



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Medical Engineering—Article

基于临床可用的亚甲基蓝近红外二区成像用于泌尿系统结构及功能成像的研究

薛丁玮^a, 吴迪^b, 陆泽毅^a, Jochen Neuhaus^c, 阿卜杜热合曼·则比布拉^a, 冯哲^d, 成晟^a, 周静^d, 钱骏^{a,d,*}, 李恭会^{a,*}

^a Department of Urology, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

^b Department of General Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China

^c Department of Urology, University of Leipzig, Leipzig 04103, Germany

^d State Key Laboratory of Modern Optical Instrumentation, Centre for Optical and Electromagnetic Research, College of Optical Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 February 2021

Revised 15 July 2021

Accepted 15 July 2021

Available online 25 April 2022

关键词

近红外二区荧光

亚甲基蓝

肾功能

泌尿系统

实时成像

摘要

精准的结构和功能成像对于泌尿系统疾病的诊断和预后至关重要。近红外二区光谱区域(second near-infrared spectral region, NIR-II, 1000~1700 nm)荧光生物成像相较于传统的荧光生物成像具有更高的空间分辨率、更深的穿透力和更好的信噪比,但其临床适用性有限。在此,本文首次报道了基于临床可用且经肾脏排泄的荧光染料亚甲基蓝(methylene blue, MB)对活体泌尿系统进行NIR-II荧光成像,该技术不仅可实现清晰的有创/无创尿路造影,而且还能有效且无创地检测肾功能。以上研究结果表明MB辅助的NIR-II荧光成像在临床/基础研究中泌尿系统结构和功能成像领域中具有较大的应用前景。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

泌尿系统疾病的诊断和预后主要依靠影像学检查,如排泄性尿路造影、逆行膀胱造影(urination cystography, UCG)、泌尿系CT等。但这些方法存在射线暴露、造影剂过敏、成像效果不佳等缺陷[1–5]。此外,随着微创手术日益普及,对灵敏、实时和安全成像方法的需求也在迅猛增长。

无创肾功能分析对于泌尿系统疾病的诊断必不可少,尤其是单侧肾脏疾病[6]。肾功能的准确评估需要对肾脏进行高对比度和高时间分辨率的实时成像,目前单光子发

射计算机断层扫描(SPECT)、磁共振成像(MRI)和正电子发射断层扫描(PET)是用于临床诊断和临床前肾功能研究的主要工具[7–9]。这些方法同样也存在成本高、获取受限和潜在辐射暴露风险等问题。因此,临床和临床前肾功能评估亟需一种安全、低成本且灵敏的肾功能成像技术。

近红外(near-infrared, NIR)荧光成像由于具有高灵敏度、高时间分辨率和快速反馈等优势,是一种极具应用前景的生物医学成像方法,该技术在临床中显示出优越的性能,但有限的成像穿透深度限制了其进一步的临床应用[10–13]。随着成像模式的迅速改进,越来越多的研究表

* Corresponding authors.

E-mail addresses: qianjun@zju.edu.cn (J. Qian), 3193119@zju.edu.cn (G. Li).

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 22(3): 149–158

引用本文: Dingwei Xue, Di Wu, Zeyi Lu, Jochen Neuhaus, Abudurehman Zebibula, Zhe Feng, Sheng Cheng, Jing Zhou, Jun Qian, Gonghui Li. Structural and Functional NIR-II Fluorescence Bioimaging in Urinary System via Clinically Approved Dye Methylene Blue. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.032>

明近红外二区光谱区域 (NIR-II, 1000~1700 nm) 窗口荧光生物成像比常规近红外一区光谱区域 (NIR-I, 700~900 nm) 窗口荧光生物成像具有更好的空间分辨率、更高的信噪比 (SBR) 及更深的成像穿透深度[14–18]。目前, 已有包括量子点 (quantum dot, QD) [17,19–20]、碳纳米管[21–23]、聚集诱导发光 (aggregation-induced emission, AIE) 材料[24–27]、稀土纳米材料[28–30]等在内的几种 NIR-II 荧光探针被用于 NIR-II 荧光全身和显微成像。然而, 由于不确定的药代动力学/毒代动力学和药物代谢情况, 上述材料中的大多数在临床转化过程中面临挑战[4, 31–32]。因此, 如何找到能兼顾 NIR-II 成像优势和临床应用性的 NIR 染料显得尤为重要。迄今为止, 只有一种临床获批的 NIR 染料吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG), 由于其 NIR-II 荧光拖尾效应而具有临床 NIR-II 荧光成像潜力, 但仅限于肝胆系统和淋巴系统的成像应用[15–16,33]。

亚甲基蓝 (methylene blue, MB) 是一种经美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准的肾脏可排泄 NIR-I 染料, 已被广泛用于 NIR-I 荧光成像引导手术, 如输尿管的识别、胰腺及胰岛素瘤的定位及乳腺癌术中导航[34–37]。MB 具有出色的摩尔消光系数[峰值吸光度 (665 nm) 处为 $71\ 200\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] 和相对较高的量子产率 (QY, 3.8%) [34], 因此 MB 具有成为临床可用 NIR-II 荧光成像材料的潜力, 而目前 MB 在 NIR-II 荧光生物成像中的应用尚未见报道。

本研究首先成功地检测了 MB 的 NIR-II 荧光拖尾, 并通过 Intralipid® 1% 溶液进行体外模拟成像, 比较了 MB 在 NIR-I 窗口和 NIR-II 窗口中的组织穿透能力。随后, 在小鼠模型中对 MB 在 NIR-I 和 NIR-II 窗口中的 UCG 和排泄性尿路造影成像效果进行了对比成像, 并成功实现了基于 MB NIR-II 成像对肾功能的非侵入性评估。本研究旨在评估将 MB NIR-II 荧光成像应用于泌尿系统结构和功能评估的有效性和可行性, 为 NIR-II 成像应用于临床和临床前提供了全新的潜在选择。

2. 实验材料与方法

2.1. 材料

临床医药级 MB 购自济川药业 (中国), 磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自国药集团化学试剂有限公司 (中国), Intralipid® 20% 购自 Baxter Healthcare Corporation (美国), 所有实验均使用电阻率为 $18.2\ \text{M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 的去离子水。

2.2. 光学表征

使用 Shimadzu UV-2550 紫外可见 NIR 扫描分光光度计 (Shimadzu, 日本) 测量 MB 在水溶液中的吸收光谱, 测量范围为 550~900 nm。MB 在去离子水及尿液中在 NIR-II 窗口的荧光发射光谱是通过基于 PG2000 光谱仪 (Ideoptics Instruments, 中国) 和 2000C 光谱仪 (Everup-ing Optics Corporation, 中国) 进行测定的。

2.3. 量子产量测定

使用二氯乙烷 (DCE) 中的 NIR-II 染料 IR-26 (量子产量, Quantum Yield; QY $\approx 0.5\%$) 作为参照, 测量 MB 水溶液的 QY [38]。在 623 nm 激光激发下测量了一系列具有不同光密度 (OD) 值的 IR-26 DCE 溶液和 MB 水溶液, 并且在 1000 nm 以上波段对 NIR-II 荧光强度进行了积分, 获得了用于描述积分 NIR-II 荧光强度对 OD 依赖性的直线的两个斜率 (一个来自 IR-26 的 DCE 溶液, 另一个来自 MB 水溶液)。MB 的 QY (Q_2) 由下式计算:

$$Q_2 = Q_1 \cdot \frac{F_{\text{slope}2} \cdot n_2^2}{F_{\text{slope}1} \cdot n_1^2}$$

式中, Q_1 是 IR-26 在 DCE 中的 QY (0.5%); $F_{\text{slope}1}$ 是 IR-26 在 DCE 中的斜率值; $F_{\text{slope}2}$ 是 MB 水溶液的斜率值; n_1 是 DCE 的折射率; n_2 是水的折射率。

