颗粒包覆了惰性保护层,荧光亮度较强,仅需100 mW/cm²以下的功率密度即可满足高信噪比(≥1000)的成像效果(见本文支持信息中表S1).上述结果进一步说明,设计的独立激发和独立发射的稀土荧光纳米材料有望满足近红外二区多重编码的需求.

将3种稀土荧光纳米材料做成特定的编码图案,利用激发和发射双维度解析的策略,进行了三通道解码成像性能的评估.如图4(C)所示,当808和915 nm激光器均工作且滤光片为1400 nm长通时,无法获得3个通道的独立字母信息.当仅打开915 nm激光器并使用1600 nm长通滤光片时,可准确解析出字母“F”信息;将滤光片切换为1600 nm短通,可解析出字母“D”信息.当仅打开808 nm激光器时,可解析出字母“U”信息.通过3个通道的图像解析,将复旦大学的英文首字母显示出来.该解析方法具有较高的通用性,基于此还可将“□”、“√”和“×”等重合图形的编码信息独立解析出来(见本文支持信息中图S11).此外,上述探针还可用于文字信息加密.如图4(D)所示,仅有3个荧光编码通道的组合是最终的编码信息(如意),其中,任意1个通道或2个通道均无法解析出正确的文字信息(见本文支持信息中图S12).上述实验结果表明,提出的激发和发射双维度荧光编码技术和开发的对应稀土荧光探针实现了编码数量信息存储安全性的提高,设计出更多的对应探针将会满足高通量编码的需求.

