

## 近红外二区小动物活体荧光成像系统的研制\*

邬丹丹<sup>1)</sup> 潘力<sup>2)</sup> 周哲<sup>1)</sup> 付威威<sup>1)2)†</sup> 朱海龙<sup>2)</sup> 董月芳<sup>1)‡</sup>

1) (中国科学院苏州生物医学工程技术研究所, 医学影像技术研究室, 苏州 215163)

2) (苏州国科视清医疗科技有限公司, 苏州 215163)

(2023年12月4日收到; 2024年1月4日收到修改稿)

近年来, 小动物活体荧光成像系统被广泛应用于生物医学成像研究. 但是, 现有的荧光成像系统存在穿透深度有限、图像信噪比低等缺点. 因此, 利用近红外二区 (near-infrared-II, NIR-II, 900—1880 nm) 荧光成像技术在生物组织中具有的低吸收、低散射和穿透深度深等优点, 研制出一套 NIR-II 小动物活体荧光成像系统, 提出了一种荧光图像增强校正方法, 并设计生物组织模拟实验和活体动物实验测试该系统的性能和成像效果. 实验结果表明, 该系统具有穿透深度深、信噪比高、灵敏度高等优点. 结合商用的吲哚菁绿试剂和聚集诱导发光染料, 该系统可实时监测小鼠体内的血管分布情况, 并对深层组织器官进行持续监测, 实现活体小鼠清醒状态下的动态监测研究, 有助于推动生物医学成像领域的肿瘤研究和药物开发研究等进入一个新阶段.

**关键词:** 成像系统, 荧光成像, 近红外二区, 活体小动物**PACS:** 87.85.Pq, 07.05.Pj, 87.57.-s, 87.63.lm**DOI:** 10.7498/aps.73.20231910

## 1 引言

光学成像技术通过利用光线在生物组织内的传播特性, 实现对生物组织的实时监测, 具有无电离辐射、安全性高、可视化等优势. 活体光学成像主要包括生物发光成像和荧光成像, 其中生物发光是通过荧光素酶基因标记细胞或活体动物, 利用其产生的蛋白酶与底物荧光素发生生物化学反应, 产生光学信号; 荧光成像是通过荧光蛋白、荧光染料、量子点及稀土纳米粒子等进行标记, 利用外界光源激发产生荧光信号. 相比生物发光成像, 荧光成像技术的标记能力和光学信号更强, 可以实时监测活体动物体内的基因和细胞变化, 具有高分辨率、非侵入、操作简单、成像直观、无创等显著优点<sup>[1,2]</sup>, 广泛应用于肿瘤研究、基因表达研究、药物开发研究等.

传统的荧光成像位于可见光波段 (400—760 nm), 此波段内生物组织存在严重的自身荧光, 并且对光子的吸收和散射作用较强, 导致荧光成像的信噪比和穿透深度较低 (1—2 mm), 难以获取活体动物体内深层组织的生物信息<sup>[3]</sup>. 当荧光成像窗口扩展到近红外一区 (near-infrared-I, NIR-I, 760—900 nm), 生物组织对光的吸收和散射作用以及生物组织的自身荧光有所降低, 提高了 NIR-I 荧光成像的穿透深度, 但是仍未满足临床应用需求<sup>[4]</sup>. 2009年, Welsher 等<sup>[5]</sup>通过检测“交换”单壁碳纳米管的固有近红外光致发光, 首次实现了大于 1000 nm 的近红外活体荧光成像. 从此, 近红外二区 (near-infrared-II, NIR-II, 900—1880 nm) 活体荧光成像成为研究的一大热点<sup>[6-8]</sup>. 与可见光和 NIR-I 荧光成像相比, NIR-II 荧光成像由于光子波长更长, 进一步抑制了光在生物组织内传播时的吸收和散射作用, 并且生物组织的自身荧光也随着波长的增大

\* 国家重点研发计划 (批准号: 2023YFF0713600) 资助的课题.

† 通信作者. E-mail: fuww@sibet.ac.cn

‡ 通信作者. E-mail: dongyf@sibet.ac.cn

显著下降<sup>[9]</sup>, 因此 NIR-II 荧光成像的深度大大提高、分辨率和信噪比也较高, 更利于活体动物体内深层组织的生物信息监测<sup>[10]</sup>.

近年来, 随着荧光探针和成像仪器的不断开发和改进, 研究者们围绕 NIR-II 活体荧光成像在生物医学成像领域进行了丰富的科学探索和应用研究, 如美国国立卫生研究院陈小元教授团队<sup>[11]</sup>开发了一种多重 NIR-II 活体成像系统, 利用具有显著抑制的光子散射和零自发荧光的 NIR-II 探针实现转移性肿瘤的可视化; 浙江大学钱骏教授团队与舜宇光学公司合作开发了一种正置 NIR-II 荧光显微成像系统, 已应用于宫颈癌治疗<sup>[12]</sup>等领域. 本文基于 NIR-II 荧光成像的原理机制, 自主研制了一套 NIR-II 荧光成像系统. 利用商用的吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 试剂和聚集诱导发光 (aggregation-induced emission, AIE) 染料, 通过小鼠实验实际验证该系统的荧光成像效果. 结果表明, 该系统具有穿透深度深、信噪比高、灵敏度高的优点, 可以实时监测小鼠体内的血管网络分布, 对小鼠的深层组织器官进行长期监测, 实现活体小鼠清醒状态下的动态监测研究.

## 2 NIR-II 活体荧光成像

### 2.1 荧光成像的原理机制

荧光是一种光致发光的冷发光现象, 如图 1 所示, 荧光物质受到外界光源激发, 当光子的能量为分子中某两个能级间的能量差时, 荧光物质的核外电子会吸收能量, 从基态的最低振动能级跃迁到能量较高的高能级 (第一或第二激发单重态中各个不同振动-转动能级), 此时电子处于不稳定的激发态, 会通过内部转换和振动弛豫等非辐射跃迁的方式快速降落至激发单重态的最低振动能级, 随后通过辐射跃迁的方式从最低振动能级返回基态, 以光子形式释放能量, 发射出荧光信号. 荧光信号在生物组织内经过吸收和散射作用后, 被光学探测器捕获, 经过放大处理后传输到电脑中, 得到荧光图像, 这就是荧光成像的原理.

