

基于临床可用荧光探针的 NIR-II 优质亚窗口的活体成像研究

李佳一^{1#}, 张沛锦^{1#}, 夏启铭², 钱骏^{1*}

(1. 浙江大学光电科学与工程学院 光及电磁波研究中心 先进光子学国际研究中心, 浙江 杭州, 310058;
2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院 普外科, 浙江 杭州, 310058)

摘要: 近红外二区 (the second near-infrared window, NIR-II, 900–1880 nm) 荧光成像具有信号背景比高、穿透深度大的优势, 在生物医学领域具有广泛的应用前景。对 NIR-II 成像窗口的划分有利于优化成像过程, 其中, NIR-IIx (1400–1500 nm) 成像窗口得益于其独特的水吸收, 可以有效抑制散射背景, 实现高对比度成像。本研究通过仿真模拟和活体实验, 系统评估了 NIR-IIx 窗口的成像潜力。为了更好地推进 NIR-IIx 荧光成像的临床转化, 本研究采用美国食品及药物管理局 (FDA) 批准的有机小分子染料吲哚菁绿 (Indocyanine Green, ICG) 作为荧光探针, 利用其延伸至 NIR-II 的荧光发射拖尾, 实现了高对比度和清晰度的小鼠血管和肠道的 NIR-IIx 成像。此外, 结合同样通过 FDA 认证的亚甲基蓝 (Methylene Blue, MB), 成功实现了高质量的 NIR-II 双通道成像, 精准定位小鼠的血管和淋巴结。本研究进一步挖掘了 NIR-IIx 在生物成像上的独特优势和临床应用的潜力, 并为 NIR-II 荧光成像的临床转化提供了重要参考。

关键词: 近红外二区; NIR-IIx; 双通道; 荧光成像; 临床手术导航
中图分类号: O43 **文献标识码:** A

In Vivo Fluorescence Imaging in the Superior NIR-II Sub-window Using Clinical-Grade Fluorescent dye

LI Jia-Yi^{1#}, Zhang Pei-Jin^{1#}, Xia Qi-Ming², Qian Jun^{1*}

(1. Centre for Optical and Electromagnetic Research, College of Optical Science and Engineering, International Research Center for Advanced Photonics, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;
2. Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310058, China)

Abstract: NIR-II fluorescence imaging demonstrates significant advantages in biological imaging with its high signal-to-background ratio (SBR) and deep tissue penetration, showing broad application prospects in biomedical fields. The classification of NIR-II imaging windows facilitates the optimization of imaging processes. Among these, the 1400–1500 nm imaging window benefits from its unique water absorption characteristics, enabling effective suppression

Key words: NIR-II, NIR-IIx, dual-channel, fluorescence imaging, clinical surgical navigation

PACS:

of scattering background and achieving high-contrast imaging. This study systematically evaluates the imaging potential of the 1400–1500 nm window through simulation studies and *in vivo* experiments. To

advance the clinical translation of fluorescence imaging in the 1400–1500 nm window, we employed indocyanine green (ICG), an organic small-molecule dye approved by the U. S. Food and Drug Administration

Foundation items: the National Key R&D Program of China (2022YFB3206000); the National Natural Science Foundation of China (U23A20487); Dr. Li Dak Sum & Yip Yio Chin Development Fund for Regenerative Medicine, Zhejiang University; the National Natural Science Foundation of China (61975172).

作者简介 (Biography): 李佳一 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向为近红外二区荧光成像。E-mail: 22230047@zju.edu.cn; 张沛锦 (2002-), 女, 硕士研究生, 研究方向为近红外二区荧光成像。E-mail: 22330034@zju.edu.cn

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

(FDA), as the fluorescent probe. Utilizing its extended fluorescence emission tail in the NIR-II region, we achieved high-contrast and high-resolution imaging of mouse vasculature and intestinal structures in the 1400–1500 nm window. Furthermore, in combination with methylene blue (MB), another FDA-approved agent, we successfully implemented high-quality dual-channel NIR-II imaging, enabling precise localization of blood vessels and lymph nodes in mice. This research further explores the unique advantages of the 1400–1500 nm imaging window in biological imaging and its clinical application potential, while providing valuable references for the clinical translation of NIR-II fluorescence imaging.

引言

荧光成像技术是一种捕捉生物信息的有效方法,其独特的兼具较高的时间与空间分辨率以及无辐射的优势,令其成为生物医学领域中不可或缺的工具。相比传统的可见光荧光成像,近红外(NIR)荧光成像具有散射减小和低生物自发荧光的优势,从而能够提供更高质量的生物成像。其中,近红外一区(NIR-I, 700–900 nm)荧光成像已经被广泛应用在部分外科手术中^[1–3]。得益于波长红移带来的散射减小、低生物自发荧光以及适度的水吸收抬升等特性,NIR-II荧光成像中背景干扰被大大抑制,成像的信背比和组织的穿透能力具备显著优势。因此,相较于NIR-I波段,NIR-II在精确观察深层组织的细节等方面具有更佳的成像性能^[4–6]。目前,NIR-II荧光成像技术已成功应用于肝癌、宫颈癌、糖尿病足等临床手术导航中^[7–9],提供可视化指导。

生物成像中,光子在生物组织中传播时受到组织的散射和吸收的双重影响。生物组织往往是高散射介质,经过生物组织散射的荧光信号常常导致图像模糊,长波长光子的散射则会大大减少。研究人员将NIR-II波段进一步细分为几个子波段以优化成像过程:NIR-IIa (1300–1400 nm)、NIR-IIb (1500–1700 nm)和NIR-IIc (1700–1880 nm)^[5, 6, 10]。其中,考虑到吸收会衰减信号造成图像信息丢失,~1450 nm水吸收峰附近的区域通常是被避开的。然而,吸收对成像质量的影响是双面的。近年来已有一些研究表明,光吸收在增强图像的对比度上具有积极作用^[11–13]。在生物组织的传播过程中,多重散

