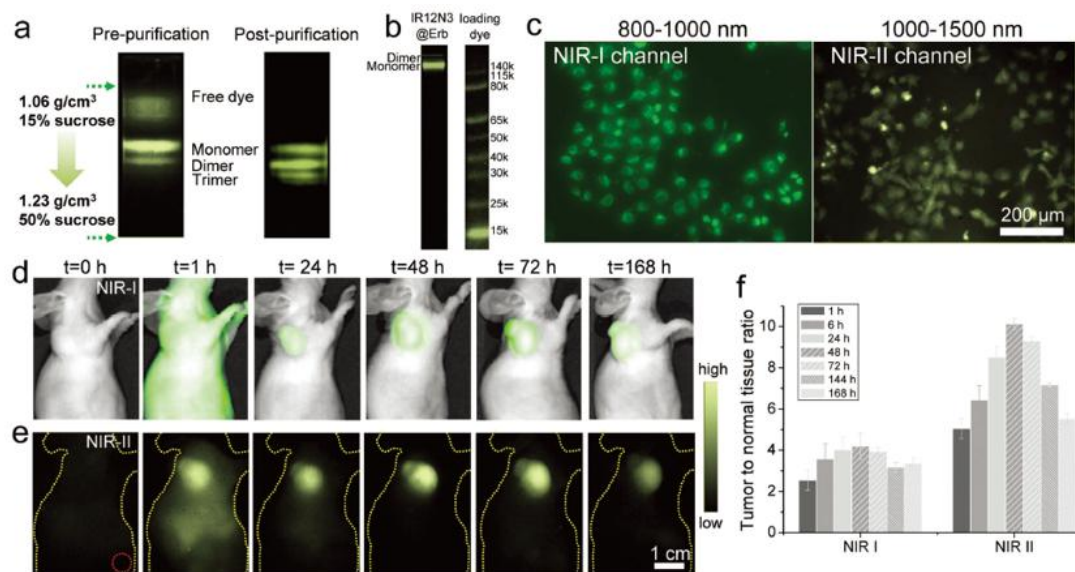


红外二区生物荧光成像的临床转化思路：近红外一区花菁染料的再利用

本文要点：本文作者系统研究了主发射峰位于近红外一区（NIR I 700-900nm）的生物相容性花菁染料的尾发射区域（>1000nm），筛选出的 NIR 染料在 NIR-II 区域具有明亮的尾发射，并具有高量子产率、高摩尔消光系数、排泄速度快和适用于生物偶联的官能团，从而可用于多种生物模型 NIR-II 实时成像，有望促进 NIR-II 生物成像的临床转化。



荧光成像是一种被证实的高灵敏度、实时跟踪生物靶标的方法，最近已扩展到近红外二区成像（1000-1700nm），相比于近红外一区（700-900nm），近红外二区波段的光在生物组织中吸收更少，散射系数降低，此外生物自体荧光也在该波段大大减少。当前这一领域的研究主要集中在纳米科学和生物学的交叉领域，为 NIR-II 纳米荧光团的体内生物成像开辟了新的机会，但是，考虑到临床转化前景，由于潜在的免疫原性反应，基于纳米材料的 NIR-II 荧光团成像后在体内的保留和积累引起了人们的关注。目前仍无临床获批的具有高亮度和生物相容性的 NIR-II 荧光染料。吲哚菁绿（ICG）作为目前唯一获得 FDA 批准的 NIR-I 成像试剂，已经广泛用于临床血管造影术和手术灌注评估，IRDye800CW 正在进行反