显然, 荧光成像的关键点在于荧光物质和荧光信号的采集及处理. 通常, 利用光学探测器将光信号转换为便于存储和处理的电信号, 实现荧光信号的采集及处理. 传统的光学探测器是硅基探测器, 具有制造工艺成熟和可靠性高等优点<sup>[13]</sup>, 但是灵

敏度较差, 并且硅的带隙能量 (1.124 eV) 导致硅基探测器的响应波长通常不高于 1100 nm, 局限在可见光和 NIR-I 波段. 为了扩展光学探测器的响应波长, 近年来出现了使用飞秒激光等技术制备的黑硅探测器<sup>[14-16]</sup>、窄带隙半导体合金碲镉汞 (mercury cadmium telluride, HgCdTe) 探测器<sup>[17]</sup>以及短波红外铟镓砷 (indium gallium arsenide, InGaAs) 探测器. 其中, 黑硅探测器在红外波段的响应度仍然未能满足应用需求, HgCdTe 探测器的制造成本高, 需要工作在低温条件下<sup>[18]</sup>, 并且 HgCdTe 材料对人体的毒性很大, 因此应用局限性较大; InGaAs 探测器的响应波长范围为 900—1700 nm, 具有工艺成熟、高量子效率、低功耗、低成本等优点, 广泛应用于生物医学成像、空间遥感、天文等领域<sup>[19,20]</sup>, 可以实现高分辨率、高灵敏度的 NIR-II 荧光成像.

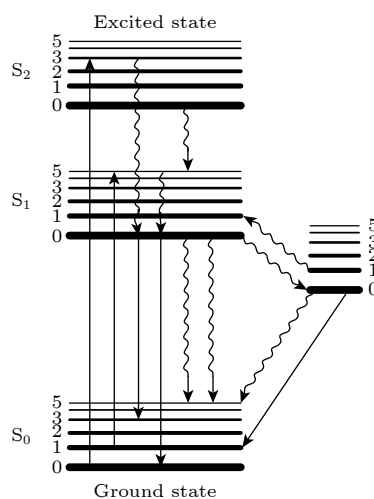


图 1 荧光成像示意图

Fig. 1. Schematic diagram of fluorescence imaging.

### 2.2 NIR-II 荧光成像的独特优势

生物组织是一种混浊介质, 光子在其中传播时同时存在着吸收和散射作用, 如图 2 所示. 光在生物组织内的吸收和散射作用会导致能量损耗, 衰减荧光信号, 其中, 光的吸收决定了荧光信号的强度能否被探测到, 而光的散射会降低荧光图像的清晰度<sup>[21]</sup>; 同时, 生物组织的自身荧光也会影响到荧光图像的信噪比和分辨率. 因此, 为了获取高质量的荧光成像效果, 应尽可能降低激发光在生物组织内的吸收和散射作用, 以及可忽略生物组织的自身荧光.

生物组织中光的吸收主要是由于水、血液中的脱氧血红蛋白 (deoxyhemoglobin, Hb) 和氧合血

红蛋白 (oxyhemoglobin, HbO<sub>2</sub>)、黑色素<sup>[22]</sup>等导致。在 NIR-II 波段, 除 1400—1500 nm 处存在的吸收峰外, 其他波段内的吸收均较小, 对荧光信号的衰减小。血红蛋白在可见光区域存在较高的吸收峰, 在 NIR-II 波段内的光吸收较小, 更利于荧光信号在生物组织内的传播<sup>[1]</sup>。在 400—1700 nm 范围内, 随着波长的增大, 不同生物组织 (如脑组织、皮下组织、肌肉) 的散射系数呈现出指数性降低的趋势<sup>[1]</sup>, 因此生物组织在 NIR-II 波段内的散射作用普遍较小, 几乎可以忽略不计。此外, 生物组织的自身荧光主要集中在可见光区域和 NIR-I 波段, 在 NIR-II 波段, 生物组织的自身荧光较小, 可以忽略不计<sup>[9]</sup>。综上, 相比可见光区域和 NIR-I 波段, 生物组织在 NIR-II 波段的吸收和散射作用较小, 并且可以忽略自身荧光, 因此 NIR-II 荧光成像具有更大的穿透深度、更高的图像信噪比, 更利于生物组织的深度成像检测。

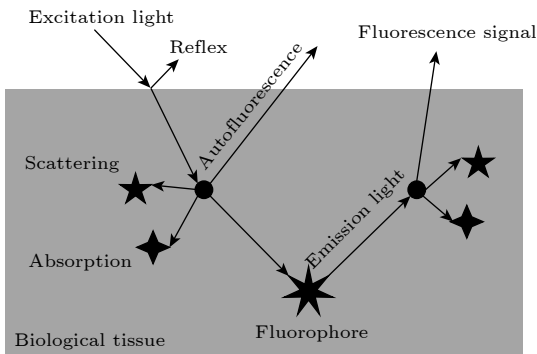


图 2 生物组织的吸收和散射作用

Fig. 2. Absorption and scattering of biological tissues.

### 3 NIR-II 荧光成像系统

#### 3.1 系统的设计搭建

基于荧光成像的原理机制, 采用反射型成像方式搭建 NIR-II 荧光成像系统, 其结构示意图如图 3(a) 所示, 活体小动物被固定在恒温台 (维持小动物生命体征) 上, 通过麻醉面罩对其进行持续麻醉, 小动物体内已注射荧光试剂或染料, 受到外界激发光源照射后发射出荧光信号。荧光信号经过生物组织的吸收和散射作用后到达组织表面, 再经过发射滤光片和镜头后被探测器接收, 最后传入电脑, 处理得到荧光图像。

本系统采用 InGaAs 探测器采集荧光信号, 该

探测器为 Raptor Photonics 公司生产的深度制冷近红外探测器, 光谱响应范围为 900—1700 nm, 制冷温度可达 -80 °C, 图像像素数量为 640×512 pixel, 像元尺寸为 15 μm, 成像速度最快可达 97 frames/s。激发光源采用 808 nm 高功率半导体激光器 (功率 0—15 W 可调, 功率稳定性 rms < 3%), 为了使激光器出射的光斑尺寸可以覆盖小鼠, 通过匀化镜头对其进行扩束和均匀处理, 处理后的均匀光斑直径超过 10 cm, 可满足小鼠成像尺寸要求。成像镜头采用优质低畸变短波红外镜头, 其焦距为 40 mm, 光圈范围为 F2.8—F16, 在 900—1400 nm 波段内透射率超过 94%。发射滤光片采用进口优质长波通滤光片, 截止深度 OD 值大于 5, 用于消除激发光源对发射荧光信号的干扰。最终设计搭建的 NIR-II 荧光成像系统的三维效果图如图 3(b) 所示。

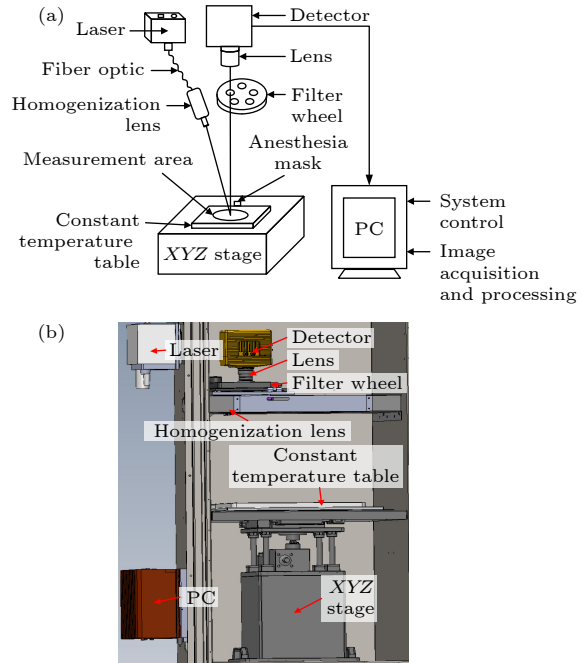


图 3 NIR-II 荧光成像系统 (a) 系统结构示意图; (b) 系统三维效果图

Fig. 3. NIR-II fluorescence imaging system: (a) Schematic diagram of system; (b) 3D design of system.