2.4. 光稳定性

MB 水溶液 ($0.005\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的光稳定性测定是在功率密度为 $80\ \text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 623 nm 发光二极管 (LED) 连续照射下进行 (持续 60 min), 并基于比色皿区域计算平均荧光强度。

2.5. Intralipid® 模拟成像

如前所述, 在体模中进行体外测试。Intralipid® 1% 溶液是通过将 Intralipid® 20% 稀释到去离子水中制备的。将装有 MB 溶液 ($0.005\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的毛细管玻璃管 (内径为 0.3 mm) 浸入制备的 Intralipid® 1% 溶液中, 其深度范围为液面以下 1~6 mm。进行了不同深度的 NIR-I 和 NIR-II 成像 (激发波长: 623 nm; 功率密度: $30\ \text{mW} \cdot \text{cm}^{-2}$; 曝光时间: NIR-I 窗口 10 ms vs NIR-II 窗口 50 ms)。

2.6. 动物实验

本研究经浙江大学动物实验机构伦理委员会 (IA-CUC: JU20160141) 批准。本研究中的所有动物实验均严格按照浙江大学动物实验机构伦理委员会的要求和指南进行。美国癌症研究所 (ICR) 小鼠 (6~8 周龄, 雌性) 和 BLAB/c 裸鼠 (6~8 周龄, 雌性) 由上海 SLAC 实验动物公

司提供并饲养在浙江大学实验动物中心。动物饲养区保持在 24 °C，光照/黑暗循环为 12 h，提供充足的水及食物。每次手术和影像学实验前，小鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥 (40~50 mg·kg⁻¹ 体重) 诱导麻醉并保持麻醉状态。小鼠在排泄性尿路造影前静脉注射 MB 水溶液 (0.01 mg·g⁻¹ 体重，静脉注射)，UCG 前给予 MB 水溶液 (0.005 mg·mL⁻¹，100 μL) 灌注膀胱。

2.7. NIR-I 荧光成像

使用 GA1280 相机 (1280 × 1024 像素; Tekwin System, 中国) 进行 NIR-I 成像, 该相机配备了定焦镜头 (焦距 50 mm, 800~2000 nm 的增透膜; Edmund Optics, 美国), 配备 800 nm 长通滤波器和 900 nm 短通滤波器以提取 NIR-I 荧光信号, 使用 623 nm LED (SOLIS-623C; Thorlabs, 美国) 为研究区域提供均匀照明 (见附录 A 中的图 S1)。

2.8. NIR-II 荧光成像

配备定焦镜头 (焦距 50 mm, 800~2000 nm 抗反射涂层; Edmund Optics) 的二维电子冷却砷化镓 (InGaA) 相机 (640 × 512 像素; Tekwin System), 冷却至 -40 °C 用于获取 NIR-II 窗口中的图像 [见附录 A 中的图 S1 (b)]。使用 623 nm LED (SOLIS-623C; Thorlabs, 美国) 为成像区域提供均匀照明。在每次成像实验之前测量光斑功率密度。在成像过程中, 使用 800 nm 短通滤波器过滤 623 nm 激发光。将 1000 nm 长通滤波器 (Thorlabs) 放置在相机镜头前, 限制低于 1000 nm 的波长并允许高于 1000 nm 的波长通过相机镜头以获取 NIR-II 荧光信号。

2.9. 体内肾脏和膀胱结构成像

以 200 μL MB 水溶液 (0.005 mg·mL⁻¹) 对小鼠膀胱进行灌注后进行 MB 辅助的 UCG。小鼠静脉注射 MB (0.01 mg·g⁻¹ 体重) 后进行基于 MB 的排泄性尿路造影, 获取肾脏 (背侧) 和膀胱 (腹侧) 在 NIR-I 和 NIR-II 窗口的荧光信号 (激发光源: 623 nm LED; 功率密度: 80 mW·cm⁻²)。

2.10. 活体输尿管成像

小鼠麻醉后被仰卧位固定在平台上, 随后进行剖腹手术并完全暴露输尿管。每只小鼠静脉注射 MB (0.01 mg·g⁻¹ 体重), 然后将一块腹部组织覆盖于一侧输尿管上。进一步比较 NIR-I 和 NIR-II 成像下覆盖组织后的输尿管成像效果。建立急性输尿管结扎模型需在右侧输尿管通过手术缝线结

扎, 在结扎后立即通过尾静脉注射浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 MB, 并将光斑功率密度调整至 30 mW·cm⁻²。使用 NIR-I 或 NIR-II 相机观察小鼠以定位输尿管及组织覆盖下的输尿管结扎点。

2.11. 活体肾功能成像

建立单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUU) 模型以用于 MB 辅助 NIR-II 荧光成像, 研究肾脏灌注。首先通过完全结扎小鼠左侧输尿管而保持右侧输尿管完整来建立 UUU 模型, 小鼠模型随着时间的推移逐渐出现单侧肾积水及肾灌注障碍, 而对照组 (假手术组, 仅做开腹后缝合) 不结扎输尿管。随后对 UUU-3d 组 (UUU 建模后 3 天)、UUU-6d 组 (UUU 建模后 6 天) 和对照组进行 MB 静脉注射 (0.01 mg·g⁻¹ 体重)。记录不同时间点肾脏信号的分布以制作时间依赖的荧光信号曲线。另一方面, 通过建立单侧肾功能衰竭 (unilateral renal failure, URF) 模型以评估基于 MB 辅助 NIR-II 荧光成像的肾脏滤过功能。简而言之, URF 模型和对照组均切除右肾 (right kidney, RK), 而左肾 (left kidney, LK) 在 URF 模型组则被电凝刀不同程度损伤, 对照组 LK 则保持完好。建模后如上所述进行 NIR-II 荧光成像。

2.12. 血清肌酐及尿素氮测定

从小鼠的角静脉采集血液。采集的血样以 4500 r·min⁻¹ 离心 15 min。根据制造商的方案, 使用商业试剂盒测定血清肌酐 (serum creatinine, Cre) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)。

2.13. 组织病理分析

小鼠解剖后, 对取自 UUU 组和对照组的肾脏组织用 4% 多聚甲醛固定、乙醇溶液脱水、石蜡包埋, 切成 15 μm 厚的切片进行苏木精-伊红 (H&E) 染色。切片用二甲苯和乙醇洗涤, 然后在苏木精工作液中浸泡 4 min, 在伊红工作液中浸泡 2 min, 然后用蒸馏水洗涤。使用显微镜 (Primovert; Zeiss, 德国) 分析染色切片。

2.14. 数据分析

基于手动选择的研究区域, 使用 ImageJ 软件 (1.6.0 版; 美国国立卫生研究院) 对每个荧光图像进行定量分析。使用 OriginPro 软件 (9.0 版; OriginLab, 美国) 生成图表。数据以平均值 ± 标准偏差 (SD) 的形式呈现。使用 *t* 检验进行统计分析。*表示两组实验数据之间具有统计学意义 (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001)。