应性修饰的多个临床试验评估，已广泛应用于 NIR-I 窗口的蛋白/抗体标记和分子靶向成像，但在 NIR-I 区域成像深度仍然有限。利用目前临床批准的或商业化的 NIR-I 花菁染料的尾发射进行 NIR-II 成像是个很有前景的思路，然而，对其尾部发射机理的研究还未进行过，本文作者就此展开对尾发射机理的研究。NIR-I 的荧光发射并不遵守 Franck-Condon 原理，同时由于硅探测器对超过 900nm 的光探测效率低下，因此大于 900nm 的发射光谱并未产生肩峰，作者通过系统研究筛选出可生物共轭的 NIR-I 染料 IR-12N3，其在 NIR-II 区具有明亮的尾发射峰，并对该染料进行了 NIR-II 尾发射机理研究。作者认为，NIR-I 花菁染料在 S_1 激发态下 π 域的不对称导致扭曲的分子内电荷转移 (TICT) 过程，被确定为引起明亮的 NIR-II 发射的原因。利用 NIR-II 区域的出色亮度，与 NIR-I 成像相比，高对比度和高信噪比的靶器官和肿瘤深层组织成像得以实现，在小鼠体内施用 IR-12N3 可以实现非常清晰的血管成像和深部淋巴结成像。

作者首先对一系列市售的 NIR-I 染料的相对量子产率进行了筛选，发现花菁染料如 IR-12N3、ICG 和 IRdye800 是最亮的 NIR-I 染料，在血清中具有明亮的尾部发射，所有的商用 NIR-I 花菁染料都可以简化为四种类型的母核结构，如下图 1a 所示，典型的花菁染料有两个吡啶基和交错的乙烯键，不同的取代基允许控制发色团的性质，如吸收波长、光稳定性、荧光和溶解度，就以 IR-12N3 为例，这些 NIR-I 染料具有较强荧光，其发射峰位于 800nm 左右 (图 1b)，由于硅基探测器的探测效率较低，在发射光谱的长波长处缺少肩峰。随后作者使用 InGaAs 探测器记录超过 900nm 的发射光谱，检测到了合理的尾发射峰 (图 1c)。由于这些染料和蛋白质之间具有较强的相互作用，作者测试了牛血清白蛋白 (BSA)，胎牛血清 (FBS) 和 PBS 中荧光强度随温度的变化，结果显示 IR12N3-FBS 复合物实现了最优的亮度增强 (图 1d)，在 FBS 中，IR-12N3 的亮度分别比 IRDye800 和 ICG 高 2 到 3 倍 (图

1e)。为了系统研究这种尾发射的现象，作者进行了密度泛函理论 (DFT) 和时间相关 DFT 计算 (图 2a)。母核 1 (图 2d 上方) 和母核 4 (图 2d 下方) 的最高占据分子轨道 (HOMO) 和最低未占据分子轨道离域在整个分子骨架上，表明了具有强烈的 π - π^* 局域激发特征。激发态下的母核 1 的键 2 和键 4 的键长以及母核 4 的键 2-4 的键长显著增加，随着扭转角度的增加，展现出了单键的特征 (图 2b)，这更加有利于这些键的扭转，尤其是母核 4 会更加明显，但是需要注意的是，4 号母核中环己基的空间位阻作用可以阻止沿着键 4 的旋转，并且比母核 1 更有利于产生不对称构型。在基态下分子为平面型，激发态下中间 C-C 键有被拉长的趋势，因此在 S_1 激发态更容易扭转 (图 2f)，该扭转会破坏 π -共轭骨架的对称性，结果使得电荷重新分布，进一步诱导 TICT 过程 (图 2e)，对周围环境更为敏感的 TICT- S_1 态主要通过位于 NIR-II 区的红移发射从而回归基态。