射光子的路径长度远远大于弹道光子的路径长度,因此吸收会优先耗尽多重散射光子。这使得到达探测面的弹道光子占比增加,图像的信背比(Signal to Background Ratio, SBR)得以提高。基于这一理论,NIR-IIx成像窗口被重新提出并深入评估,研究发现,NIR-IIx波段抬升的水吸收可以有效抑制散射背景,在实现高对比度成像上具有优势^[5]。然而,NIR-IIx的活体成像相关研究较少,且该窗口的高质量成像必须保证荧光探针的强度足够克服吸收带来的衰减,因此,其在临床成像领域的应用亟待探索。

在本研究中,我们首先通过Monte Carlo模拟对光子在生物组织中的传播进行了仿真,结果证明,NIR-IIx波段的成像效果极佳,具有高对比度的成像优势。为了进一步挖掘NIR-IIx窗口在临床荧光导航手术中的潜力,我们采用了FDA批准的有机小分子染料——ICG进行活体荧光成像实验。在793 nm连续激光的激发下,该染料可以在NIR-I窗口产生明亮的荧光信号,而其发射光谱的尾部则延伸至NIR-II窗口,并在NIR-IIx波段仍能产生荧光信号。我们通过小鼠活体实验,对ICG在各波段的血管成像和肠道成像进行了评估,证明了NIR-IIx成像窗口在活体成像中的优越性。此外,我们还使用了MB在900–1300 nm波段进行淋巴结成像,同时使用ICG在NIR-IIx波段进行血管成像,成功实现了高质量的NIR-II双通道成像,为NIR-II荧光成像在临床转化中的应用提供了一定的参考价值。

1 研究方法

1.1 近红外荧光成像系统

NIR-II荧光成像使用实验室自建的宏观荧光成像系统,包括激发光源和成像模块。采用功率可调的793 nm激光器和665 nm激光器作为激发光源,光纤口输出的激光束经准直后,通过透镜扩束,再由毛玻璃进一步均匀,确保在观测样品上产生均匀的照明。样品中被激发的荧光信号通过滤光片和镜头,然后成像到相机的探测器上。成像模块配有焦距为30.7 mm的近红外成像镜头(OLES30, SPEC-IM, Finland)和InGaAs相机(SD640, Tekwin, China; Ninox 640 Su, Raptor Photonics, UK)。实验中不同波长窗口的成像是通过使用各种长通(Long Pass, LP)和短通(Short pass, SP)滤光片实现的。

1.2 通过蒙特卡罗仿真模拟光子在生物组织中的

传播。

利用蒙特卡罗(Monte Carlo, MC)方法对光子在生物组织中传播进行模拟仿真,设置生物组织的折射率为1.37,散射各向异性因子为0.9,生物组织的长度和宽度均为100 mm。设置荧光信号源为一条长40 mm、宽1 mm的垂直线光源,默认深度为1 mm。仿真过程中,光源将均匀地在随机方向上发射共 10^7 个光子,光子在组织中传播后,穿过宏观成像系统到达探测器。探测器设置为一个 512×512 像素的二维阵列平面。仿真所用的散射系数为经验散射系数^[5]。考虑到水是生物组织中最主要的成分,组织中其他成分的吸收比水的吸收要小得多^[14],因此在模拟中,组织的吸收系数近似设置为与水相同。通过蒙特卡洛仿真模拟垂直线样品(深度1 mm)在水平线(深度1.2 mm)上900–1700 nm范围内的成像。水平线的设置是一个长度相同、宽度为3 mm的水平线光源,均匀地发射总共 10^7 个光子。

1.3 荧光探针的选择

我们选用在临床上通过FDA认证的ICG与MB作为荧光探针^[15]。ICG因其良好的光学特性和生物相容性,常被用作荧光成像的造影剂,其发射拖尾延伸至NIR-II,近年来常被作为NIR-II染料用于活体荧光成像^[16, 17];MB作为临床上传统的示踪剂,可对淋巴结进行染色,已广泛应用于淋巴结活检定位,其发射拖尾也延伸至NIR-II,可用于NIR-II荧光成像研究^[18]。研究中所使用的ICG购自阿拉丁,使用前根据需求溶于去离子水或胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)中;MB购自美仑生物,使用前溶于去离子水中。

1.4 光谱的测量

ICG和MB的吸收光谱由紫外-可见分光光度计(UV-2550, Shimadzu, Japan)测得。样品的荧光光谱测试均使用实验室自建的光谱分析系统进行。在测量ICG的荧光光谱中采用793 nm的激光器作为激发光,在测量MB的荧光光谱中采用665 nm的激光器作为激发光,并在激发光的光路中放置900 nm短通滤光片(FESH0900, Thorlabs, USA)来滤除激发光的干扰。激发光束准直并对准装有样品的比色皿中的边缘,待测样品的荧光信号通过900 nm长通滤光片(FELH0900, Thorlabs, USA)后由物镜(25 \times /1.05, Olympus, Japan)收集,通过准直器将荧光耦合到光纤中,最后由光谱仪(NIR2200, Ideaop-

tics, China)检测。

1.5 动物准备

所有实验过程均通过浙江大学动物实验机构伦理委员会批准(伦理批号:ZJU20220283)。研究中使用的BALB/c裸鼠(~20 g)和ICR小鼠(~20 g)均由SLAC实验动物有限公司(中国上海)提供。

1.6 NIR-II活体荧光成像

ICR小鼠提前1天用脱毛乳液脱毛。小鼠血管荧光成像实验中,将200 μ L的ICG水溶液(1 mg/mL)用胰岛素针通过静脉注射注射进小鼠体内进行成像。小鼠肠道荧光成像实验中,将200 μ L的ICG水溶液(1 mg/mL)通过灌胃针灌注到裸鼠的胃中进行肠道荧光成像。ICG荧光成像使用793 nm激光器作为激发光源,荧光信号通过滤光片后被探测器收集。小鼠淋巴结和血管双通道成像实验中,通过两侧足垫向脱毛的ICR小鼠体内注射适量的MB水溶液(1 mg/mL,每侧各约50 μ L),在665 nm激光激发下进行淋巴结成像,收集900–1300 nm波段的信号。在不移动小鼠位置的情况下,对其眼眦静脉注射200 μ L的ICG水溶液(1 mg/mL),在793 nm激光激发下进行血管成像实验,收集1400–1500 nm波段的信号。