3. 结果与讨论

3.1. MB 光学特性表征

MB 是一种小分子 NIR-I 染料[化学结构如图 1 (a) 所示], 其吸收峰约在 665 nm。MB 水溶液的发射光谱可被基于硅 (Si) 和 InGaAs 检测器的光谱仪所捕获, 表明其荧光发射扩展到 NIR-II 窗口[图 1 (b)、(c)]。在 NIR-II 光谱区, 以 DCE 中 IR-26 的 NIR-II 荧光 QY (约 0.5%) 作为参照, 计算得 MB 的 QY 为 0.2% (见附录 A 中的图 S2)。重要的是, MB 在 623 nm LED 激发下 (浓度: $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 功率密度: $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 显示出比另一种肾脏可清除 NIR-II 染料 CH-1055-PEG 在 793 nm 激光激发下 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 功率密度: $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) [39] 具有更高的 NIR-II 荧光强度, 如附录 A 中图 S3 所示。此外, MB 水溶液在连续 623 nm LED ($80 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$) 照射 60 min 后也未见明显的荧光衰减, 显示出其极佳的光稳定性 (见附录 A 中的图 S4)。为了比较 MB 在 NIR-I 和 NIR-II 窗口中的荧光穿透能力, 使用 Intralipid[®] 模拟生物组织的光学特性, 进行组织模拟实验: 随着 Intralipid[®] 1% 溶液厚度的增加, NIR-I 和 NIR-II 窗口中的荧光信号均呈现降低趋势。实验结果显示在 3 mm 厚的 Intralipid[®] 1% 溶液中, MB 的 NIR-I 荧光信号接近背景噪声, 而 MB 的 NIR-II 荧光信号即使在 5 mm 厚的

Intralipid[®] 1% 溶液覆盖下仍然可见。本文绘制了 Intralipid[®] 模拟实验中不同深度下的 NIR-I 和 NIR-II 装有 MB 溶液的毛细管图像半峰全宽 (full-width-half-maximum, FWHM) [图 1 (d)]。在未加入 Intralipid[®] 1% 溶液时毛细管在 NIR-I 和 NIR-II 窗口中 FWHM 分别为 $(386.5 \pm 5.4) \mu\text{m}$ 和 $(389.4 \pm 1.7) \mu\text{m}$ 。而当深度增加到 6 mm 时, NIR-I 和 NIR-II 窗口中的 FWHM 分别为 $(3294.9 \pm 453.2) \mu\text{m}$ 和 $(1243.1 \pm 14.4) \mu\text{m}$ [图 1 (e)]。此外, MB 在 NIR-II 窗口的 SBR 在 Intralipid[®] 1% 溶液厚度为 1 mm、2 mm、3 mm、4 mm 和 5 mm 时分别为其在 NIR-I 窗口成像时的 1.7、4.3、2.7、2.1 和 1.8 倍[图 1 (f)]。这些结果表明, 由于 NIR-II 窗口中的光散射更少, NIR-II 窗口中 MB 的荧光比 NIR-I 窗口中的荧光具有更深的组织穿透性和更高的成像灵敏度。

3.2. 基于 MB NIR-I 和 NIR-II 荧光成像的 UCG

膀胱输尿管反流是儿童泌尿外科常见病, 由于患者排尿时尿液从膀胱反流至输尿管和肾盂, 病程可进展为反复尿路感染, 最终导致肾脏瘢痕形成、萎缩、肾功能损伤等一系列并发症[40]。UCG 是诊断膀胱输尿管反流的金标准, 然而由于膀胱输尿管反流是一种间歇性发作疾病, 因此通常需要进行多次反流评估测试以明确该疾病。目前可

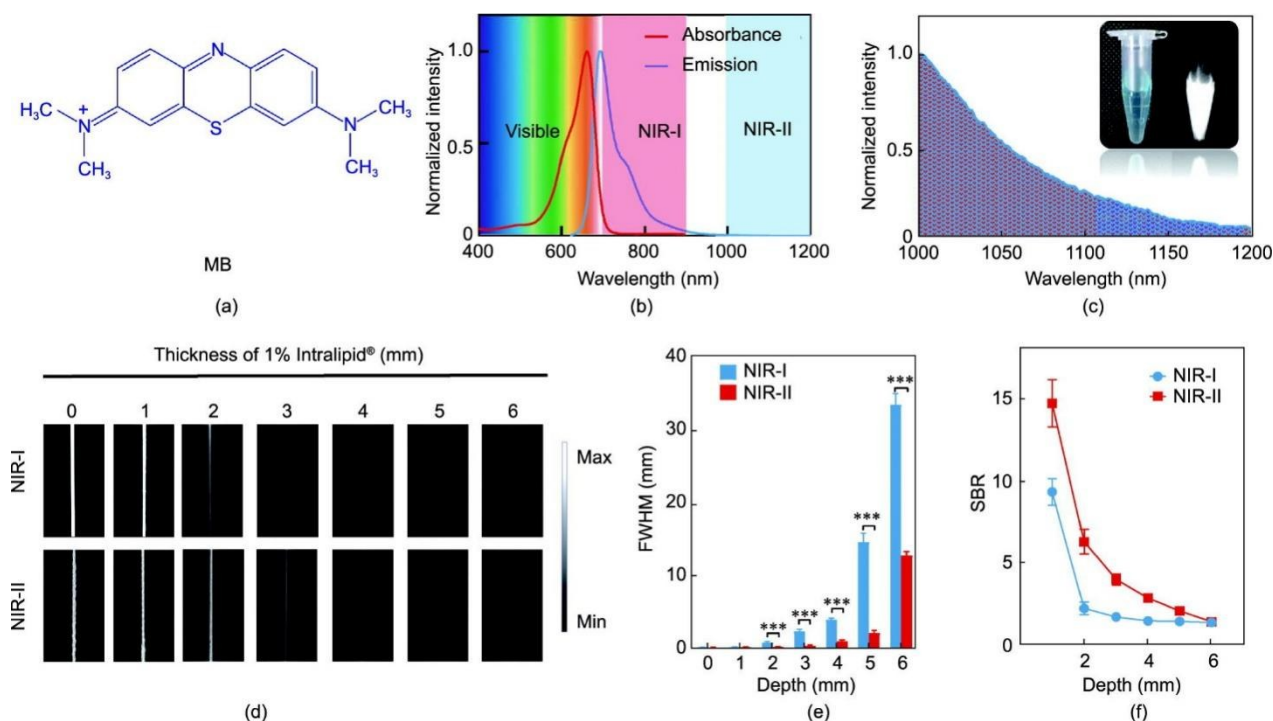


图 1. MB 光学表征。(a) MB 的化学结构式; (b) 水中 MB 的归一化吸收和发射光谱; (c) MB 在 1000~1200 nm 波长区域的归一化荧光发射谱图; (d) 在 0 mm、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm、5 mm 和 6 mm Intralipid[®]1% 溶液中 MB ($0.005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 填充的玻璃毛细管的 NIR-I 和 NIR-II 荧光图像 (激发波长: 623 nm; 功率密度: $30 \text{ mW}\cdot\text{cm}^{-2}$; NIR-I 窗口曝光时间: 10 ms; NIR-II 窗口曝光时间: 50 ms)。基于 MB 溶液玻璃毛细管的 FWHM (e) 和 SBR (f) 计算。数据为平均值 \pm SD, $n = 3$ 个独立测量。

用的UCG技术基于射线暴露，无形之中增加了患者尤其是患儿的患癌风险[41]。因此，本研究尝试使用MB辅助荧光成像技术来实现UCG。首先研究了MB在尿液中的稳定性：与相同浓度的MB水溶液相比，用小鼠尿液稀释后，MB的荧光强度变化很小[图2(a)和(b)]，表明其在尿液中同样具有较好的光稳定性。随后，在用MB水溶液灌注膀胱后，在NIR-I和NIR-II窗口中进行了基于MB的UCG。虽然在相同成像条件下MB在NIR-I窗口中的荧光信号比在NIR-II窗口中的荧光信号更强，但NIR-I窗口中的SBR(1.23)明显低于NIR-II窗口中的SBR(2.26)。这与之前的体外实验结果一致，基于MB的UCG在NIR-II窗口可以清晰、准确地反映膀胱的大小和边界[图2(c)和(d)]。根据以上结果可知，MB辅助荧光成像是一种很有前途的临床可用UCG技术。此外，与NIR-I窗口相比，基于MB的UCG在NIR-II窗口中更具成像优势。