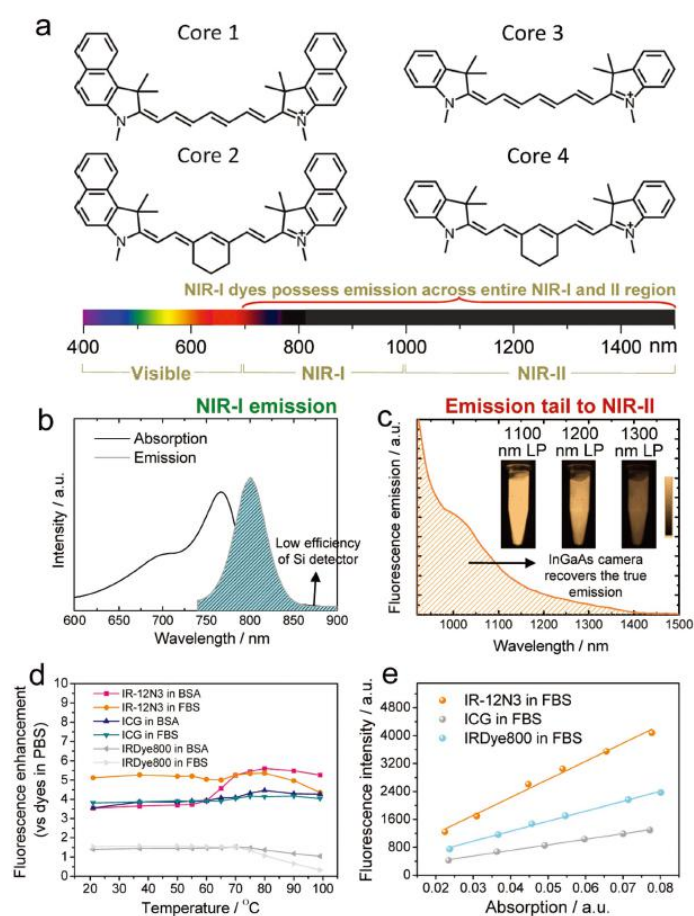


图 1 : a) 商业化花菁素的一般母核结构。母核 1 : ICG , 母核 2 : IR820 和 IR830 , 母核 4 : IR12-N3、

IRDye800、IR783 ; b)使用硅基探测器测量 NIR-I 染料(760 nm 激发)的吸收和发射，人为地截断了低能量发射肩峰 ; c) 在 InGaAs 探测器上测量 NIR-I 染料的发射 (808 激发)具有更高的灵敏度，在 NIR-II 光谱区域恢复真实的尾发射 ; d) 染料分别与 BSA 和 FBS 加热孵育 10min 后 NIRI亮度增加 ; e) IR-12N3-FBS 复合物的 NIRI量子产率是 IRDye800 CW/ICG-FBS 复合物的 2-3 倍