荧光探针作为荧光成像的关键要素, 以荧光物质作为指示剂, 通常由识别基团、荧光基团及连接臂组成。目前, NIR-II 荧光探针可以分为无机和有机两大类, 与无机荧光探针相比, 有机荧光探针具有生物相容性高、毒性小、光学特性可调等优点。有机荧光探针主要包括小分子荧光探针、聚集诱导发光纳米颗粒和共轭聚合物, 其中小分子荧光探针

具有高灵敏度、低毒性、较高的临床转化潜力等显著优点<sup>[23]</sup>. 比如, NIR-I 小分子荧光探针 ICG 已经通过美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 的认证, 被广泛应用于临床研究. 近年来, 研究者们发现 ICG 具有较强的 NIR-II 拖尾荧光发射, 为 NIR-II 荧光成像的临床应用提供了新的研究方向<sup>[24]</sup>. 此外, 为解决有机荧光团常发生的聚集荧光猝灭 (aggregation-caused quenching, ACQ) 问题, 2001 年, 唐本忠院士团队<sup>[25]</sup>提出了 AIE 的概念, 此后 AIE 分子的设计和开发成为研究的一大热点. 相比传统的荧光染料, AIE 荧光染料具有高亮度、光稳定性强、生物安全性高等优点. 近年来, 可用于 NIR-II 荧光成像的 AIE 染料也逐渐被开发出来<sup>[26]</sup>. 因此, 本系统采用具有代表性的商用的 ICG 试剂 (USP 标准品, CAS NO.3599-32-4) 和 AIE 染料 (AIE1010 荧光纳米颗粒) 进行成像研究 (对其他染料同样适用, 如稀土材料、金属纳米团簇探针等, 已于系统前期研制过程中进行相关成像研究).

### 3.2 荧光信号采集与处理

荧光成像系统采集的原始荧光图像的对比度往往不高, 并且由于光源照射不均匀、热效应、探测器暗电流噪声和读出噪声等可能存在雾状噪声及背景噪声, 这些噪声会影响荧光图像的成像质量并干扰荧光信号的观测效果. 为了增强灰度图像显示效果, 去除图像噪声并尽可能保留有效荧光信号, 提出了一种荧光图像增强和校正方法, 具体流程如图 4(a) 所示. 实际应用中, 通常采用自动色阶

算法对荧光图像进行对比度拉伸, 增强灰度图像中的微弱荧光信号, 但是图像中存在较高灰度值的有效荧光信号时, 采用同一比例拉伸图像可能会导致过度增强现象, 损失部分有效荧光信号. 因此, 基于自动色阶算法提出自适应对比度拉伸算法, 其简要步骤如下.

1) 对原始荧光图像进行直方图统计, 计算得到各灰度级的像素个数及累积分布函数; 通过预设的截断比例对直方图进行左右截断, 剔除相应的图像像素; 统计截断后图像数据中的最小和最大灰度值, 分别作为黑场阈值  $G_{\min}$  和白场阈值  $G_{\max}$ .

2) 当荧光图像中不存在较高灰度值的有效荧光信号时 (图像最大灰度值  $\text{Max}$  不超过灰度级  $\times 0.6$  时认为不存在), 将不超过  $G_{\min}$  的像素灰度值置为 0, 其他像素灰度值拉伸至  $[0, M]$  范围,  $M$  为图像灰度级.

3) 当荧光图像中存在较高灰度值的有效荧光信号时 (图像最大灰度值  $\text{Max}$  大于灰度级  $\times 0.6$  时认为存在), 通过迭代阈值法计算得到原始荧光图像的最优阈值  $G_t$ , 将其与白场阈值  $G_{\max}$  的均值设为  $C_1$ , 并定义  $C_2 = G_t \times 1.5$ ,  $C_2$  在  $(G_{\min}, G_{\max})$  范围内时将  $C_2$  作为中间阈值  $G_{\text{mid}}$ ; 反之,  $G_t$  在  $(G_{\min}, G_{\max})$  范围内时将  $C_1$  作为  $G_{\text{mid}}$ ,  $G_t$  未在  $(G_{\min}, G_{\max})$  范围内时将  $G_{\min}$  与  $G_{\max}$  的均值作为  $G_{\text{mid}}$ . 定义  $V_{\text{mid}} = M \times (G_{\text{mid}} - G_{\min}) / (G_{\max} - G_{\min})$ , 适当放大  $V_{\text{mid}}$  后作为  $G_{\text{mid}}$  的映射灰度值  $G_{\text{point}}$ , 根据经验将放大系数定为 1.2. 将不超过  $G_{\min}$  的像素灰度值置为 0,  $(G_{\min}, G_{\text{mid}}]$  范围内的像素灰度值拉伸至  $(0, G_{\text{point}}]$  范围,  $(G_{\text{mid}}, G_{\max})$

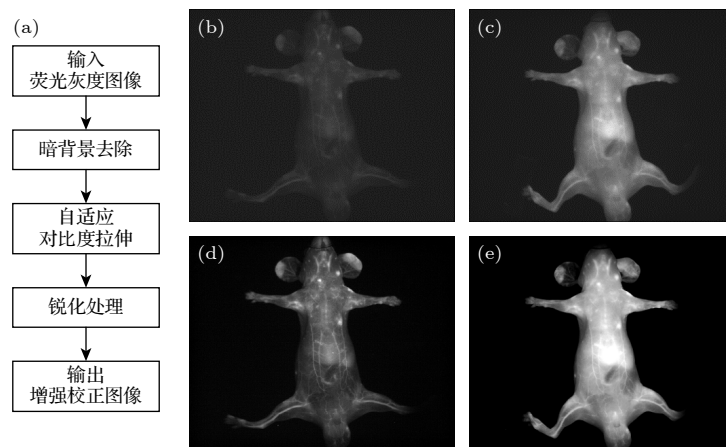


图 4 荧光图像处理 (a) 流程图; (b) 原始低荧光图像; (c) 原始高荧光图像; (d) 图 (b) 的增强图像; (e) 图 (c) 的增强图像

Fig. 4. Fluorescence image processing: (a) Flow chart; (b) original low fluorescence image; (c) original high fluorescence image; (d) enhanced image of Fig. (b); (e) enhanced image of Fig. (c).