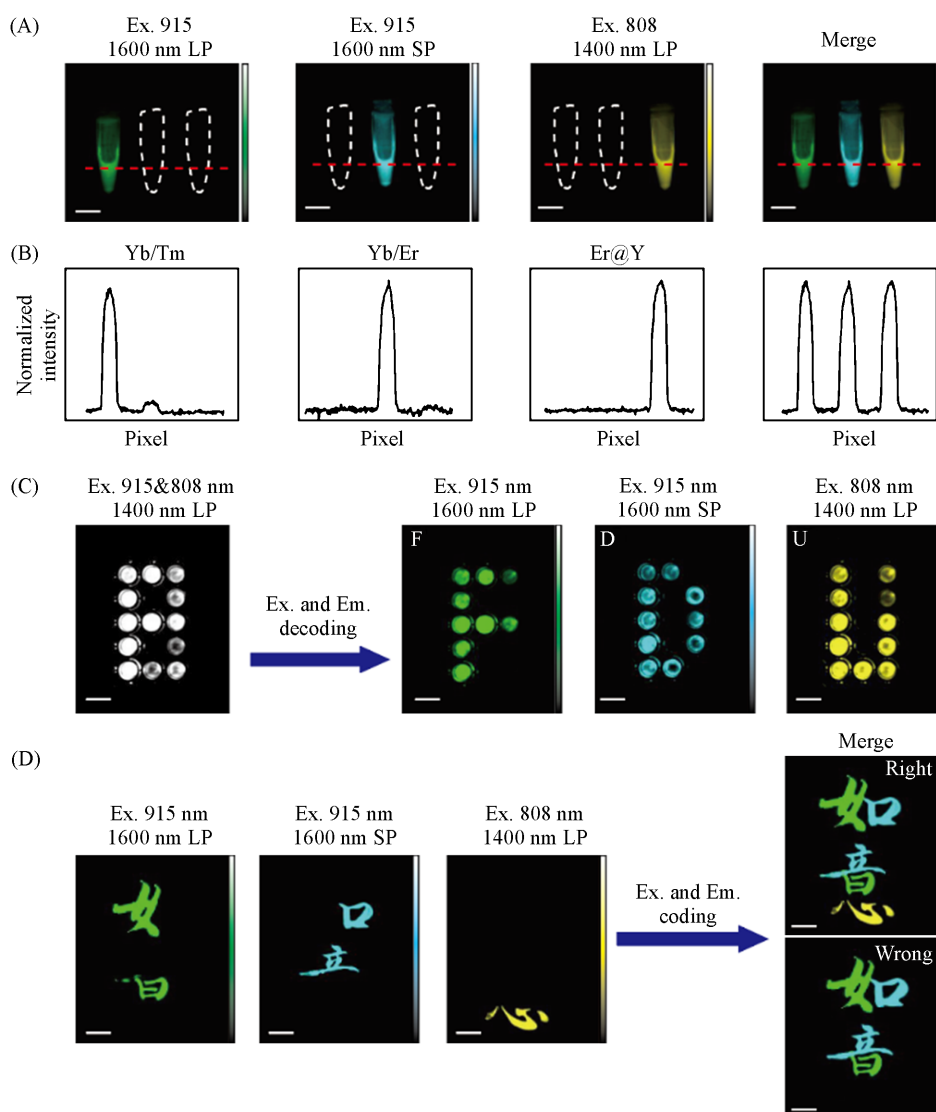


Fig. 4 Independent NIR-II luminescence imaging of Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er samples(A), the profile intensities of the red dashed lines in (A)(B), decoding results of the encoded characters(F, D and U) by Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoparticles(C) and encrypted luminescence images of the characters by employing Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoparticles(D)

Scale bar: 8 mm.

2.5 纳米探针的活体多重成像研究

首先,测试了稀土纳米颗粒的体外细胞毒性.将不同浓度的纳米颗粒与 HEK-293 细胞共孵育 24 h,结果显示,该纳米颗粒具有较低的细胞毒性^[32](见本文支持信息中图 S13).其次,测试了纳米材料在 1×PBS 缓冲液中的稳定性,14 d 内的稀土荧光光谱强度稳定,说明纳米颗粒可长时间分散于缓冲液中而不发生团聚(见本文支持信息中图 S14).上述结果表明,稀土纳米探针可用于活体成像研究.基于所开发的荧光探针的激发和发射光学性质,提出了基于激发和发射双维度的活体多重成像技术并组装了成像设备[图 5(A)].以皮下肿瘤老鼠为模型,将 3 种稀土纳米探针分别通过尾静脉注射(Yb/Tm)、皮下注射(Yb/Er)和肿瘤原位注射(Er@Y)的方式注入小鼠体内.在小鼠皮下注射 Yb/Er 和肿瘤内注射 Er@Y 纳米探针后,小鼠尾静脉注射 Yb/Tm 纳米探针[图 5(B)].在 808 nm 激光激发和 1400 nm 长通滤光片下获得小鼠皮下的荧光信号.在 915 nm 激光激发、1400 nm 长通和 1600 nm 短通滤光片下获得原位肿瘤的荧光信号.在 915 nm 激光激发、1400 nm 长通和 1600 nm 长通滤光片下获得血管和肝脏的荧光信号.结果如图 5(C)所示,可得到活体不同部位的高分辨轮廓信息.将图片重合后可观察到活体三