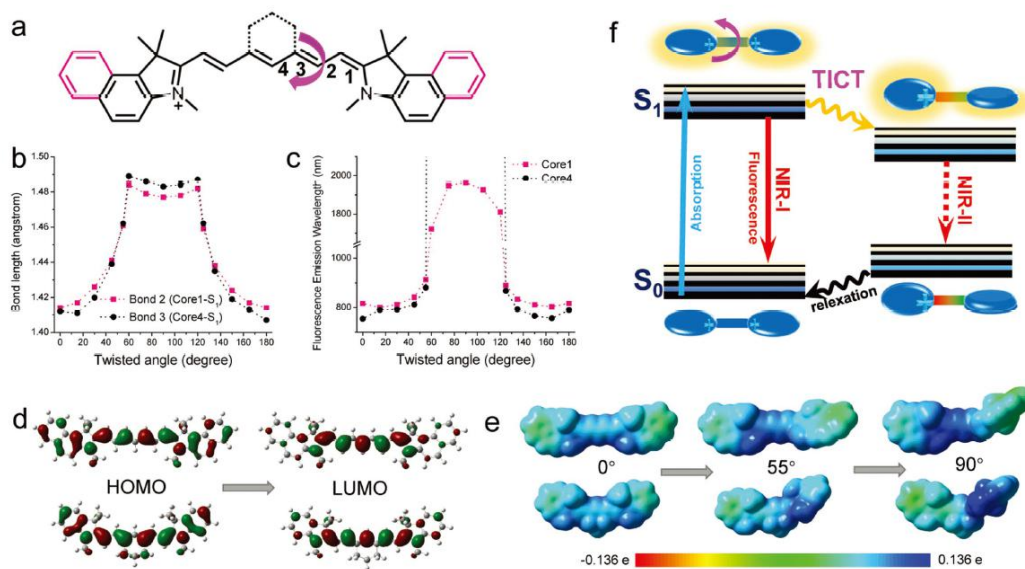


图 2 : a) ICG 母核结构 1 和 IRDey800/IR12-N3 的母核结构 4 ; b) 理论计算母核 1 的键 2 键长和母核 4 的键 3 键长与扭转角度的变化曲线 ; c) 模拟的母核 1 和母核 4 的荧光发射波长随扭转角度的变化曲线 ; d) 母核 1 (上) 与母核 4 (下) 的 HOMOs 与 LUMOs 示意图 ; e) 母核 1 (上) 与母核 4 (下) 的静电势面示意图 ; f) 尾发射和扭转分子内电荷转移(TICT)示意图。

(上篇)

(下篇)

同样的标题：加上篇的链接。

对染料进行了 NIRII 尾发射机理研究后,作者在动物模型上进一步验证他们的设想:以 5mg/Kg 的剂量给 CD-1 小鼠静脉注射 IR-12N3,几分钟内肝脏便出现强烈的荧光信号,随着时间推移荧光信号出现在肠道,表明了探针具备快速肝胆清除的特性(图 3a),尽管 IRDye800 可以有效通过肾脏清除,皮肤和正常组织对其的高摄取限制了它在血管成像中的有效性。通过对比可以发现,IR-12N3 的皮肤和组织摄取比 IRDye800 低,因此血管成像质量会更高(图 3b&c),计算得出的血浆清除半衰期为 0.2h(图 3d),注射 24h 后的生物分布实验则显示除肝脏外,其他器官的分布极低,80%以粪便排泄至体外(图 3e&f&g),此外小鼠两周内体重变化与对照组无差别(图 3h),血象检测结果也显示各血细胞亚型与正常小鼠相比无明显差异,综合以上证明了该探针优异的生物相容性和安全性。