范围内的像素灰度值拉伸至  $(G_{\text{point}}, M)$  范围, 不小于  $G_{\text{max}}$  的像素灰度值设置为  $M$ .

针对不同灰度分布的荧光图像进行自适应对比度拉伸, 可以较好地增强灰度图像中的微弱荧光信号, 提升灰度图像中荧光信号的整体亮度, 并避免由于过度拉伸导致部分荧光信号过度增强的情况, 优化荧光信号观测效果. 此外, 为了去除荧光图像中的背景噪声, 通常在当前曝光时间下采集暗

背景图像, 将原始荧光图像与之相减实现暗背景快速扣除. 实际应用中, 为了提高图像处理效率, 取最优阈值  $G_t$  的一半作为背景值  $\text{dark}$ , 以扣除图像背景, 并保留低荧光信号.

当荧光图像中不存在较高灰度值的有效荧光信号时, 将背景值  $\text{dark}$  融入拉伸算法模型, 此时图像处理的数学模型如 (1) 式所示, 其中  $\max(G_{\text{min}}, \text{dark})$  是  $G_{\text{min}}$  和  $\text{dark}$  中的较大值:

$$g_1(x, y) = \begin{cases} 0, & f(x, y) \leq \max(G_{\text{min}}, \text{dark}) \\ \frac{M}{\text{Max} - \max(G_{\text{min}}, \text{dark})} \times [f(x, y) - \max(G_{\text{min}}, \text{dark})], & f(x, y) > \max(G_{\text{min}}, \text{dark}) \end{cases} \quad (1)$$

当荧光图像中存在较高灰度值的有效荧光信号时, 将背景值  $\text{dark}$  融入拉伸算法模型, 此时图像处理的数学模型如 (2) 式所示:

$$g_2(x, y) = \begin{cases} 0, & f(x, y) \leq \max(G_{\text{min}}, \text{dark}) \\ \frac{G_{\text{point}}}{G_{\text{mid}} - \max(G_{\text{min}}, \text{dark})} \times [f(x, y) - \max(G_{\text{min}}, \text{dark})], & \max(G_{\text{min}}, \text{dark}) < f(x, y) \leq G_{\text{mid}} \\ \frac{M - G_{\text{point}}}{G_{\text{max}} - G_{\text{mid}}} \times [f(x, y) - G_{\text{max}}] + M, & G_{\text{mid}} < f(x, y) < G_{\text{max}} \\ M, & f(x, y) \geq G_{\text{max}} \end{cases} \quad (2)$$

另外, 通过二阶微分的拉普拉斯锐化算法去除荧光图像中的雾状噪声, 增强图像的边缘及灰度跳变的部分, 突出图像细节使图像更为清晰, 进一步优化荧光信号观测效果. 将拉伸图像  $g(x, y)$  和拉普拉斯图像  $\nabla^2 g(x, y)$  叠加, 实现图像锐化增强, 并保留图像背景信息. 为了最优化图像锐化效果, 引入可调系数锐化度  $s$ , 将其与拉普拉斯图像  $\nabla^2 g(x, y)$  相乘后, 再叠加拉伸图像  $g(x, y)$  得到锐化图像  $l(x, y)$ , 表达式为

$$l(x, y) = g(x, y) + s \times \nabla^2 g(x, y). \quad (3)$$

锐化度  $s$  的取值需合理, 以免图像轮廓产生过冲或者图像锐化效果不明显. 其中, 二维函数  $g(x, y)$  的拉普拉斯算子表示为

$$\begin{aligned} \nabla^2 g(x, y) &= \frac{\partial^2 g}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 g}{\partial y^2} = 8 \times g(x, y) \\ &- g(x-1, y-1) - g(x, y-1) - g(x+1, y-1) \\ &- g(x-1, y) - g(x+1, y) - g(x-1, y+1) \\ &- g(x, y+1) - g(x+1, y+1). \end{aligned} \quad (4)$$

对应的滤波模板为  $\begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 8 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{bmatrix}$ , 是一种

对于  $45^\circ$  旋转各向同性的滤波器.

采用上述荧光增强和校正方法分别对如图 4(b), (c) 所示的原始荧光图像进行处理, 获得如图 4(d), (e) 所示的荧光增强图像. 可以明显看出, 处理后的图像更有利于荧光信号观测, 背景更为干净, 并去除了雾状噪声. 对处理前后的荧光图像进行量化评价指标分析, 结果见表 1. 不难得出, 本文提出的荧光增强和校正方法可以大幅提高荧光图像的清晰度, 突出荧光信号, 提供更优的显示效果.

表 1 图像量化评价指标对比

Table 1. Comparison of image quantitative evaluation indicators.

评价指标	清晰度		标准差	
原始低/高荧光图像	352.7	517.4	2399.9	10294.3
处理后低/高荧光图像	2520.6	723.0	8440.6	17042.3

### 3.3 系统的性能测试

#### 3.3.1 系统的穿透深度

为了测试本系统的穿透深度, 设计了生物组织模拟实验. 因为 Intralipid 与生物组织具有相似的吸收和散射特性, 所以采用 Intralipid 溶液制备凝

胶,用于模拟生物组织,具体制备方法如下:利用 Intralipid 溶液(体积比 0.6%)和琼脂糖粉末(质量比 0.4%)配制出混合溶液,持续加热使之充分混合,然后倒入定制的圆柱形玻璃器皿中,等待其冷却凝固成凝胶.如图 5(a)所示,一根毛细玻璃管(内径 1 mm)倾斜固定于玻璃器皿中,倾斜角度固定时,通过统计荧光图像中水平方向上可观测的像素数量,结合定制孔位高度差和玻璃器皿的内径及像素数量,可计算得到穿透深度.实物图如图 5(b)所示,玻璃管两端连接软管,通过蠕动泵控制软管内液体流动,管内液体采用浓度 1 mg/mL 的商用 ICG 试剂.使用本系统拍摄 Intralipid 凝胶,拍摄过程中可采用黑色哑光胶布遮挡玻璃器皿反光面,以避免影响荧光成像结果.采集得到的荧光图像经过伪彩处理后如图 5(c)所示,此时,相机曝光时间 300 ms,镜头光圈 F2.8,发射滤光片波长为 1000 nm,激光器功率为 8 W.通过统计可观测的像素数量,计算得到穿透深度约 10.88 mm.实验结果表明,本系统的穿透深度可以达到 10 mm 以上,可满足小动物活体荧光成像的应用需求.