3.3. MB的体内代谢及稳定性

在进行MB辅助排泄性尿路造影和功能成像实验之前，首先研究了它的体内代谢情况及体内稳定性。如附录A中图S5所示，NIR-II荧光信号主要位于静脉注射的小鼠的膀胱和胆囊MB(注射后30 min)，表明MB可以通过肾脏和肝脏代谢，这与之前的研究报道[42-43]一致。随后，在静脉注射MB后的不同时间点进行全身NIR-II荧光成像

(背侧和腹侧)[图3(a)和(b)]，结果显示肾脏信号在注射MB后3 min达到峰值，随后逐渐降低，而膀胱中的荧光信号随时间增加[图3(c)]。总之，MB显示了在泌尿系统实时NIR-II荧光可视化中的应用(包括结构和功能成像)潜力。

3.4. 基于MB的NIR-I和NIR-II排泄性尿路造影

MB的NIR-II荧光拖尾和肾脏排泄性使其具有应用于NIR-II荧光排泄尿路造影的能力。首先在同一小鼠模型中使用NIR-I和NIR-II成像系统进行非侵入性排泄性肾脏成像，实验结果显示使用NIR-II成像比传统的NIR-I成像更具优势：与NIR-I窗口相比，NIR-II窗口中的成像实现了更高对比度的小鼠肾脏无创成像[图4(a)~(c)]。

另外，输尿管损伤是泌尿外科手术的一种罕见但严重的并发症，且此类损伤的诊断常常被延迟[44-46]。因此，早期识别输尿管对于避免输尿管损伤和保护肾功能至关重要。据报道，MB已被成功用于NIR-I窗口下术中输尿管导航[35,37]。因此，本文探究了NIR-II荧光成像相较于NIR-I荧光成像在输尿管识别中的可行性。当目标输尿管成像区域被小鼠腹部组织(厚度约1.5 mm)覆盖时，在NIR-I窗口中尽管可以看到输尿管，但其成像SBR相当低[图4(d)]，而成像窗口切换至NIR-II时，成像背景噪声显著降低，整体空间分辨率明显提高[图4(e)]。随后，

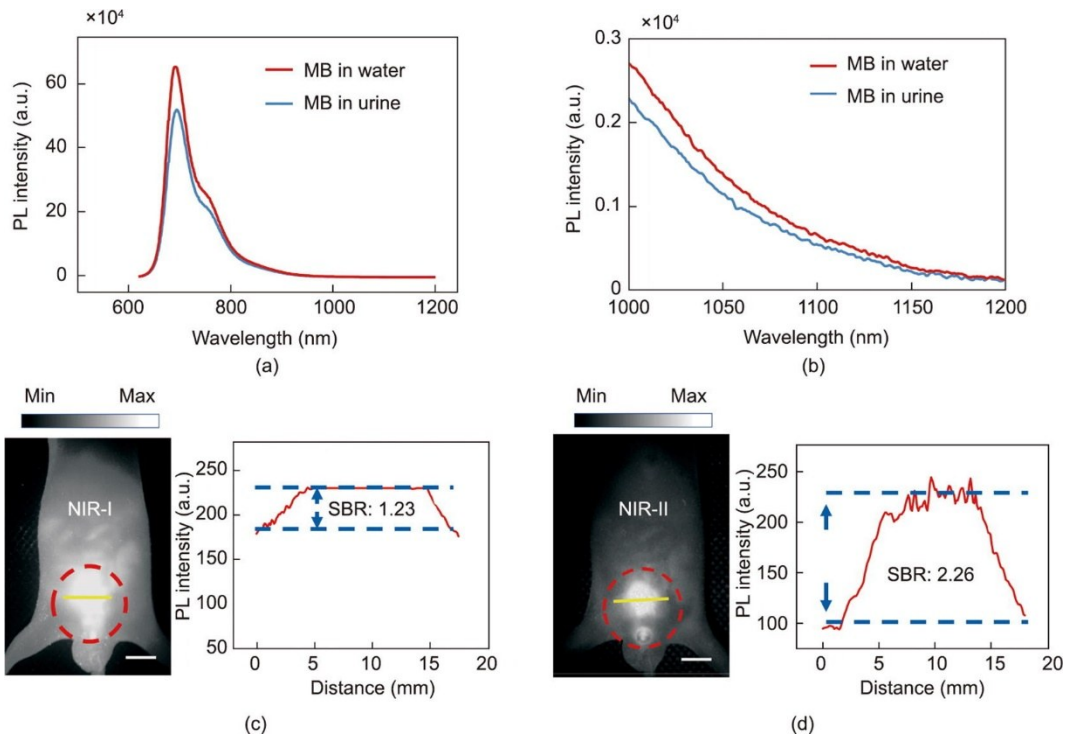


图2. 基于MB的NIR-I及NIR-II UCG。(a)、(b)相同浓度(0.005 mg·mL⁻¹)下MB水溶液和尿液中MB的发射光谱(PL:光致发光);(c)、(d)具有代表性的NIR-I和NIR-II膀胱荧光成像(激发波长:623 nm;功率密度:80 mW·cm⁻²;NIR-I窗口曝光时间:5 ms;NIR-II窗口曝光时间:25 ms)。MB浓度为0.005 mg·mL⁻¹(体积为50 μL,膀胱灌注)及SBR分析。

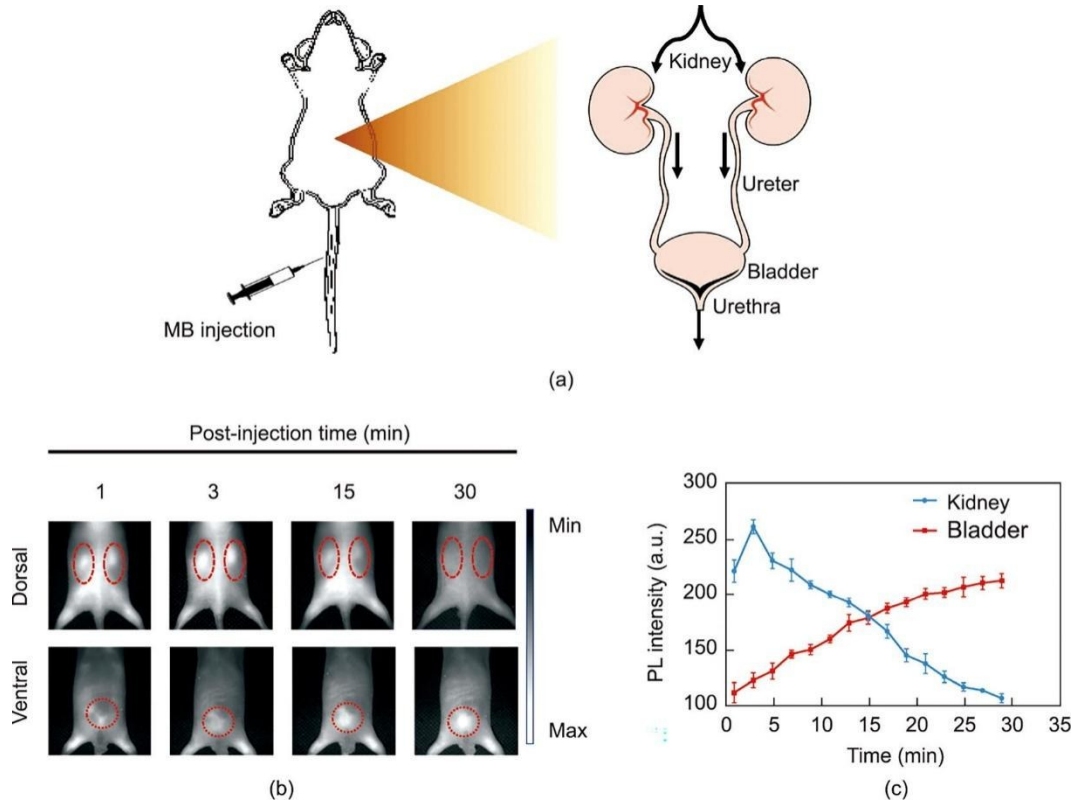


图3. MB的肾脏清除率和体内稳定性研究。(a) MB通过泌尿系统的肾脏排泄示意图。(b) 小鼠注射MB 1 min、3 min、15 min、30 min后的代表性NIR-II荧光图像。红色圆圈分别表示经背部的肾脏显影和经腹部的膀胱显影。成像在623 nm激发下完成，LED功率约为 $80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ ，滤光片为1000 nm长通。(c) MB注射后肾脏和膀胱的NIR-II时间荧光强度曲线(TFIC)。数据为平均值 \pm SD， $n = 3$ 个独立测量。