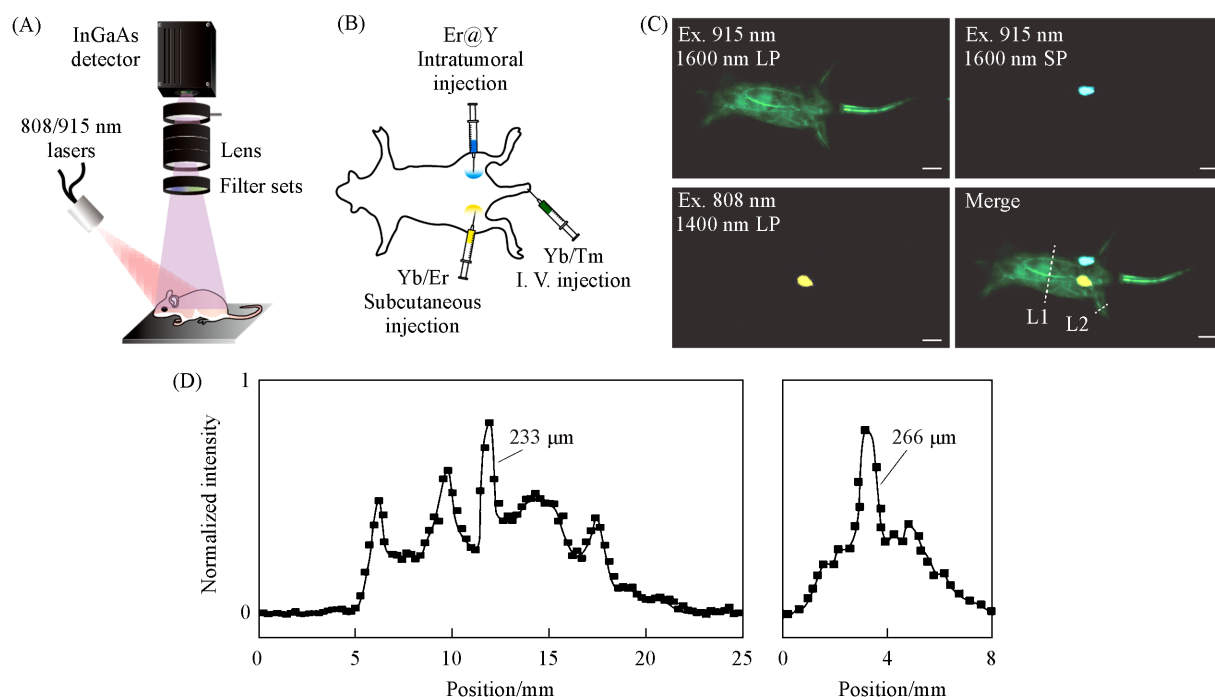


Fig. 5 Simplified schematic of the NIR-II multiplexed imaging system(A), three different delivery methods of Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoprobes(B), three channels imaging and merged results by using Er@Y, Yb/Tm and Yb/Er nanoprobes(C) and the intensity profiles of the lines in C(D)

Scale bar: 8 mm.

通道的成像效果。提取出强度值进行了高斯拟合，开发的探针在 8 cm 视野下达到 233 μm 的空间分辨率[图 5(D)]。上述结果表明，开发的系列近红外二区荧光探针和提出的激发和发射双维度策略可实现活体多通道成像。

3 结 论

提出了激发/发射双维度的荧光编码和活体多通道成像技术。开发了在 915 nm 激光激发下 1532 和 1640 nm 发射的 NIR-II-L 荧光探针，通过 1600 nm 滤光片可区分二者的检测通道；同时开发了在 808 nm 激光激发下仅有 1525 nm 发射的 NIR-II-L 荧光探针。通过核壳结构设计，稀土荧光亮度可增强 216 倍，满足了高信噪比的光学成像需求。在不同激发条件下，3 个通道之间几乎无荧光串扰，提高了多通道检测的准确性，实现了体外三通道光学信息存储与编码解析。在活体中实现了皮下、血管和原位肿瘤的高分辨率多重成像，为活体多种生理过程的监控与检测提供了新的工具与思路。

支持信息见 <http://www.cjcu.jlu.edu.cn/CN/10.7503/20240181>。

参 考 文 献

- [1] Zhao M. Y., Li B. H., Zhang H. X., Zhang F., *Chem. Sci.*, **2021**, *12*(10), 3448–3459
- [2] Won M., Li M., Kim H. S., Liu P., Koo S., Son S., Seo J. H., Kim J. S., *Coord. Chem. Rev.*, **2021**, *426*, 213608
- [3] Choi H. S., Gibbs S. L., Lee J. H., Kim S. H., Ashitate Y., Liu F., Hyun H., Park G., Xie Y., Bae S., Henary M., Frangioni J. V., *Nat. Biotechnol.*, **2013**, *31*(2), 148–153
- [4] Hell S. W., *Annalen der Physik*, **2015**, *527*(7/8), 423–445
- [5] Qu Z., Fang J., Wang Y. X., Sun Y., Liu Y., Wu W. H., Zhang W. B., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*, 3480
- [6] Zhang H. X., Zhao M. Y., Ábrahám I. M., Zhang F., *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **2021**, *9*, 692075
- [7] Zuo J., Tu L., Li Q., Feng Y., Que I., Zhang Y., Liu X., Xue B., Cruz L. J., Chang Y., Zhang H., Kong X., *ACS Nano*, **2018**, *12*(4), 3217–3225
- [8] Zhao M. Y., Sik A., Zhang H. X., Zhang F., *Adv. Opt. Mater.*, **2023**, *11*(11), 2202039