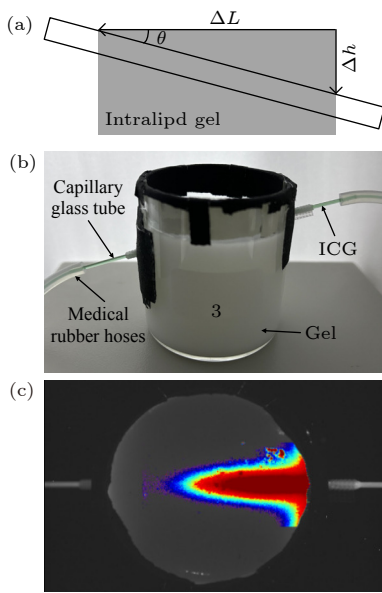


图 5 系统的穿透深度测试 (a) 示意图; (b) 实物图; (c) 伪彩图像

Fig. 5. Penetration depth testing of the system: (a) Schematic diagram; (b) physical diagram; (c) pseudo color image.

### 3.3.2 系统的信噪比

通过计算信噪比 (signal to noise ratio, SNR) 来评价系统的性能, SNR 定义为目标信号均值与背景标准差的比值,计算公式为

$$SNR = (\bar{s} - \bar{e})/\sigma$$

$$= \frac{\frac{1}{N_1} \sum_{n=1}^{N_1} s_n(x, y) - \frac{1}{N_2} \sum_{n=1}^{N_2} e_n(x, y)}{\sqrt{\frac{1}{N_2} \sum_{n=1}^{N_2} [e_n(x, y) - \bar{e}]^2}}, \quad (5)$$

其中,  $\bar{s}$  为目标区域的灰度均值,  $\bar{e}$  和  $\sigma$  分别为背景区域的灰度均值与标准差.为了测试本系统的 SNR,对上述凝胶表面进行拍摄,对采集得到的荧光图像勾选出目标区域和背景区域,按照 (5) 式计算得到 SNR.实验结果表明,本系统的荧光信噪比可以达到 52.33 dB,能够采集到高质量的荧光图像.

### 3.3.3 系统的灵敏度

为了测试本系统的成像灵敏度,针对 ICG 试剂设置梯度实验,对 12 组不同浓度的 ICG 试剂及空位进行成像测试.其中,第 1 组 ICG 试剂的质量浓度为 1 mg/mL,并将该浓度持续进行对半稀释以作为第 2 组至最后一组的试剂浓度.将多组试剂等剂量 (200  $\mu$ L) 放置于标准 96 孔板内,各组试剂间隔两个孔位,以避免试剂间成像影响.荧光成像时,相机曝光时间 800 ms,镜头光圈 F2.8,发射滤光片波长为 900 nm 和 1000 nm,激光器功率密度约 40 mW/cm<sup>2</sup>.由图 6 可知,在当前成像状态下,本

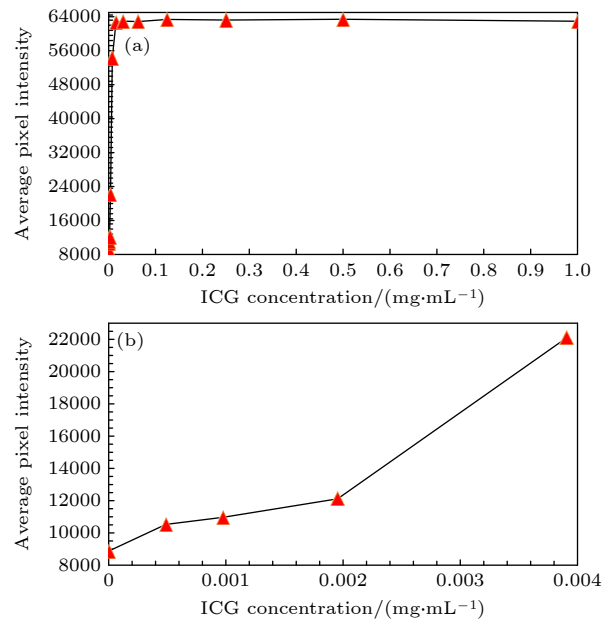


图 6 ICG 梯度实验 (a) 12 组的荧光信号强度分析; (b) 最后 4 组的荧光信号强度分析

Fig. 6. ICG gradient experiment: (a) Analysis of fluorescence signal intensity in 12 groups; (b) analysis of fluorescence signal intensity for the last 4 groups.

系统可探测到质量浓度为 0.00048828125 mg/mL 的 ICG 试剂. 该实验验证了本系统具有高灵敏度的优点.

## 4 动物实验

### 4.1 实验对象和方法

本实验使用的小鼠为 SPF 级别的 BALB/C 裸鼠和 KM 小鼠, 购买自斯贝福 (苏州) 生物技术有限公司, 6—8 周龄. 使用 KM 小鼠成像时, 为避免小鼠毛发对荧光成像结果造成干扰, 需利用剃毛膏在小鼠腹部清理出观测区域, 如图 7 所示. 剃毛后将小鼠静置一段时间, 等待其生理状态稳定后, 对其尾部静脉注射 200  $\mu$ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 ICG 试剂/AIE 染料. 注射完成后, 尽快将小鼠固定在系统载物台上, 并调整系统参数对其进行成像. 成像过程中, 对小鼠进行持续麻醉, 并可通过黑色胶带固定小鼠四肢, 以优化成像效果. 荧光成像时, 激光器功率应尽可能低 (由于光纤传输等造成的功率损耗, 本系统实测功率密度不超过 65 mW/cm<sup>2</sup>, 远低于激光产品的安全 GB 7247.1—2012 所规定的最大允许照射量 330 mW/cm<sup>2</sup>), 以避免对被测活体的本能行为产生影响. 实验过程中对小鼠的操作符合《实验动物管理条例》的相关要求及动物伦理学.



图 7 脱毛小鼠

Fig. 7. Depilatory mouse.

### 4.2 实验结果及分析

#### 4.2.1 血管分布监测

对脱毛小鼠尾部静脉注射 200  $\mu$ L 质量浓度为 1 mg/mL 的 ICG 试剂, 注射结束后, 采用本系统对小鼠进行荧光成像, 可观测到小鼠体内的血管分布情况, 如图 8(a) 所示, 此时, 相机曝光时间 12 ms, 镜头光圈 F2.8, 发射滤光片波长为 900 nm 和 1000 nm, 激光器功率为 8 W. 图 8(a) 为相机采集的原始荧光图像, 采用基于本系统提出的荧光增强校正算法对其进行处理, 得到如图 8(b) 所示的增强荧光图像. 对图 8(a), (b) 进行感兴趣区域 (region of interest, ROI) 选取, 如图 8(c) 所示, 并分别对图 8(a), (b) 进行 ROI 信背比分析, 得到