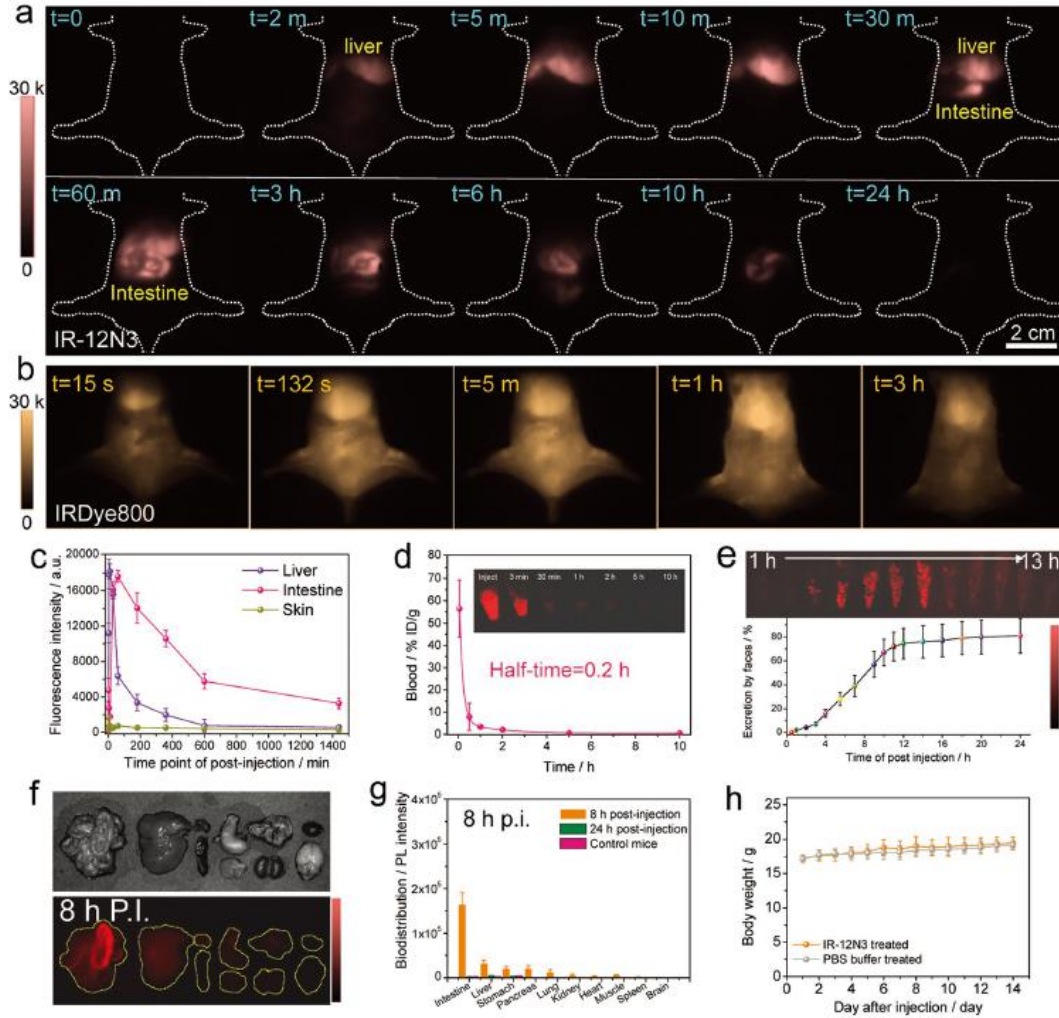


图 3 : a) 小鼠注射 IR-12N3 后 24h 内成像图 ; b) 小鼠注射 IRDye800 后不同时间点成像图 ; c) IR-12N3 不同时间点在肝脏、肠道和皮肤的荧光分布曲线 ; d) 10h 内的血浆浓度-时间曲线 ; e) 小鼠粪便的荧光强度-时间曲线 ; f , g) 注射 IR-12N3 第 8h 的器官成像图 ; h) 注射 IR-12N3 两周内小鼠体重变化曲线。

NIRII区域可实现高分辨血管成像，因此作者考察了在不同波长范围下的成像效果，如图 4a 所示，在不同波长下，越红的波长 (1300LP) 可以获得更加细微的成像信息，使得血管成像在近红外二区的分辨率大大提高 (图 4b)，而脑血管由于颅骨的存在对成像要求更高，作者随后对小鼠进行无创脑血管成像，如图 4c 所示，在 850-900nm 区域几乎看不到任何血管，而使用 1300LP 后，大脑下静脉、浅静脉、上矢状窦和横窦可被清晰地分辨开来，此外还可以通过实时成像检测小鼠的呼吸速率 (图 4e)。作者还对比了 NIRI区和 NIRII区的淋

巴结成像，如图 4f-h 所示，腭淋巴结（图 4f）、腭淋巴结和骶淋巴结（图 4h）以及腰淋巴结（图 4i）在 NIR I 区和 NIR II 区成像对比表明了 NIR II 的分辨率更高，可分辨出相邻淋巴结，而 NIR I 区却几乎分辨不出。