NIR-II不同波段的成像使用了不同的滤光片,其中,900–1300 nm成像使用了900LP(FELH900, Thorlabs, USA)和1300SP(#89-676, Edmund, USA);NIR-IIa成像使用了1300LP(FE1300, Thorlabs, USA)和定制的1400SP;NIR-IIx成像使用了1400LP(FELH1400, Thorlabs, USA)和定制的1500SP;NIR-IIb成像使用了1500LP(FELH1500, Thorlabs, USA),InGaAs探测器的截止波长为1700 nm,天然的滤除了1700 nm以后的信号。

在活体荧光成像实验中,使用793 nm CW激光器时所用的最高的激光照射功率为0.276 W/cm²,用665 nm CW激光器时所用的最高的激光照射功率为0.024 W/cm²,均低于近红外激光器的激光安全限值(美国国家激光安全使用标准,ANSI Z136.1-2014)。

2 结果与讨论

2.1 NIR-II荧光成像的仿真与探讨

生物体中占比最多的成分是水,因此在生物成像过程中我们主要考虑水吸收的影响。水在900–1700 nm波段的吸收光谱如图1a所示,在1450 nm附近存在一个显著的水吸收峰。如果荧光探针足

够亮,信号的强度足以克服水吸收导致的衰减,吸收优先耗尽更长光程的多重散射光子,那么从理论角度,在吸收峰值附近的光谱区域成像有利于提高成像对比度。换言之,1400–1500 nm 窗口具有高质量生物成像的潜力。这个思路也得到了近期一些研究的支撑^[5, 13, 19]。

为了验证 1400–1500 nm 窗口的成像潜力,我们通过 Monte Carlo 仿真模拟光子在生物组织中的传播,对 900–1700 nm 波段的四个子窗口(900–1300 nm、1300–1400 nm、1400–1500 nm 和 1500–1700 nm)分别进行线样品的成像模拟,获得了如图 1b 所示的四幅不同的图像。不难发现,1400–1500 nm 波段仿真图像的背景信号被有效抑制,其结果有着最优秀的 SBR(12.13)(图 1c),远高于其它成像窗口。对目标样品进行半高全宽(Full Width at Half Maxima, FWHM)(图 1d)以及结构相似度(Structural Similarity, SSIM)(图 1e)分析,1400–1500 nm 窗口的仿

真结果均是最优的(5.35 和 0.92)。根据仿真结果,NIR-IIx 窗口更高的水吸收对成像结果有着显著的积极影响。

2.2 临床探针 ICG 的表征

ICG 是经过 FDA 批准的一种临床可用的水溶性花菁类染料,因其在血液中同蛋白结合后具有较强的荧光发射,常作为荧光团被用于临床造影如淋巴血管造影、血供评估等^[20–23]。目前,基于 ICG 的 NIR 成像技术已成为许多外科手术的标准临床诊疗流程。由于 ICG 的发射荧光在 NIR-II 有一定的拖尾,近年来基于 ICG 的 NIR-II 临床应用转化也逐渐发展起来。

我们对 ICG 与 FBS 的混合溶液和 ICG@水溶液分别进行了吸收光谱的测量,如图 2a 所示,发现 ICG 与蛋白结合之后其吸收谱线有一定的红移。根据其吸收谱线,我们选用 793 nm 激光作为激发光,并对 ICG@FBS 溶液进行了荧光光谱的测量。如图 2b