在小鼠模型上建立了急性输尿管梗阻模型，并在NIR-I和NIR-II成像窗口下识别输尿管病变。如图4(f)和(g)所示，输尿管结扎点在NIR-II窗口中具有良好的对比度，而NIR-I检测下几乎无法识别组织覆盖的特定结扎点。这些结果表明，与传统的NIR-I荧光成像相比，MB辅助NIR-II荧光成像是术中输尿管识别的更优选择，特别是对于输尿管被某些组织覆盖的患者。这种成像技术改进的实现非常简单，只需将术中导航系统中的成像相机从NIR-I相机切换到NIR-II相机即可。

3.5. 基于MB的NIR-II荧光活体肾功能成像

肾功能成像通常需反映肾脏血流灌注和肾脏滤过功能两个方面情况。由于经肾脏代谢是MB的主要代谢方式，且MB在肾脏中的荧光信号变化可以在无创前提下被NIR-II相机探测到，因此MB NIR-II荧光成像用于肾功能实时成像具有潜在可行性。为了证实以上推测，首先通过完全结扎小鼠左侧输尿管并同时保持右侧输尿管完整[图5(b)]，建立UUO-3d和UUO-6d模型[图5(a)](随着时间的推移，单侧肾积水和肾灌注障碍逐渐加重)。对照组即假手术组不结扎输尿管，仅做开腹后关腹缝合。随后，对UUO-3d组、UUO-6d组和对照组进行

NIR-II荧光成像，记录不同时间点的肾脏荧光信号[图5(c)]。结果如图5(d)和(f)所示，通过非侵入性MB NIR-II成像和肾脏时间荧光强度曲线(time-fluorescence intensity curves, TFIC)分析可以轻松区分UUO肾脏和正常肾脏：对照组LK和RK的信号变化无显著差异[图5(d)]，而在UUO组中被结扎输尿管的LK与正常RK相比信号峰值显著降低[图5(g)]。相应地，与UUO组中的正常RK和假手术组中的肾脏相比，UUO组中被结扎输尿管的LK TFIC的峰值时间显著延迟[图5(h)]。此外，与UUO-3d组相比，UUO-6d组中LK信号显示出更长的峰值时间，表明其肾灌注障碍程度更重，这一结果与最终的肾组织病理分析一致[图5(i)](UUO-3d组肾小管表现出轻度至中度萎缩和扩张，提示轻度肾灌注障碍，而UUO-6d组肾小管损伤和皮质萎缩则更明显)。这些数据表明，MB辅助的NIR-II肾功能荧光成像不仅可以区分正常肾脏和灌注障碍肾脏，还可以反映灌注障碍的严重程度。

肾脏滤过功能分析同样是肾功能成像中不可或缺的一部分。BUN和Cre是用于评估总肾肾滤过功能的常用指标，但由于存在功能良好的对侧肾脏，它们都不是反应单侧肾滤过功能的理想指标。为了排除健侧肾脏的代偿干

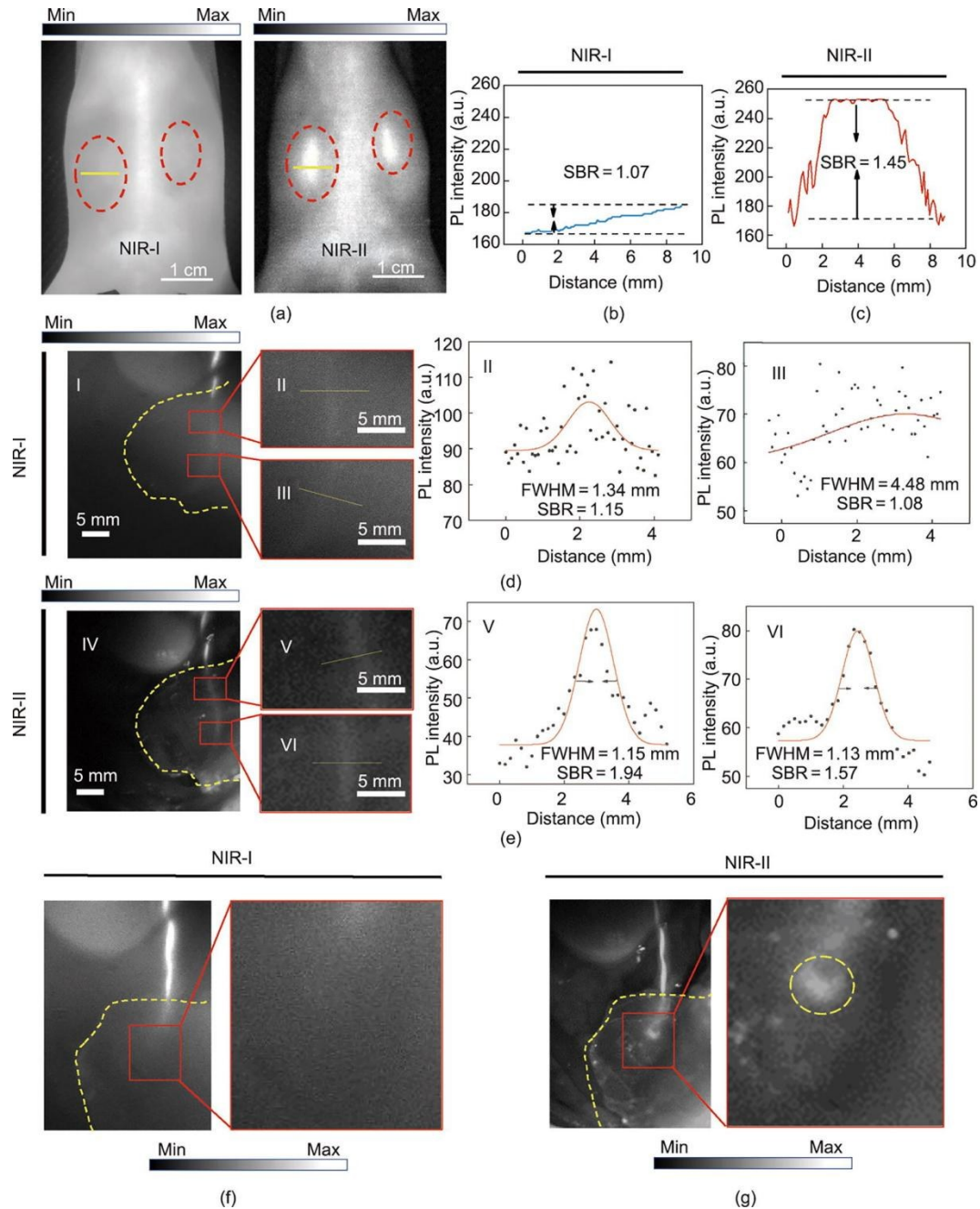


图4. 基于MB的NIR-I和NIR-II排泄性尿路造影。(a) 代表性肾脏NIR-I和NIR-II荧光成像图像 (MB静脉注射量为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重); (b)、(c) NIR-I及NIR-II两个成像窗口下的肾脏SBR分析 (比例尺为1 cm); (d)、(e) 静脉注射MB后在NIR-I和NIR-II窗口下被小鼠腹部组织覆盖的输尿管代表性成像图像, 根据强度谱的两项高斯拟合计算NIR-I和NIR-II窗口输尿管成像的FWHM和SBR。左右侧列比例尺均为5 mm。(f)、(g) NIR-I窗口和NIR-II窗口下UUO模型输尿管成像图片, 黄色圆圈表示梗阻点位置。