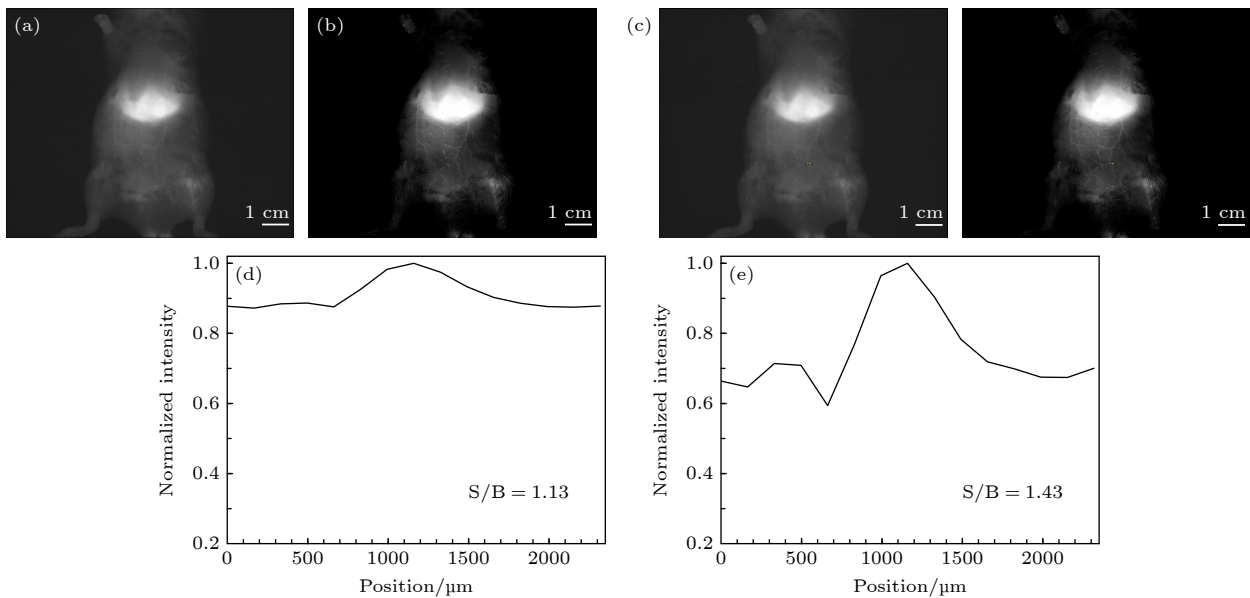


图 8 荧光成像 (a) 原始荧光图像; (b) 增强荧光图像; (c) ROI 选取示意图; (d) 图 (a) 的 ROI 信背比分析; (e) 图 (b) 的 ROI 信背比分析

Fig. 8. Fluorescence imaging: (a) Original fluorescence image; (b) enhanced fluorescence image; (c) schematic diagram of ROI selection; (d) ROI analysis of signal-to-back ratio in Fig. (a); (e) ROI analysis of signal-to-back ratio in Fig. (b).

图 8(d), (e). 可以看出, 增强处理后荧光图像的信背比有了明显提升, 增强图像更为突出了血管, 特别是细小血管, 有利于血管分布情况的成像监测.

#### 4.2.2 组织器官持续监测

对上述脱毛小鼠进行血管分布监测后 12 min 左右, 血管内荧光信号已基本消失 (出现漂白现象), ICG 分布到小鼠各组织器官, 并被肝脏摄取、代谢和排泄进入小肠, 此时采用本系统可以明显观测到小鼠的胃肠道蠕动, 如图 9 所示. 此时, 相机曝光时间 12 ms, 镜头光圈 F2.8, 发射滤光片波长为 900 nm 和 1000 nm, 激光器功率为 5 W. 实验结果表明, 本系统可以对小鼠肠道中的分布进行无

创、实时、可视化追踪, 实现对组织器官的持续监测, 为小鼠胃肠道蠕动的健康状态、胃肠动力障碍的诊断和评估、药物对肠梗阻的影响等研究提供有力的参考.

#### 4.2.3 清醒状态动态监测

对裸鼠尾部静脉注射 200  $\mu\text{L}$  质量浓度为 1 mg/mL 的 AIE 染料, 注射结束一段时间后, 将裸鼠放入高透明亚克力盒中, 并在亚克力盒内放入一只未注射荧光染料/试剂的空白鼠, 作为对照组, 在无需麻醉的条件下, 采用本系统实时动态监测两只裸鼠整体的荧光成像情况. 如图 10(a) 所示, 为本系统采集的原始荧光图像, 此时, 考虑到裸鼠的

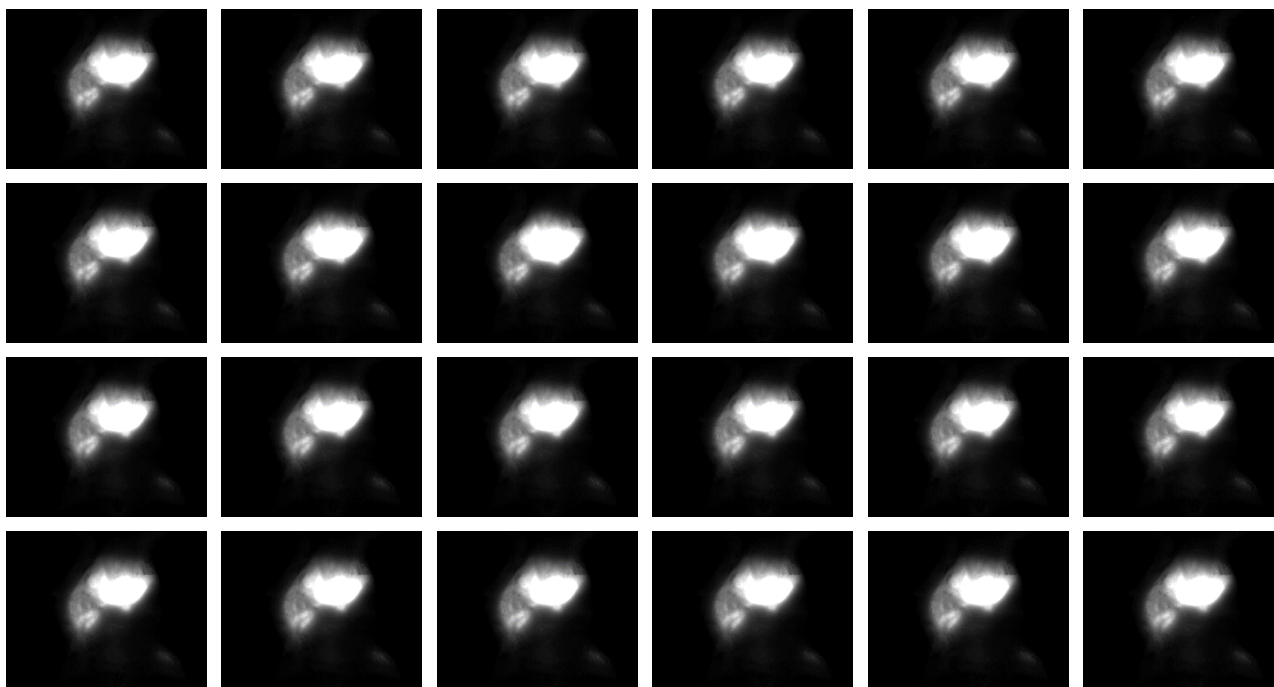


图 9 组织器官荧光成像持续监测结果

Fig. 9. Continuous monitoring results of tissue and organ fluorescence imaging.