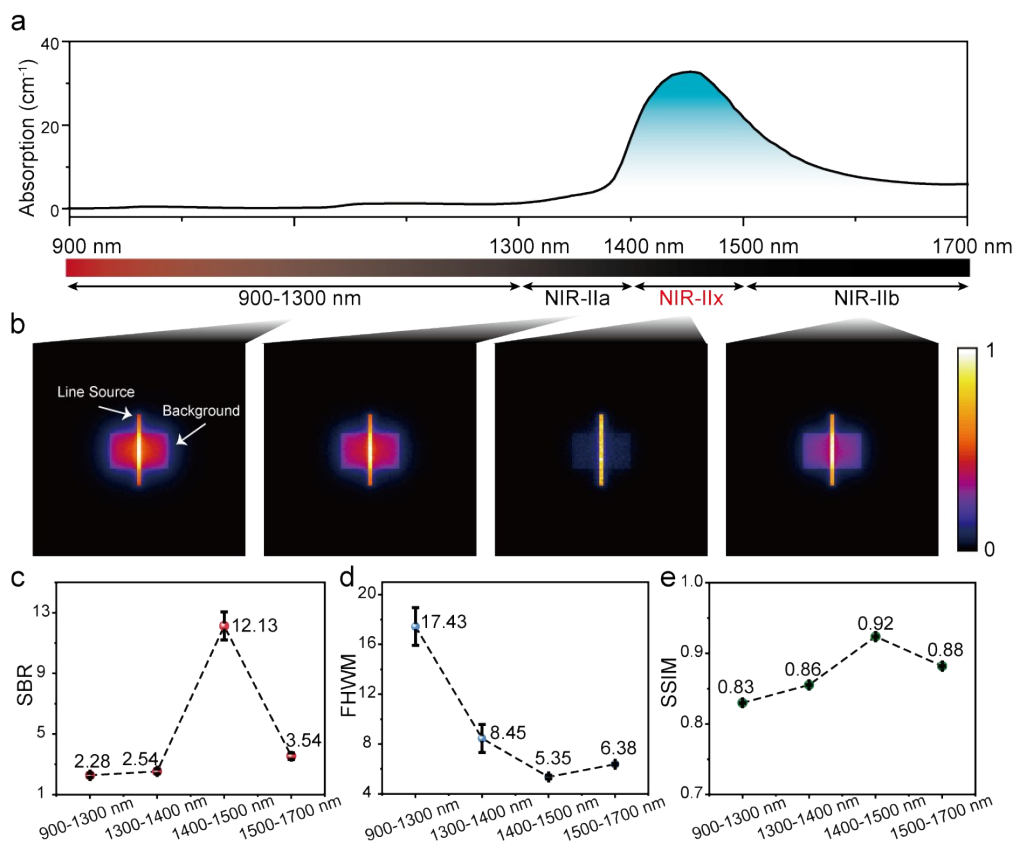


图 1 NIR-II 生物成像的 Monte Carlo 仿真结果:(a)水在 900–1700 nm 的吸收光谱。(b)模拟 900–1300 nm、1300–1400 nm、1400–1500 nm、1500–1700 nm 的成像仿真结果(通过 1 mm 厚度的生物组织)(c)对(b)中的模拟图像进行 SBR 分析结果。(d)对(b)中的模拟图像进行 FWHM 分析结果。(e)对(b)中的模拟图像进行 SSIM 分析结果。

Fig. 1 Simulation results of NIR-II bioimaging by Monte Carlo method: (a) The absorption spectrum of water at 900–1700 nm. (b) The imaging simulations at 900–1300 nm, 1300–1400 nm, 1400–1500 nm, and 1500–1700 nm (through 1 mm thickness of biological tissues). (c) SBR analysis of the simulation results in (b). (d) FWHM analysis of the simulation results in (b). (e) SSIM analysis of the simulation results in (b).

所示, ICG 在 FBS 中的荧光发射拖尾可覆盖至 NIR-II。我们进一步对装有 ICG@FBS 溶液 (0.1 mg/mL) 的离心管进行 900–1300 nm、1300–1400 nm、1400–1500 nm、1500–1700 nm 四个波段的荧光成像。发现其在 NIR-II 的各个子窗口都有着较强的荧光信号, 因此, 我们选择 ICG 用于进一步的 NIR-II 不同子窗口的活体成像性能比较。

2.3 基于 ICG 的 NIR-IIx 小鼠血管活体荧光成像

为了进一步挖掘 NIR-IIx 的生物成像潜力, 我们对小鼠全身血管进行了活体成像。对小鼠静脉注射 200 μ L 的 ICG 水溶液 (1 mg/mL) 后, 在 793 nm CW 激光激发下对其进行 900–1300 nm、1300–1400 nm、1400–1500 nm 和 1500–1700 nm 成像波段的全身血管成像, 荧光成像结果如图 3a–d 所示。不难发

现, NIR-IIx 成像结果的整体背景要明显低于其他波段。值得一提的是, 由于 ICG 会在肝脏中积累, 在肝脏的强背景下, 其上方的血管难以分辨。对红色虚线处的两条肝脏上方的血管进行强度分布分析, 如图 3e–h 所示。我们选择的两条微小血管在 900–1300 nm 成像中的 SBR 分别为 1.05 和 1.04, 在 1300–1400 nm 分别为 1.06 和 1.08, 在 1400–1500 nm 分别为 1.23 和 1.31, 在 1500–1700 nm 分别为 1.12 和 1.13。其中, NIR-IIx 的成像提供了最佳的 SBR, NIR-IIb 次之, 而其余两个波段的 SBR 接近于 1, 几乎难以分辨。这也进一步证实了 NIR-IIx 波段成像的优越性, 其成像对比度较其余三个波段有显著优势。由此可见, 与理论分析相符, NIR-IIx 抬升的水吸收对背景信号的抑制给成像结果带来积极影响, 尤其是对来自更深层的强背景信号的抑制更