扰, 通过右肾切除术建立孤立肾模型, 用于研究MB辅助NIR-II实时成像以评估肾脏滤过功能的可行性。在URF组中LK受到不同程度的电凝损伤, 但在对照组中保持完好[图6 (a)]。同样地, 在MB静脉注射后进行无创MB辅助NIR-II肾脏实时成像, 利用TFIC分析单侧肾滤过功能 (定义为30 min时的清除百分比=30 min时的峰值强度/峰值 $\times 100\%$) [图6 (b)和(c)]。如图6 (d)所示, 与对照组相比, URF组在30 min时的MB清除百分比显著

降低。为了比较MB的肾功能检测能力与临床方法, 使用商业测定法测量了两组小鼠血液中的Cre和BUN。在URF组中观察到Cre和BUN显著升高, 提示URF组孤立肾滤过功能障碍。这些数据与上述成像结果一致, 表明通过MB NIR-II荧光成像无创检测肾脏滤过功能具有一定可行性。

尽管一些NIR-II染料如CH-1055-PEG、CDIR2、稀土纳米粒子和金纳米粒子已被报道具有NIR-II肾脏功能成像

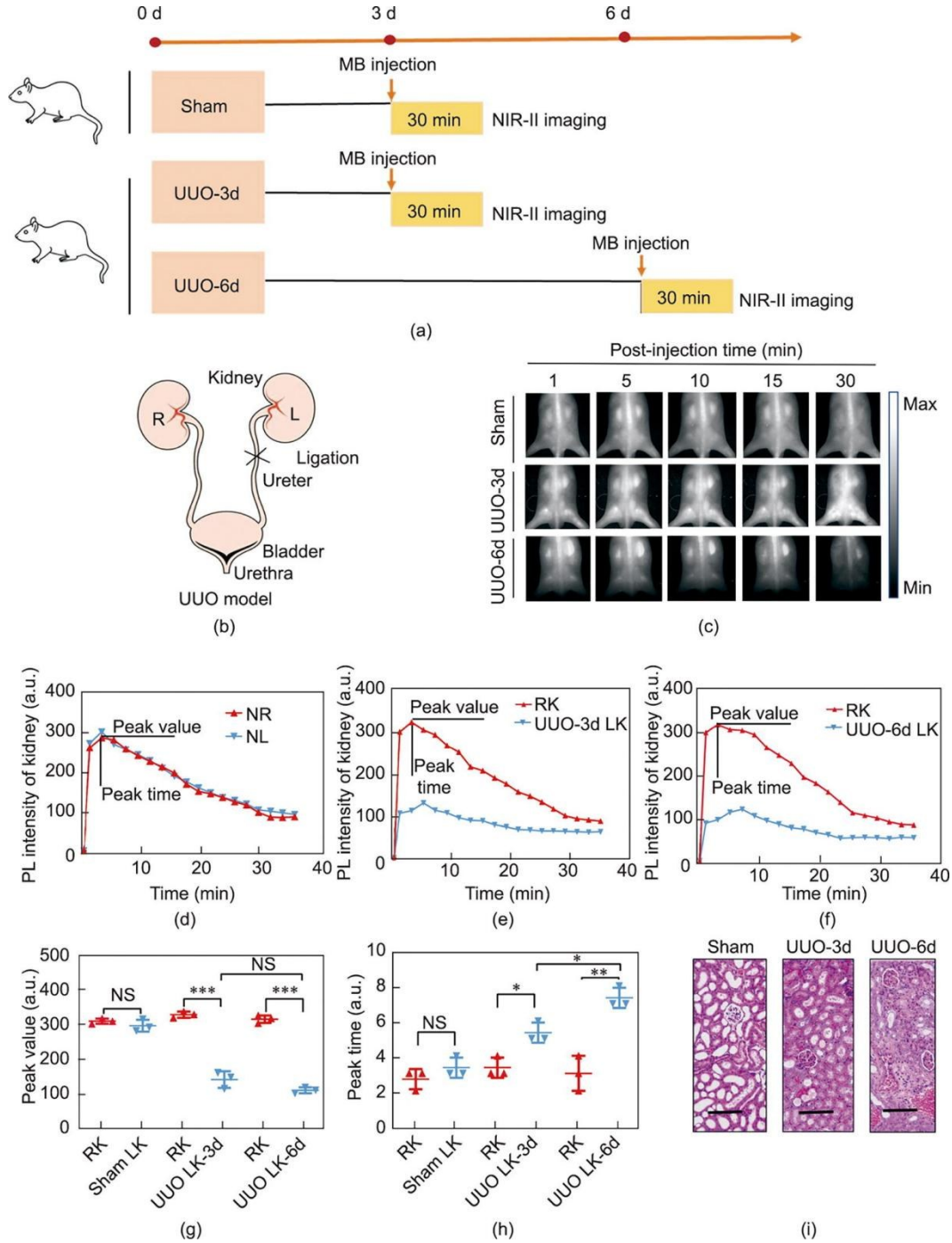


图5. 活体小鼠MB NIR-II荧光成像实时检测肾脏血流灌注。(a) 假手术组和UUO组小鼠术后不同时间点的NIR-II荧光成像流程示意图。(b) 左输尿管完全结扎且右输尿管保持完整的UUO模型建立示意图。(c) 静脉注射MB溶液(静脉注射量为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重)后不同时间点(波长: 623 nm ; 功率密度: $80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$; 曝光时间: 60 ms)的小鼠代表性全身(背侧)无创肾脏荧光成像图像。(d)~(f) 假手术组、UUO-3d组和UUO-6d组肾脏TFIC。(g)、(h) 基于UUO小鼠和假手术组肾脏TFICs的两个参数统计学分析, 参数包括峰值(g)和峰值时间(h)。数据为平均值 \pm SD。 $n = 3$ 个独立测量。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 。(i) 假手术组、UUO-3d组、UUO-6d组肾脏病理分析(H&E染色, 比例尺为 $100 \mu\text{m}$)。R: 右; L: 左; NS: 无统计学差异。

潜力[39,47–51], 但由于其毒性和药代动力学不明确, 要实现真正的临床应用仍需投入大量研究工作。此外, 上述材料即使用于动物模型实时成像, 也存在激发激光功率密度过高的问题(CDIR2和CH-1055-PEG的功率密度均为 $300 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$) [39,50], 存在潜在的热损伤。然而, MB

却可以在相对较低的激发功率密度(623 nm LED, $80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$)下实现清晰的NIR-II肾脏实时成像。同时由于MB在 665 nm 处的吸光度是 623 nm 处的1.85倍, 因此MB有望于更低功率密度下在 665 nm 处的激光激发下实现清晰的MB NIR-II肾脏实时成像。