- [9] Wang C. L., Lin H. X., Ge X. G., Mu J., Su L. C., Zhang X., Niu M., Yang H. H., Song J. B., *Adv. Funct. Mater.*, **2021**, *31*(16), 2009942
- [10] Welsher K., Liu Z., Sherlock S. P., Robinson J. T., Chen Z., Darancioglu D., Dai H., *Nat. Nanotechnol.*, **2009**, *4*(11), 773—780
- [11] Smith A. M., Mancini M. C., Nie S., *Nat. Nanotechnol.*, **2009**, *4*(11), 710—711
- [12] Zhu X., Zhang H., Zhang F., *Acc. Mater. Res.*, **2023**, *4*(6), 536—547
- [13] Yang Y., Chen Y., Pei P., Fan Y., Wang S., Zhang H., Zhao D., Qian B. Z., Zhang F., *Nat. Nanotechnol.*, **2023**, *18*(10), 1195—1204
- [14] Wei R., Dong Y., Wang X., Li J., Lei Z., Hu Z., Chen J., Sun H., Chen H., Luo X., Qian X., Yang Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, *145*(22), 12013—12022
- [15] Cosco E. D., Spearman A. L., Ramakrishnan S., Lingg J. G. P., Saccomano M., Pengshung M., Arús B. A., Wong K. C. Y., Glasl S., Ntziachristos V., Warmer M., McLaughlin R. R., Bruns O. T., Sletten E. M., *Nat. Chem.*, **2020**, *12*(12), 1123—1130
- [16] Zhang H. X., Chen Z. H., Liu X., Zhang F., *Nano Res.*, **2020**, *13*(7), 1795—1809
- [17] Ren F., Liu H., Zhang H., Jiang Z., Xia B., Genevois C., He T., Allix M., Sun Q., Li Z., Gao M., *Nano Today*, **2020**, *34*, 100905
- [18] Hazra C., Skripka A., Ribeiro S. J. L., Vetrone F., *Adv. Opt. Mater.*, **2020**, *8*(23), 2001178
- [19] Cheng T., Marin R., Skripka A., Vetrone F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2018**, *140*(40), 12890—12899
- [20] Zhang H. X., Fan Y., Pei P., Sun C. X., Lu L. F., Zhang F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, *58*(30), 10153—10157
- [21] Zhu X. Y., Liu X., Zhang H. X., Zhao M. Y., Pei P., Chen Y., Yang Y. W., Lu L. F., Yu P., Sun C. X., Ming J., Abraham I. M., El-Toni A. M., Khan A., Zhang F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2021**, *60*(44), 23545—23551
- [22] Chen Z. H., Wang X. H., Yang M. Z., Ming J., Yun B. F., Zhang L., Wang X. S., Yu P., Xu J., Zhang H. X., Zhang F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, *62*(49), e202311883
- [23] Zhong Y. T., Ma Z. R., Wang F. F., Wang X., Yang Y. J., Liu Y. L., Zhao X., Li J. C., Du H. T., Zhang M. X., Cui Q. H., Zhu S. J., Sun Q. C., Wan H., Tian Y., Liu Q., Wang W. Z., Garcia K. C., Dai H. J., *Nat. Biotechnol.*, **2019**, *37*(11), 1322—1331
- [24] Zhong Y. T., Ma Z. R., Zhu S. J., Yue J. Y., Zhang M. X., Antaris A. L., Yuan J., Cui R., Wan H., Zhou Y., Wang W. Z., Huang N. F., Luo J., Hu Z. Y., Dai H. J., *Nat. Commun.*, **2017**, *8*(1), 737
- [25] Chen Q. S., Xie X. J., Huang B. L., Liang L. L., Han S. Y., Yi Z. G., Wang Y., Li Y., Fan D. Y., Huang L., Liu X. G., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*(26), 7605—7609
- [26] Johnson N. J. J., He S., Diao S., Chan E. M., Dai H. J., Almutairi A., *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*(8), 3275—3282
- [27] Cardona F. A., Jain N., Popescu R., Busko D., Madirov E., Arús B. A., Gerthsen D., De Backer A., Bals S., Bruns O. T., Chmyrov A., Van Aert S., Richards B. S., Hudry D., *Nat. Commun.*, **2023**, *14*, 4462
- [28] Zhou B., Tang B., Zhang C., Qin C. Y., Gu Z. J., Ma Y., Zhai T. Y., Yao J. N., *Nat. Commun.*, **2020**, *11*, 1174
- [29] Zhang H., Jia T., Chen L., Zhang Y., Zhang S., Feng D., Sun Z., Qiu J., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2017**, *19*(27), 17756—17764
- [30] Zhang H. X., Jia T. Q., Shang X. Y., Zhang S. A., Sun Z. R., Qiu J. R., *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2016**, *18*(37), 25905—25914
- [31] Zhu X. Y., Wang X. H., Zhang H. X., Zhang F., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2022**, *61*(42), e202209378
- [32] Zhu X. Y., Zhang H. X., Zhang F., *ACS Mater. Lett.*, **2022**, *4*(9), 1815—1830

(Ed.: X, N, K)