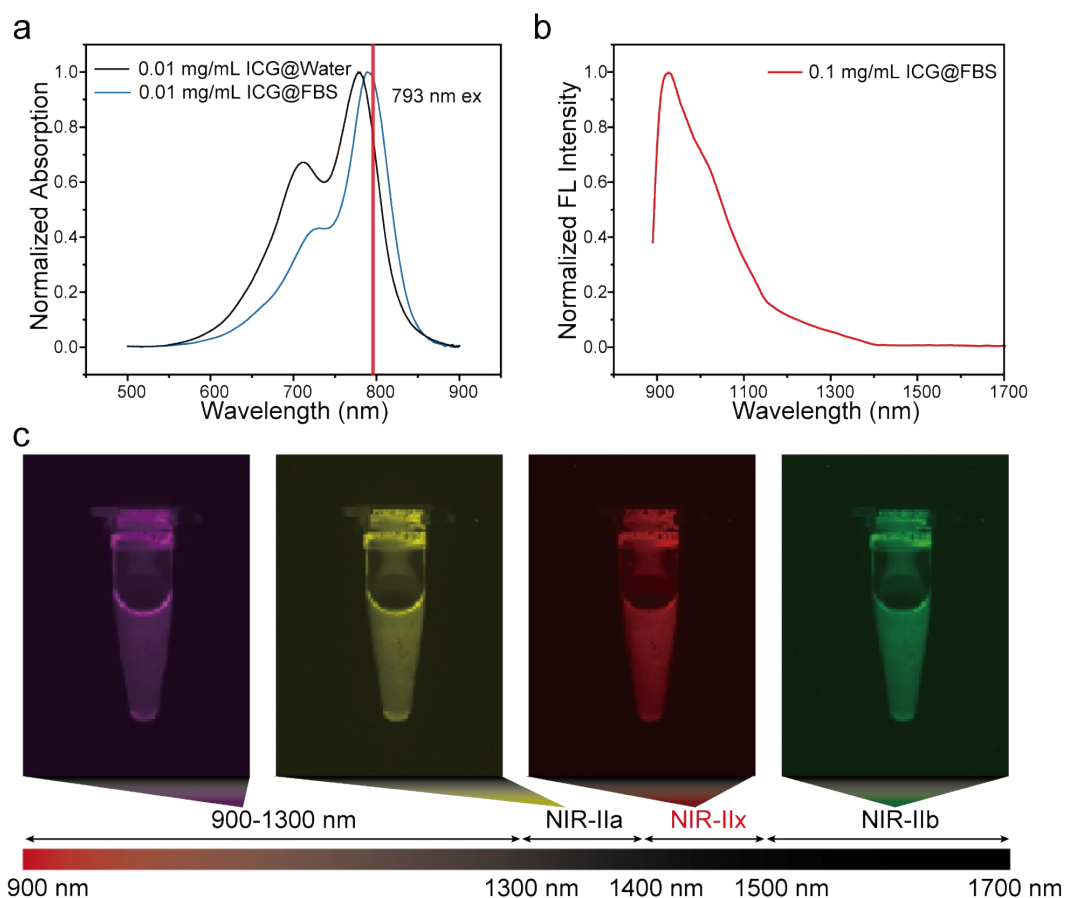


图2 ICG 的光学特性表征: (a) ICG@FBS 溶液 (0.01 mg/mL) 和 ICG@水溶液 (0.01 mg/mL) 的归一化吸收光谱。(b) ICG@FBS 溶液 (0.1 mg/mL) 的归一化发射光谱。(c) 在 793 nm 激光激发下, ICG@FBS 溶液 (0.1 mg/mL) 在 900–1300 nm、1300–1400 nm、1400–1500 nm 和 1500–1700 nm 范围内的荧光成像。

Fig. 2 Optical characterization of ICG: (a) Normalized absorption spectra of ICG@FBS (0.01 mg/mL) and ICG@water (0.01 mg/mL). (b) Normalized emission spectra of ICG@FBS (0.1 mg/mL). (c) Fluorescence imaging of ICG@FBS (0.1 mg/mL) in the ranges of 900–1300 nm, 1300–1400 nm, 1400–1500 nm, and 1500–1700 nm under 793 nm laser excitation.

为明显,进而提升了成像对比度。因此,NIR-IIx 成像窗口在高散射的生物组织中具有独特的成像优势,临床可用的 ICG 荧光染料在 NIR-IIx 的可利用性也使得 NIR-IIx 成像窗口具备较高的临床发展前景。

2.4 基于 ICG 的小鼠肠道活体荧光成像

在上述的小鼠血管成像研究中,NIR-IIx 的高对比度活体成像潜力得以验证,进而,我们利用 NIR-II 四个子窗口对小鼠肠道进行活体荧光成像探索。相比于表皮血管,肠道位于小鼠体内更深处,在肠道成像的实验场景中,信号穿过的组织层更厚,散射会使得图片的清晰度下降。因此,高质量的肠道成像对成像窗口提出了更高要求。我们利用灌胃针小心地将 200 μL 的 ICG 水溶液 (1 mg/mL) 灌入小鼠胃中,等待其肠道蠕动一段时间后,对小鼠肠道进行了不同波段的成像对比,其结果如图 4a-d 所示。各波段的 SBR 分析如图 4e 所示,其中,1400-1500 nm 波段的 SBR 最高,为 3.81。相较于其他窗口下肠道结构边缘的模糊,NIR-IIx 成像下肠道的管道结构的边缘更清晰,呈现了高对比度的肠道结构,进一步证明了 NIR-IIx 在活体成像上的优越性。进而,我们利用 NIR-IIx 成像窗口观察肠道蠕动状态,清楚的捕捉到灌胃后肠道结构随着蠕动的空间分布变化。总的来说,利用 ICG 可以实现

NIR-IIx 高对比度的肠道结构可视化。而在术中对深埋器官的更精确的结构评估无疑会对医生进一步的判断和操作带来更精准的指导,NIR-IIx 高对比度活体成像具有值得期待的临床发展前景。

2.5 小鼠淋巴结和血管的双通道成像

在外科手术中,淋巴结清扫是一项关键步骤,尤其在恶性肿瘤的治疗中,彻底清除受累淋巴结对预后至关重要^[24, 25]。然而,部分淋巴结的解剖位置与重要血管毗邻,如腹主动脉、下腔静脉、肠系膜上动脉等,这增加了手术的复杂性和风险^[26]。在清扫过程中,由于淋巴结与血管之间的紧密粘连或肿瘤浸润,分离时极易造成血管壁的损伤,尤其是静脉壁较薄,更易发生撕裂。一旦血管损伤,可能导致术中大量出血,甚至危及生命。因此,精准切除病灶的同时减少正常的健康组织的损伤是精准医疗的重要目标,在淋巴结清扫的过程中既需要保证清扫的彻底性,也需要不损伤附近的血管。因此,准确地定位淋巴结和血管相当重要。这要求我们对血管和淋巴结分别进行清晰成像,以实现淋巴结切除手术精准导航。

近年来,NIR 荧光成像发展迅速,具有无创且无放射性的特点,可作为一种极具潜力的可视化手段应用于手术导航。临床上常用的荧光探针有 ICG 和 MB。其中,MB 作为通过 FDA 认证的染料,已广泛