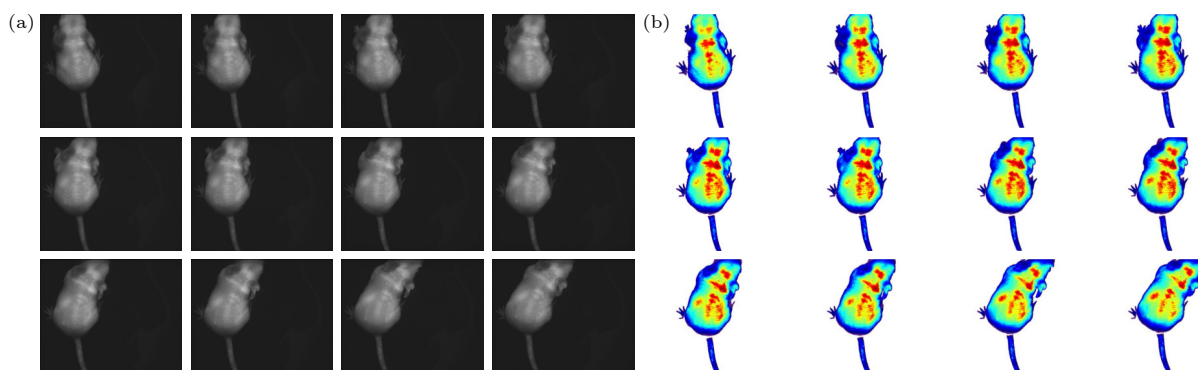


图 10 活体动物动态监测结果 (a) 原始荧光图像; (b) 伪彩增强图像

Fig. 10. Dynamic monitoring results of living animals: (a) Original fluorescence image; (b) pseudo color enhanced image.

自然运动状态 (移动、晃头等), 相机曝光时间设置为 9.8 ms, 镜头光圈 F2.8、景深约 20 mm (基本可覆盖活动裸鼠待观测区域厚度), 发射滤光片波长为 1000 nm, 激光器功率为 8 W. 如图 10(b) 所示, 为伪彩处理后的荧光图像. 可以明显看出, 空白鼠无明显荧光反应, AIE 染料裸鼠仍存在较强的荧光反应. 实验结果表明, 本系统可以较快的成像帧率动态监测活体动物的荧光成像情况, 实现活体动物在清醒状态下自由移动时的实时成像监测研究, 为活体动物的生物学成像研究提供非侵入、无需麻醉甚至安乐死的科学仪器.

## 5 结 论

利用 NIR-II 在生物组织中具有较大的穿透深度、较高的成像信噪比和灵敏度等特点, 自主研发开发了 NIR-II 小动物活体荧光成像系统, 采集得到高分辨率的荧光图像并处理分析, 提出了一种荧光增强和校正方法提高荧光图像的信背比和清晰度. 该系统具有较高的成像灵敏度、较快的成像速度及较高的系统集成度 (与市面上同类商业产品性能相似), 可同时进行 2—3 只小鼠的成像实验, 有助于提高科研成像效率. 与商用的 ICG 试剂和 AIE 染料等结合使用, 该系统可以对小鼠进行血管分布情况监测、深层组织器官监测以及清醒状态下的动态监测研究等, 可用于实时观察基因在活体动物体内的表达、肿瘤的发展过程、药物的治疗效果等, 有望在肿瘤疾病的早期诊断与治疗、药物研制开发等领域内广泛应用. 此外, 将结合显微成像或内窥成像进行系统跨尺度研究, 并结合光声/超声成像模块进行多模态成像研究等.

## 参考文献

- [1] Hong G S, Antaris A L, Dai H J 2017 *Nat. Biomed. Eng.* **1** 0010
- [2] Li C Y, Wang Q B 2018 *ACS Nano* **12** 9654
- [3] Cao J, Zhu B L, Zheng K F, He S G, Meng L, Song J B,

- Yang H H 2020 *Front. Bioeng. Biotech.* **7** 487
- [4] Miao Q Q, Pu K Y 2018 *Adv. Mater.* **30** 1801778
- [5] Welsher K, Liu Z, Sherlock S P, Robinson J T, Chen Z, Daranciang D, Dai H J 2009 *Nat. Nanotechnol.* **4** 773
- [6] Smith A M, Mancini M C, Nie S M 2009 *Nat. Nanotechnol.* **4** 710
- [7] Chang B S, Li D F, Ren Y, Qu C R, Shi X J, Liu R Q, Liu H G, Tian J, Hu Z H, Sun T L, Cheng Z 2022 *Nat. Biomed. Eng.* **6** 629
- [8] Wang T, Wang S F, Liu Z Y, He Z Y, Yu P, Zhao M Y, Zhang H X, Lu L F, Wang Z X, Wang Z Y, Zhang W A, Fan Y, Sun C X, Zhao D Y, Liu W M, Bunzli J C G, Zhang F 2021 *Nat. Mater.* **20** 1571
- [9] Diao S, Hong G S, Antaris A L, Blackburn J L, Cheng K, Cheng Z, Dai H J 2015 *Nano Res* **8** 3027
- [10] Zhang X N, Li S S, Ma H Z, Wang H, Zhang R P, Zhang X D 2022 *Theranostics* **12** 3345
- [11] Tian R, Ma H L, Zhu S J, Lau J, Ma R, Liu Y J, Lin L S, Chandra S, Wang S, Zhu X F, Deng H Z, Niu G, Zhang M X, Antaris A L, Hettie K S, Yang B, Liang Y Y, Chen X Y 2020 *Adv. Mater.* **32** 1907365
- [12] Alifu N, Ma R, Zhu L J, Du Z, Chen S, Yan T, Alimu G, Zhang L X, Zhang X L 2022 *J. Mater. Chem. B* **10** 506
- [13] Soref R A 1993 *P. IEEE* **81** 1687
- [14] Youngblood N, Chen C, Koester S J, Li M 2015 *Nat. Photonics* **9** 247
- [15] Hu F, Dai X Y, Zhou Z Q, Kong X Y, Sun S L, Zhang R J, Wang S Y, Lu M, Sun J 2019 *Opt. Express* **27** 3161
- [16] Yang Y, Zhao J H, Li C, Chen Q D, Chen Z G, Sun H B 2021 *Opt. Lett.* **46** 3300
- [17] Vallone M, Goano M, Bertazzi F, Ghione G, Schirmacher W, Hanna S, Figgemeier H 2016 *J. Electron. Mater.* **45** 4524
- [18] Martyniuk P, Rogalski A 2013 *B. Pol. Acad. Sci-Tech.* **61** 211
- [19] Li X, Gong H M, Fang J X, Shao X M, Tang H J, Huang S L, Li T, Huang Z C 2017 *Infrared Phys. Techn.* **80** 112
- [20] Singh A, Pal R 2017 *Appl. Phys. A* **123** 701
- [21] Feng Z, Tang T, Wu T X, Yu X M, Zhang Y H, Wang M, Zheng J Y, Ying Y Y, Chen S Y, Zhou J, Fan X X, Zhang D, Li S L, Zhang M X, Qian J 2021 *Light* **10** 197
- [22] Benayas A, Hemmer E, Hong G S, et al. 2020 *Near Infrared-emitting Nanoparticles for Biomedical Applications* (Cham: Springer) pp11–15
- [23] He Y, Wang S F, Yu P, Yan K, Ming J, Yao C Z, He Z Y, El-Toni A M, Khan A, Zhu X Y, Sun C X, Lei Z H, Zhang F 2021 *Chem. Sci.* **12** 10474
- [24] Zhang Z Y, He K S, Chi C W, Hu Z H, Tian J 2022 *EJNMMI* **49** 2531
- [25] Luo J D, Xie Z L, Lam J W Y, Cheng L, Chen H Y, Qiu C F, Kwok H S, Zhan X W, Liu Y Q, Zhu D B, Tang B Z 2001 *Chem. Commun.* **18** 1740
- [26] Zhu W, Kang M M, Wu Q, Zhang Z J, Wu Y, Li C B, Li K, Wang L, Wang D, Tang B Z 2021 *Adv. Funct. Mater.* **31** 2007026