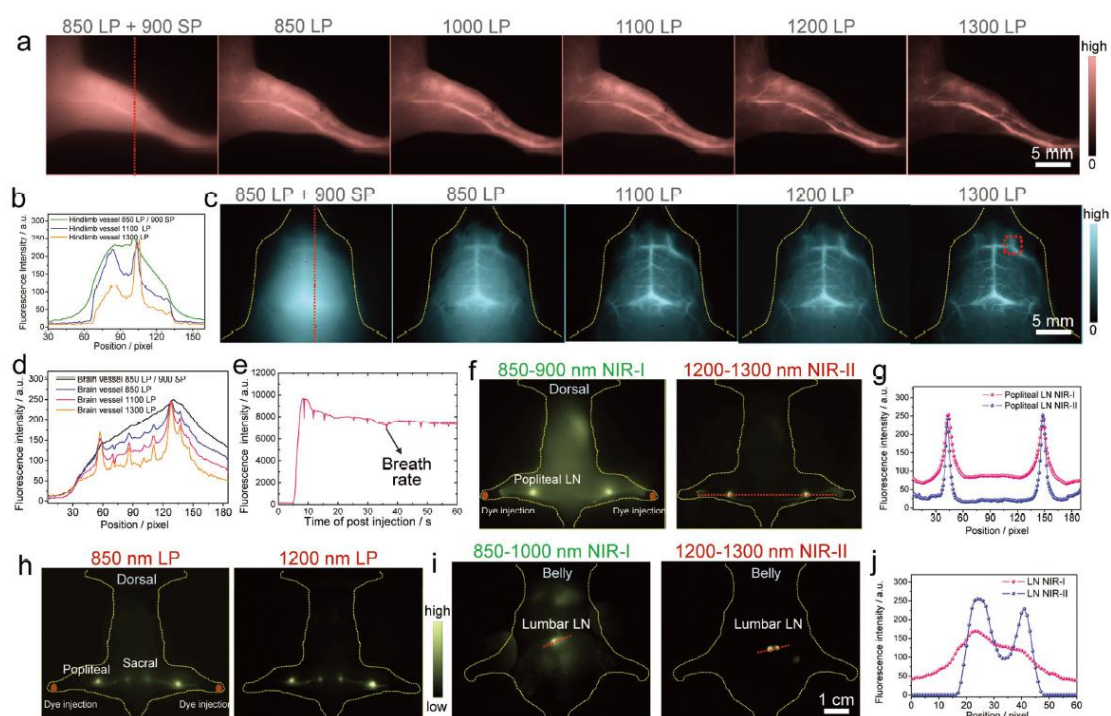


图 4 : a) 不同 NIR II 长通滤光片下注射 IR-12N3 不到 2 分钟内的成像图 ; b) 在 NIR I 和 NIR II 窗口中后肢的荧光截面强度分布图 ; c) 在不同的 NIR II 长通滤光片上注射 IR-12N3 后小鼠脑血管成像对比图 ; d) NIR I / II 窗口中脑血管的荧光截面强度分布图 ; e) 录制的脑血管成像视频可用于计算小鼠的呼吸速率 ; f) 在 NIR I 和 NIR II 窗口使用 IR-12N3 进行淋巴结成像 ; g) NIR I 和 NIR II 窗口中腭淋巴结的横截面强度分布 ; h) 分别在 850nm 和 1200 nm 长通滤波片下对腭淋巴结和骶淋巴结淋巴结成像 ; i) 将 100 μ g IR-12N3 注入两个脚垫后，在 NIR I / II 窗口进行腰淋巴结成像 ; j) NIR I 和 NIR II 窗口中腰淋巴结的荧光横截面强度分布图。

最后作者将 IR-12N3 通过点击反应与西妥昔单抗偶联，赋予分子肿瘤靶向性，实现了肿瘤靶向成像，如图 5c 所示为体外细胞靶向实验，鳞状癌细胞 (SCC) 在 800-1000nm 下几乎无法分辨，而在 1000-1500nm 下可以看到探针特异性靶向 EGFR 表达丰富的癌细胞，随

后作者将该探针注射入荷瘤鼠体内，图 5d 显示了注射后 24h，探针在肿瘤区域大量富集，而其他主要器官则几乎没有荧光，在 NIR-I 区和 NIR-II 区成像的肿瘤/正常组织信噪比分别约为 4 和 10 (图 5f)，168h 后体外器官成像显示，肿瘤荧光依旧最高 (图 5g)，而对照组探针 (IR-FGP) 在 168h 后肿瘤几乎无信号 (图 5i)，其肿瘤/肝脏信号比仅为 IR-12N3 的 1/6 (图 5j)。综合来看，NIR-II 区成像相比于 NIR-I 区显示出巨大的优势，然而开发大于 1000nm 发射的高量子产率的荧光探针依旧面临巨大挑战，尤其是大于 1300nm 波段，光散射进一步减少从而更加有利于深层组织成像，此外作者认为，“可激活”型探针也同样为目前 NIR-II 区探针起到了补充作用。