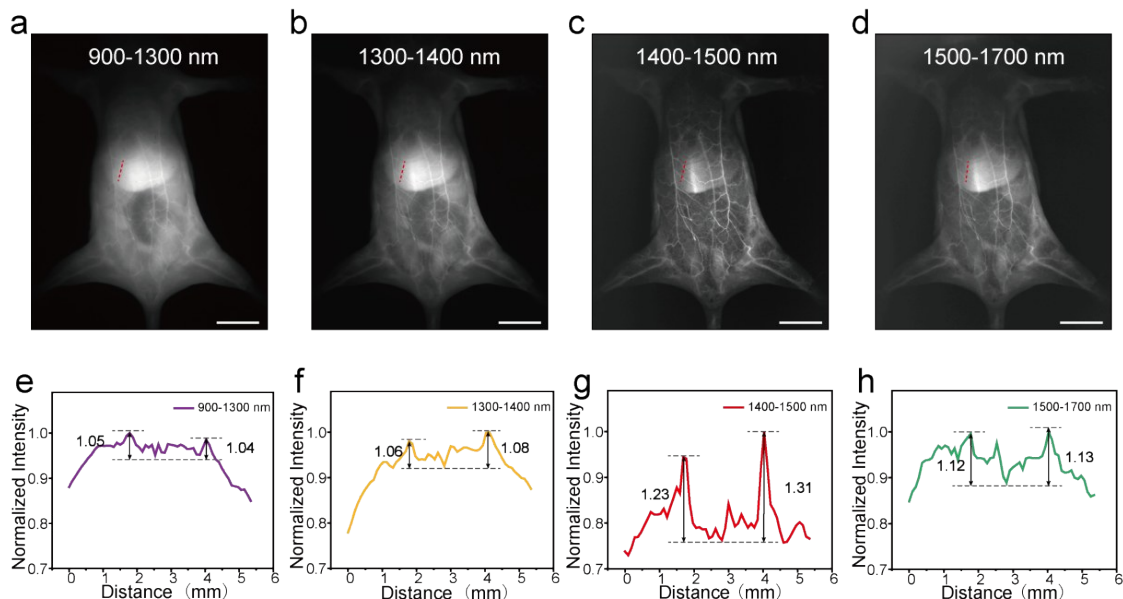


图3 小鼠全身血管 NIR-II 荧光成像:同一只小鼠在(a)900-1300 nm(b)1300-1400 nm(c)1400-1500 nm(d)1500-1700 nm 波段的全身血管荧光成像。比例尺:10 mm。(f-h)沿(a-d)中红色虚线处两条血管的截面荧光强度分布及相应的 SBR 分析。

Figure. 3 NIR-II fluorescence imaging of whole-body vasculature in mice. : Whole-body vascular fluorescence Imaging of the same mouse in the bands of (a) 900-1300 nm, (b) 1300-1400 nm, (c) 1400-1500 nm, (d) 1500-1700 nm. Scale bar: 10 mm. (f-h) Cross-sectional fluorescence intensity profiles of the two vessels along the red dashed line in (a-d) and the corresponding SBR.

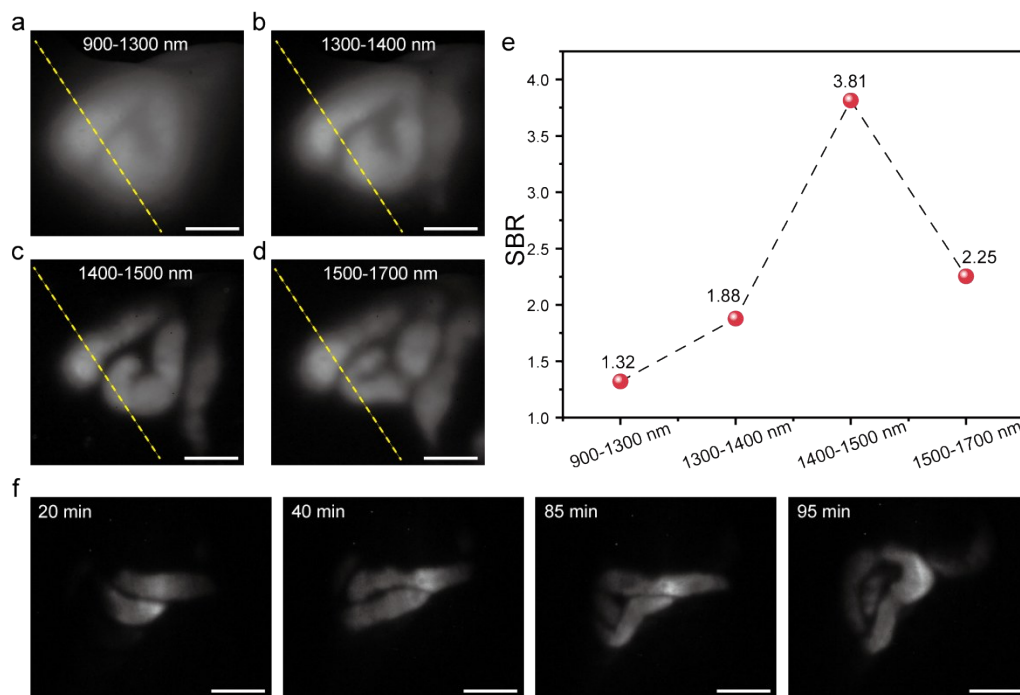


图4 小鼠肠道NIR-II荧光成像:同一小鼠在(a)900–1300 nm, (b)1300–1400 nm, (c)1400–1500 nm, (d)1500–1700 nm波段的肠道荧光成像。(e)各波段沿着黄色虚线处的SBR分析。比例尺:5 mm。(f)同一小鼠在灌胃不同时间后(20 min, 40 min, 85 min, 95 min)不同形态的肠道NIR-IIx荧光成像。比例尺:10 mm。

Fig. 4 NIR-II fluorescence imaging of mouse intestine. : Intestinal fluorescence imaging of the same mouse in the bands (a) 900–1300 nm, (b) 1300–1400 nm, (c) 1400–1500 nm, and (d) 1500–1700 nm. (e) SBR analysis for each band along the yellow dashed line. Scale bar: 5 mm. (f) The fluorescence imaging in the NIR-IIx window of the different morphologies of the intestine of the same mouse at different times after gavage (20 min, 40 min, 85 min, 95 min). Scale bar: 10 mm.

用于多类型手术中,如乳腺癌、宫颈癌治疗中前哨淋巴结的定位等^[27, 28]。然而,MB的潜力远不止于此。MB不仅在可见光范围内具有显著的吸收特性,同时还表现出近红外荧光^[18]。我们对MB@水溶液进行了吸收光谱的测量,如图5a所示。根据其吸收谱线,我们选用665 nm激光作为激发光,测试其荧光光谱,如图5b所示,MB的荧光发射拖尾可覆盖至NIR-II。我们进一步对装有对MB@水溶液(1 mg/mL)的离心管进行900–1300 nm波段的荧光成像,发现其有着较强的荧光信号。因此,我们选用通过FDA认证的ICG和MB作为荧光染料,进行具有临床转化价值的高质量NIR-II双通道成像。