# Development of NIR-II small animal living fluorescence imaging system\*

Wu Dan-Dan<sup>1)</sup> Pan Li<sup>2)</sup> Zhou Zhe<sup>1)</sup> Fu Wei-Wei<sup>1)2)†</sup>  
Zhu Hai-Long<sup>2)</sup> Dong Yue-Fang<sup>1)‡</sup>

1) (*Medical Imaging Technology Laboratory, Suzhou Institute of Biomedical Engineering Technology, Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China*)

2) (*Suzhou Guoke Shiqing Medical Technology Co., Ltd, Suzhou 215163, China*)

( Received 4 December 2023; revised manuscript received 4 January 2024 )

## Abstract

Fluorescence imaging technology can dynamically monitor gene and cell changing in live animals in real-time, with advantages such as high sensitivity, high resolution, and non-invasion. In recent years, it has been widely used in tumor research, gene expression research, drug development research, etc. The imaging wavelength of traditional fluorescence imaging technology falls in the visible and near-infrared-I region. Due to the absorption and scattering effects of light propagation in biological tissues, and the inherent fluorescence of biological tissues, traditional fluorescence imaging techniques still have significant limitations in penetration depth and image signal-to-noise ratio. In this work, a highly integrated near-infrared-II (NIR-II, 900—1880 nm) small animal living fluorescence imaging system is developed by taking the advantages of NIR-II fluorescence imaging technology, such as low absorption, low scattering, and deep penetration depth in biological tissues. And a method of enhancing and correcting fluorescence image is proposed to optimize fluorescence images. In this work, the biological tissue simulation experiments and live animal experiments are conducted to test the performance and imaging effect of the system. The experimental results show that the system has the advantages of deep penetration depth, high signal-to-noise ratio, and high sensitivity. Combined with commercial indocyanine green reagents and aggregation-induced emission dyes, this system can monitor the distribution of blood vessels in real time and continuously monitor deep tissues and organs in mice, and conduct the dynamically monitoring research in living mice in a conscious state. This helps to promote tumor research and drug development research in the field of biomedical imaging to enter a new stage.

**Keywords:** imaging system, fluorescence imaging, second near-infrared window, small living animal

**PACS:** 87.85.Pq, 07.05.Pj, 87.57.-s, 87.63.lm

**DOI:** [10.7498/aps.73.20231910](https://doi.org/10.7498/aps.73.20231910)

---

\* Project supported by the National Key R&D Program of China (Grant No. 2023YFF0713600).

† Corresponding author. E-mail: [fuww@sibet.ac.cn](mailto:fuww@sibet.ac.cn)

‡ Corresponding author. E-mail: [dongyf@sibet.ac.cn](mailto:dongyf@sibet.ac.cn)

## 近红外二区小动物活体荧光成像系统的研制

邬丹丹 潘力 周哲 付威威 朱海龙 董月芳

### Development of NIR-II small animal living fluorescence imaging system

Wu Dan-Dan Pan Li Zhou Zhe Fu Wei-Wei Zhu Hai-Long Dong Yue-Fang

引用信息 Citation: *Acta Physica Sinica*, 73, 078701 (2024) DOI: 10.7498/aps.73.20231910

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7498/aps.73.20231910>

当期内容 View table of contents: <http://wulixb.iphy.ac.cn>

---

## 您可能感兴趣的其他文章

### Articles you may be interested in

#### 新型双通道差分偏振干涉成像系统

Novel dual channel polarization interference imaging system

物理学报. 2018, 67(10): 100701 <https://doi.org/10.7498/aps.67.20172691>

#### 偏振成像激光雷达与短波红外复合光学接收系统设计与分析

Design and analysis of polarization imaging lidar and short wave infrared composite optical receiving system

物理学报. 2020, 69(24): 244202 <https://doi.org/10.7498/aps.69.20200920>

#### 结合虚拟单像素成像解卷积的双边照明光片荧光显微技术

Dual-sided illumination light-sheet fluorescence microscopy with virtual single-pixel imaging deconvolution

物理学报. 2022, 71(2): 028701 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20211358>

#### 结构光照明技术在二维激光诱导荧光成像去杂散光中的应用

Structured illumination for two-dimensional laser induced fluorescence imaging to eliminate stray light interference

物理学报. 2019, 68(21): 218701 <https://doi.org/10.7498/aps.68.20190977>

#### 优化双色近红外激光及其二次谐波场驱动原子产生孤立阿秒脉冲

Generation of isolated attosecond pulses from atoms driven by optimized two near-infrared pulses and their second harmonic fields

物理学报. 2022, 71(23): 233207 <https://doi.org/10.7498/aps.71.20221375>

#### 任意数量离散不规则感兴趣区域的快速荧光寿命显微成像

Fast fluorescence lifetime microscopy imaging of any number of discrete irregular regions of interest

物理学报. 2021, 70(19): 198701 <https://doi.org/10.7498/aps.70.20210941>