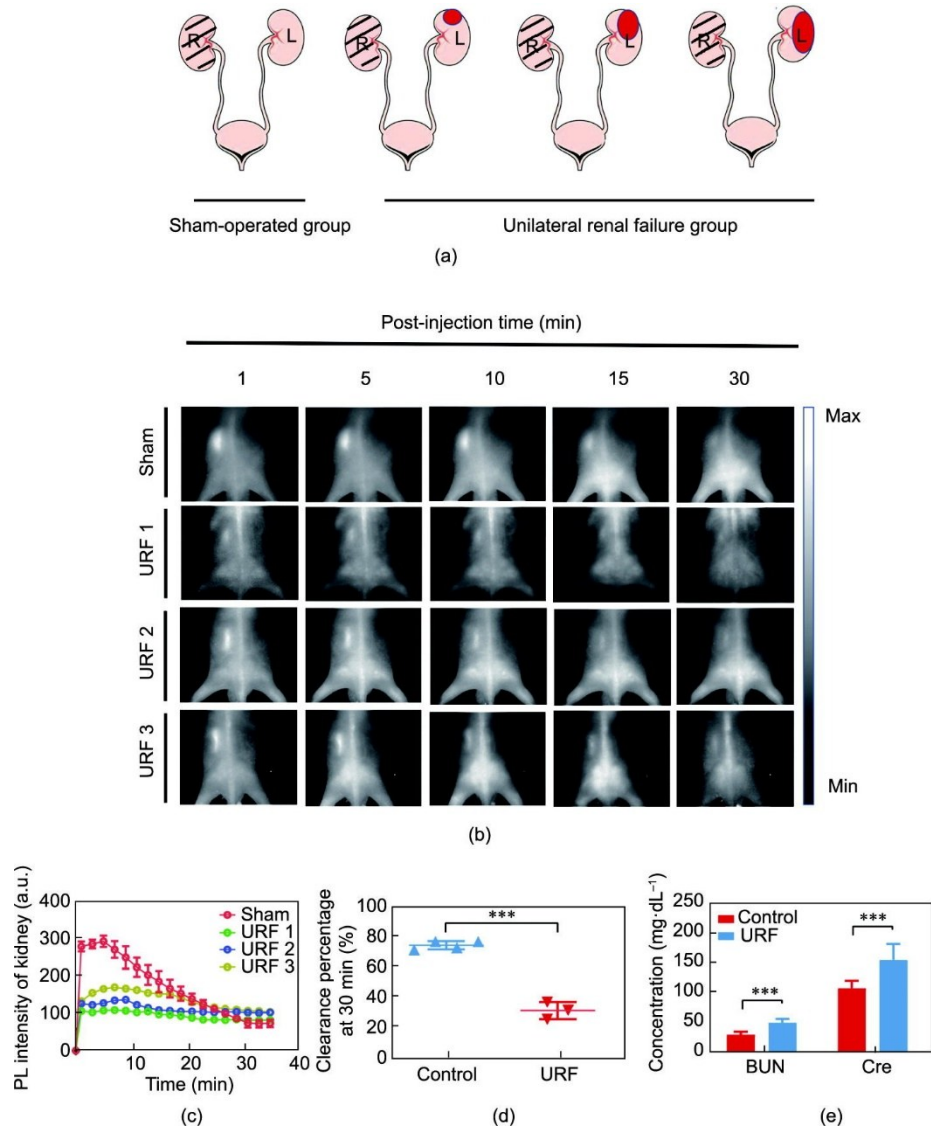


图6. 活体小鼠MB NIR-II荧光成像实时检测肾脏滤过功能。(a) URF模型建立示意图, 红色区域表示电凝损伤部位及程度。(b) 静脉注射MB (静脉注射量: $0.01 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 体重) 后不同时间点 (激发波长: 623 nm ; 功率密度: $80 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$; 曝光时间: 60 ms) 下对照组和URF组的代表性肾脏NIR-II荧光成像图像; (c) 对照组和URF组肾脏TFIC; (d) 对照组和URF组基于TFIC的肾脏30 min清除率统计分析, $***p < 0.001$ 。(e) 对照组和URF组其他指标 (Cre、BUN) 体外肾功能检测, $***p < 0.001$ 。

4. 结论

本研究首次探测了MB的NIR-II荧光拖尾, 并探究了其在NIR-II荧光有创/无创尿路造影和肾功能无创NIR-II成像中的应用可行性。MB在NIR-II窗口中显示出比NIR-I窗口更高的SBR和更好的空间分辨率, 表明在临床上使用MB荧光成像显然是更合适的检测窗口, 而将传统的基于硅的检测相机切换到新兴的InGaAs相机即可改进目前的术前和术中荧光成像。同时, MB主要通过肾脏排泄, 而MB辅助的NIR-II荧光成像的肾功能分析显示出与病理结果和临床诊断参数 (Cre和BUN) 一致。因此, 基于MB的NIR-II荧光成像不仅在临床上泌尿系统的侵入性和

非侵入性结构成像中具有巨大应用前景, 在临床前肾功能研究中同样大有可为。

致谢

感谢国家自然科学基金 (81672520、81870484、61975172和82001874)、浙江省科技计划项目 (2019C03089) 和浙江省自然科学基金 (LR17F050001) 对本研究的支持。

Compliance with ethics guidelines

Dingwei Xue, Di Wu, Zeyi Lu, Jochen Neuhaus, Abu-

dureheman Zebibula, Zhe Feng, Sheng Cheng, Jing Zhou, Jun Qian, and Gonghui Li declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2021.07.032>.