我们对小鼠后肢两足垫各注射约50 μ L的MB水溶液(1 mg/mL),注射约五分钟后使用665 nm连续激光激发探针,对小鼠淋巴结进行900–1300 nm成像,得到图5b。在不移动小鼠位置的情况下,对小鼠眼眦注射200 μ L的ICG水溶液(1 mg/mL),使用793 nm连续激光激发探针,对小鼠全身血管进行1400–1500 nm成像,得到图5c。利用软件(Image J)

融合两幅荧光图像,可以得到如图5d所示的淋巴结和血管的双通道图像。

通过融合后的双通道图像,我们不仅可以清晰地观察到小鼠皮下淋巴结与淋巴管的形态与位置,还能直接获得其与血管的相对位置。两个成像通道成像清晰且无串扰,可以识别直径约0.53 mm的细小血管及直径约1.05 mm的淋巴结。因此,我们使用MB和ICG两款临床可用探针进行的NIR-II双通道成像,可以实现淋巴结和血管的清晰成像及准确区分,对淋巴结清扫术的手术导航具备一定的指导意义。

3 结论

在本研究中,我们利用通过FDA认证的临床可用荧光探针,对NIR-IIx波段的水吸收特性及其在活体成像中的应用进行了探索,进一步证明了该波段在临床领域的潜力。理论上,当信号足够克服吸收带来的衰减时,吸收会率先抑制光程更长的多重散射光子,从而提高图像的对比度,我们利用Monte Carlo模拟验证了NIR-IIx的独特成像优势。活体实

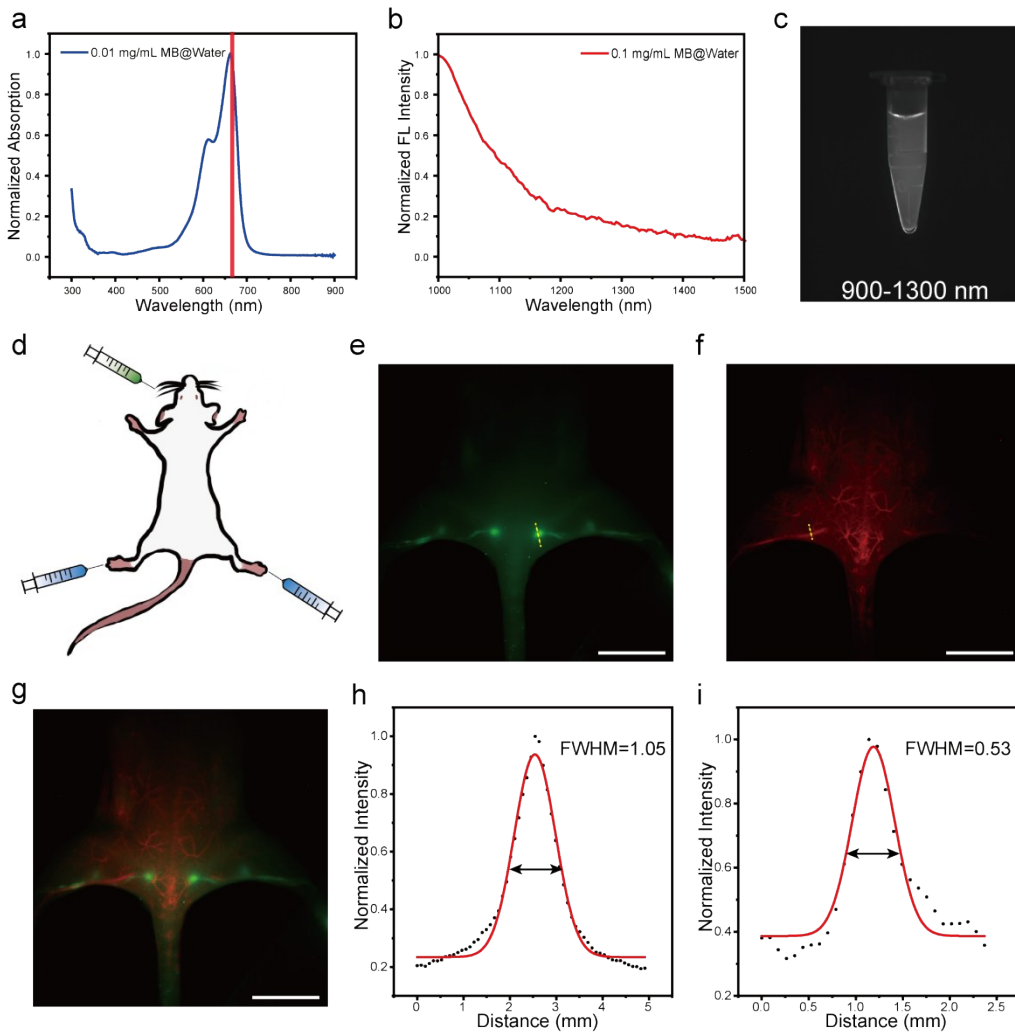


图5 小鼠淋巴结和血管的双通道成像:(a)MB@水溶液(0.01 mg/mL)的归一化吸收光谱。(b)MB@水溶液(0.1 mg/mL)的1000 nm后的归一化发射光谱。(c)在665 nm激光激发下,MB@水溶液(1 mg/mL)在900–1300 nm范围内的荧光成像。(d)小鼠注射操作示意图。(e)小鼠足垫注射MB水溶液,在665 nm激光激发下进行900–1300 nm淋巴结成像结果。(f)小鼠眼眦注射ICG水溶液,在793 nm激光激发下进行1400–1500 nm血管成像结果。(g)图(e)与图(f)的融合双通道图像。(h)沿着图(e)中黄色虚线处淋巴结的截面荧光强度分布。(i)沿着图(f)中黄色虚线处血管的截面荧光强度分布。比例尺:10 mm。

Fig. 5 Dual-channel imaging of lymph nodes and blood vessels in mice. : (a) Normalized absorption spectrum of MB@water (0.01 mg/mL). (b) Normalized emission spectrum of MB@water (0.1 mg/mL) beyond 1000 nm. (c) Fluorescence imaging of MB@water (1 mg/mL) in the 900–1300 nm range under 665 nm laser excitation. (d) Schematic diagram of mouse injection operation. (e) Mouse lymph node imaging at 900–1300 nm performed under 665 nm laser excitation after injection of MB aqueous solution into the footpad. (f) 1400–1500 nm mouse vascular imaging performed under 793 nm laser excitation after injection of ICG aqueous solution in mouse eye canthus. (g) The merged dual-channel image of Fig. (e) and Fig. (f). (h) Cross-sectional fluorescence intensity distribution of lymph nodes along the yellow dashed line in Figure (e). (i) Cross-sectional fluorescence intensity distribution of blood vessels along the yellow dotted line in Figure (f). Scale bar: 10 mm.