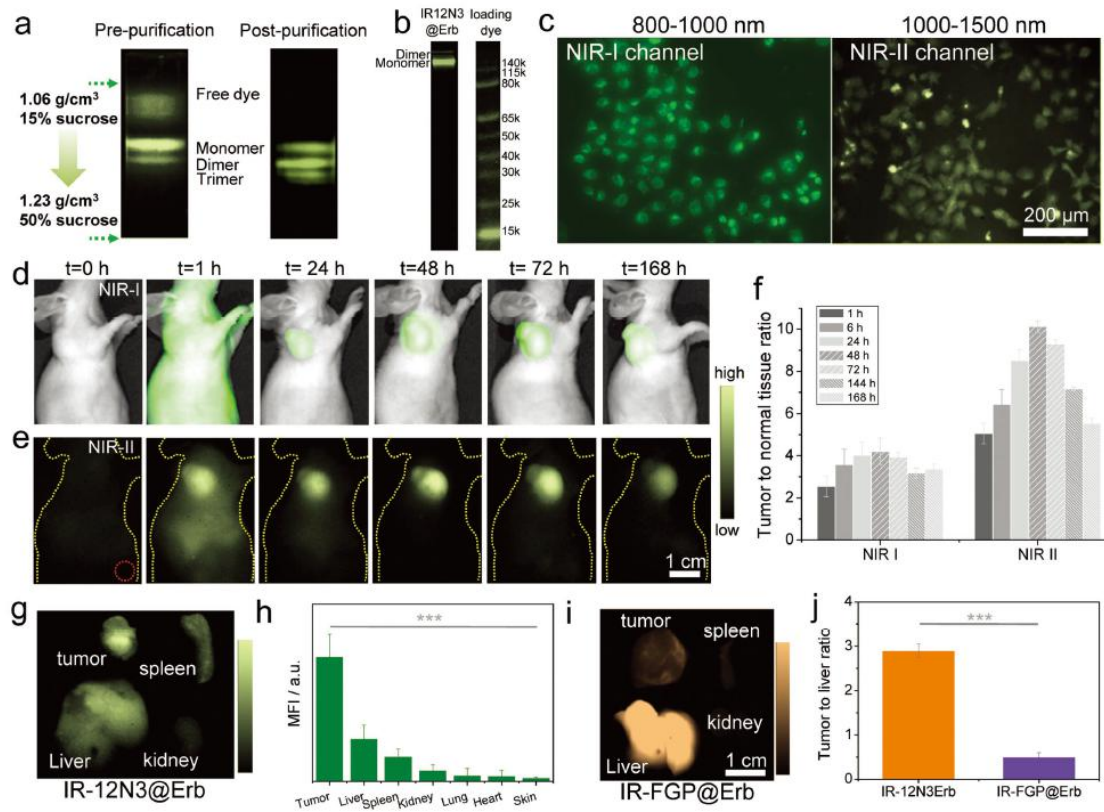


图 5 : a) IR-12N3 偶联西妥昔单抗密度梯度离心纯化前与后的荧光成像图 ; b) IR-12N3 偶联西妥昔单抗的凝胶电泳分析 ; c) NIR-I 与 NIR-II 窗口下鳞状癌细胞染色成像图 ; d & e) NIR-I 与 NIR-II 窗口下对荷瘤鼠不同时间点成像图 ; f) NIR-I 与 NIR-II 的不同时间肿瘤/正常组织比直方图 ; g) 168h 后肿瘤与肝脏、脾脏和肾脏的荧光成像图 ; h) 不同器官组织荧光强度直方图 ; i) 对照组 IR-FGP 偶联西妥昔单抗的 168h 后肿瘤与肝

脏、脾脏和肾脏的荧光成像图 ; j) IR-12N3 与 IR-FGP 偶联单抗后的肿瘤/肝脏比直方图。

参考文献 : Zhu, Shoujun, Hu, et al. Repurposing Cyanine NIR-I Dyes Accelerates Clinical

Translation of Near-Infrared-II (NIR-II) Bioimaging[J]. Advanced Materials, 2018.