验中,我们利用ICG荧光染料,成功实现了高对比度的NIR-IIx活体小鼠血管成像。此外,我们对小鼠肠道进行成像,获得了边缘清晰且高对比度的NIR-IIx活体成像结果。我们相信,这将进一步推动NIR-II窗口在临床荧光导航手术中的转化。进一步地,我们还利用MB和ICG两种荧光染料实现了无串扰、高质量的NIR-II双通道荧光成像,成功精

准定位了血管和淋巴结。值得一提的是,所用的染料MB和ICG均通过FDA临床认证,可为NIR-II荧光成像在临床手术导航中的应用提供一定的指导。

References

- [1] Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, et al. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging [J]. *Cancer*, 2009, 115 (11): 2491–

- 2504.
- [2] Pesce A, Piccolo G, Lecchi F, et al. Fluorescent cholangiography: an up-to-date overview twelve years after the first clinical application[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2021, 27(36): 5989.
- [3] Cassinotti E, Boni L, Baldari L. Application of indocyanine green (ICG)-guided surgery in clinical practice: lesson to learn from other organs—an overview on clinical applications and future perspectives[J]. *Updates in Surgery*, 2023, 75(2): 357–365.
- [4] Smith A M, Mancini M C, Nie S. Second window for in vivo imaging[J]. *Nature nanotechnology*, 2009, 4(11): 710–711.
- [5] Feng Z, Tang T, Wu T, et al. Perfecting and extending the near-infrared imaging window[J]. *Light: Science & Applications*, 2021, 10(1): 197.
- [6] 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): 723–730.
- [7] 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): 259–271.
- [8] Qu Q, Nie H, Hou S, et al. Visualisation of pelvic autonomic nerves using NIR-II fluorescence imaging[J]. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2022, 49(13): 4752–4754.
- [9] Fan X, Yang J, Ni H, et al. Initial Experience of NIR-II Fluorescence Imaging-Guided Surgery in Foot and Ankle Surgery[J]. *Engineering*, 2024, 40: 19–27.
- [10] Diao S, Blackburn J L, Hong G, et al. Fluorescence imaging in vivo at wavelengths beyond 1500 nm[J]. *Angewandte Chemie*, 2015, 127(49): 14971–14975.
- [11] Tanzid M, Hogan N J, Sobhani A, et al. Absorption-induced image resolution enhancement in scattering media[J]. *Acs Photonics*, 2016, 3(10): 1787–1793.
- [12] Carr J A, Aellen M, Franke D, et al. Absorption by water increases fluorescence image contrast of biological tissue in the shortwave infrared[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, 115(37): 9080–9085.
- [13] Wu T, Wang Y, Lin H, et al. A Pervasive Approach for Determining the Optimal Tissue Windows for Near-Infrared Fluorescence Imaging[J]. *Laser & Photonics Reviews*, 2025, 19(1): 2400628.
- [14] Benayas A, Hemmer E, Hong G, et al. Near infrared-emitting nanoparticles for biomedical applications [M]. City: Springer, 2020.
- [15] Nagaya T, Nakamura Y A, Choyke P L, et al. Fluorescence-guided surgery[J]. *Frontiers in oncology*, 2017, 7: 314.
- [16] 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): 6623–6629.
- [17] 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): 9126–9134.
- [18] Xue D, Wu D, Lu Z, et al. Structural and functional NIR-II fluorescence bioimaging in urinary system via clinically approved dye methylene blue[J]. *Engineering*, 2023, 22: 149–158.
- [19] Feng Z, Li Y, Chen S, et al. Engineered NIR-II fluorophores with ultralong-distance molecular packing for high-contrast deep lesion identification[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 5017.
- [20] Wang X, Teh C S, Ishizawa T, et al. Consensus guidelines for the use of fluorescence imaging in hepatobiliary surgery[J]. *Annals of surgery*, 2021, 274(1): 97–106.
- [21] Khalafi S, Botero Fonnegra C, Reyes A, et al. Developments in the Use of Indocyanine Green (ICG) Fluorescence in Colorectal Surgery[J]. *Journal of clinical medicine*, 2024, 13(14): 4003.
- [22] Mahgoub S, Saad R, Vashisht A, et al. “The Green Peace” How ICG can prevent complications In endometriosis surgery[J]. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2024: 102505.
- [23] Egloff-Juras C, Bezdtnaya L, Dolivet G, et al. NIR fluorescence-guided tumor surgery: new strategies for the use of indocyanine green[J]. *International journal of nanomedicine*, 2019: 7823–7838.
- [24] Bonenkamp J, Hermans J, Sasako M, et al. Extended lymph-node dissection for gastric cancer[J]. *New England Journal of Medicine*, 1999, 340(12): 908–914.
- [25] Ariyan C. Complete lymph node dissection in melanoma[J]. *The Lancet Oncology*, 2016, 17(6): 688–689.
- [26] Alitalo K. The lymphatic vasculature in disease[J]. *Nature medicine*, 2011, 17(11): 1371–1380.
- [27] Tummers Q R, Verbeek F P, Schaafsma B E, et al. Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and Methylene Blue[J]. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2014, 40(7): 850–858.
- [28] Venkata V L V, Hulikal N, Chowhan A K. Effectiveness of sentinel lymph node biopsy and bilateral pelvic nodal dissection using methylene blue dye in early-stage operable cervical cancer—A prospective study[J]. *Cancer Treatment and Research Communications*, 2024, 39: 100816.