References

- Essman SC. Contrast cystography. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005;20(1):46–51.
- McDonald RJ, McDonald JS, Carter RE, Hartman RP, Katzberg RW, Kallmes DF, et al. Intravenous contrast material exposure is not an independent risk factor for dialysis or mortality. *Radiology* 2014;273(3):714–25.
- Bjurlin MA, Turkbey B, Rosenkrantz AB, Gaur S, Choyke PL, Taneja SS. Imaging the high-risk prostate cancer patient: current and future approaches to staging. *Urology* 2018;116:3–12.
- Moosavi B, Shabana WM, El-Khodary M, van der Pol CB, Flood TA, McInnes MDF, et al. Intracellular lipid in clear cell renal cell carcinoma tumor thrombus and metastases detected by chemical shift (in and opposed phase) MRI: radiologic-pathologic correlation. *Acta Radiol* 2016;57(2):241–8.
- Morris MJ, Autio KA, Basch EM, Danila DC, Larson S, Scher HI. Monitoring the clinical outcomes in advanced prostate cancer: what imaging modalities and other markers are reliable? *Semin Oncol* 2013;40(3):375–92.
- Chawla LS, Eggers PW, Star RA, Kimmel PL. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes. *N Engl J Med* 2014;371(1):58–66.
- Taylor AT, Lipowska M, Cai H. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{NTA})$ and $^{131}\text{I}\text{-OIH}$: comparable plasma clearances in patients with chronic kidney disease. *J Nucl Med* 2013;54(4):578–84.
- Grenier N, Basseau F, Ries M, Tyndal B, Jones R, Moonen C. Functional MRI of the kidney. *Abdom Imaging* 2003;28(2):164–75.
- Taylor AT. Radionuclides in nephrourology, part 1: radiopharmaceuticals, quality control, and quantitative indices. *J Nucl Med* 2014;55(4):608–15.
- Cheng D, Peng J, Lv Y, Su D, Liu D, Chen M, et al. *De novo* design of chemical stability near-infrared molecular probes for high-fidelity hepatotoxicity evaluation *in vivo*. *J Am Chem Soc* 2019;141(15):6352–61.
- Feng Z, Yu X, Jiang M, Zhu L, Zhang Y, Yang W, et al. Excretable IR-820 for *in vivo* NIR-II fluorescence cerebrovascular imaging and photothermal therapy of subcutaneous tumor. *Theranostics* 2019;9(19):5706–19.
- Sun C, Li B, Zhao M, Wang S, Lei Z, Lu L, et al. J-aggregates of cyanine dye for NIR-II *in vivo* dynamic vascular imaging beyond 1500 nm. *J Am Chem Soc* 2019;141(49):19221–5.
- Hori Y, Otomura N, Nishida A, Nishiura M, Umeno M, Suetake I, et al. Synthetic-molecule/protein hybrid probe with fluorogenic switch for live-cell imaging of DNA methylation. *J Am Chem Soc* 2018;140(5):1686–90.
- Ding F, Zhan Y, Lu X, Sun Y. Recent advances in near-infrared II fluorophores for multifunctional biomedical imaging. *Chem Sci* 2018;9(19):4370–80.
- Zhu S, Hu Z, Tian R, Yung BC, Yang Q, Zhao S, et al. Repurposing cyanine NIR-I dyes accelerates clinical translation of near-infrared-II (NIR-II) bioimaging. *Adv Mater* 2018;30(34):e1802546.
- Carr JA, Franke D, Caram JR, Perkinson CF, Saif M, Askoxylakis V, et al. Shortwave infrared fluorescence imaging with the clinically approved near-infrared dye indocyanine green. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(17):4465–70.
- Zebibula A, Alifu N, Xia L, Sun C, Yu X, Xue D, et al. Ultrastable and biocompatible NIR-II quantum dots for functional bioimaging. *Adv Funct Mater* 2018;28(9):1703451.
- Del Rosal B, Villa I, Jaque D, Sanz-Rodríguez F. *In vivo* autofluorescence in the biological windows: the role of pigmentation. *J Biophotonics* 2016;9(10):1059–67.
- Zhang M, Yue J, Cui R, Ma Z, Wan H, Wang F, et al. Bright quantum dots emitting at $\sim 1,600$ nm in the NIR-IIb window for deep tissue fluorescence imaging. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115(26):6590–5.
- Hong G, Robinson JT, Zhang Y, Diao S, Antaris AL, Wang Q, et al. *In vivo* fluorescence imaging with Ag_2S quantum dots in the second near-infrared region. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51(39):9818–21.
- Diao S, Hong G, Robinson JT, Jiao L, Antaris AL, Wu JZ, et al. Chirality enriched (12, 1) and (11, 3) single-walled carbon nanotubes for biological imaging. *J Am Chem Soc* 2012;134(41):16971–4.
- Robinson JT, Hong G, Liang Y, Zhang B, Yaghi OK, Dai H. *In vivo* fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake. *J Am Chem Soc* 2012;134(25):10664–9.
- Hong G, Diao S, Chang J, Antaris AL, Chen C, Zhang B, et al. Through-skull fluorescence imaging of the brain in a new near-infrared window. *Nat Photonics* 2014;8(9):723–30.
- Li Y, Cai Z, Liu S, Zhang H, Wong STH, Lam JWY, et al. Design of AIEgens for near-infrared IIb imaging through structural modulation at molecular and morphological levels. *Nat Commun* 2020;11(1):1255.
- Zheng Z, Li D, Liu Z, Peng HQ, Sung HHY, Kwok RTK, et al. Aggregation-induced nonlinear optical effects of AIEgen nanocrystals for ultradeep *in vivo* bioimaging. *Adv Mater* 2019;31(44):e1904799.
- Alifu N, Zebibula A, Qi J, Zhang H, Sun C, Yu X, et al. Single-molecular near-infrared-II theranostic systems: ultrastable aggregation-induced emission nanoparticles for long-term tracing and efficient photothermal therapy. *ACS Nano* 2018;12(11):11282–93.
- Qi J, Sun C, Zebibula A, Zhang H, Kwok RTK, Zhao X, et al. Real-time and high-resolution bioimaging with bright aggregation-induced emission dots in short-wave infrared region. *Adv Mater* 2018;30(12):e1706856.
- Wang R, Li X, Zhou L, Zhang F. 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. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(45):12086–90.
- Wang P, Fan Y, Lu L, Liu L, Fan L, Zhao M, et al. NIR-II nanoprobes *in-vivo* assembly to improve image-guided surgery for metastatic ovarian cancer. *Nat Commun* 2018;9(1):2898.
- Naczynski DJ, Tan MC, Zevon M, Wall B, Kohl J, Kulesa A, et al. Rare-earth-doped biological composites as *in vivo* shortwave infrared reporters. *Nat Commun* 2013;4(1):2199.
- Alshehri R, Ilyas AM, Hasan A, Arnaout A, Ahmed F, Memic A. Carbon nanotubes in biomedical applications: factors, mechanisms, and remedies of toxicity. *J Med Chem* 2016;59(18):8149–67.
- Wang Y, Hu R, Lin G, Roy I, Yong KT. Functionalized quantum dots for biosensing and bioimaging and concerns on toxicity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5(8):2786–99.
- Yu X, Feng Z, Cai Z, Jiang M, Xue D, Zhu L, et al. Deciphering of cerebrovasculatures via ICG-assisted NIR-II fluorescence microscopy. *J Mater Chem B* 2019;7(42):6623–9.
- Winer JH, Choi HS, Gibbs-Strauss SL, Ashitate Y, Colson YL, Frangioni JV. Intraoperative localization of insulinoma and normal pancreas using invisible near-infrared fluorescent light. *Ann Surg Oncol* 2010;17(4):1094–100.
- Verbeek FPR, van der Vorst JR, Schaafsma BE, Swijnenburg RJ, Gaarenstroom KN, Elzevier HW, et al. Intraoperative near infrared fluorescence guided identification of the ureters using low dose methylene blue: a first in human experience. *J Urol* 2013;190(2):574–9.
- Tummers QRJG, Verbeek FPR, Schaafsma BE, Boonstra MC, van der Vorst JR, Liefers GJ, et al. Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and methylene blue. *Eur J Surg Oncol* 2014;40(7):850–8.
- Matsui A, Tanaka E, Choi HS, Kianzad V, Gioux S, Lomnes SJ, et al. Real-time, near-infrared, fluorescence-guided identification of the ureters using methylene blue. *Surgery* 2010;148(1):78–86.
- Semonin OE, Johnson JC, Luther JM, Middett AG, Nozik AJ, Beard MC. Absolute photoluminescence quantum yields of IR-26 dye, PbS, and PbSe quantum dots. *J Phys Chem Lett* 2010;1(16):2445–50.
- Antaris AL, Chen H, Cheng K, Sun Y, Hong G, Qu C, et al. A small-molecule dye for NIR-II imaging. *Nat Mater* 2016;15(2):235–42.
- Penna FJ, Caldafone A, Koyle MA. Coming full circle with vesicoureteral reflux: from Hutch to bladder and bowel dysfunction. *J Pediatr Urol* 2017;13(2):189–91.
- Sodickson A, Baeyens PF, Andriole KP, Prevedello LM, Nawfel RD, Hanson R, et al. Recurrent CT, cumulative radiation exposure, and associated radiation-induced cancer risks from CT of adults. *Radiology* 2009;251(1):175–84.
- DiSanto AR, Wagner JG. Pharmacokinetics of highly ionized drugs I: methylene blue—whole blood, urine, and tissue assays. *J Pharm Sci* 1972;61(4):

- 598–602.
- [43] DiSanto AR, Wagner JG. Pharmacokinetics of highly ionized drugs II: methylene blue—absorption, metabolism, and excretion in man and dog after oral administration. *J Pharm Sci* 1972;61(7):1086–90.
- [44] Datta S, Wheatstone S, Challacombe B. The acute management of iatrogenic urological injuries; strategies and mind-set for the urologist attending an unfamiliar operating theatre. *BJU Int* 2013;112(5):540–2.
- [45] Brandes S, Coburn M, Armenakas N, McAninch J. Diagnosis and management of ureteric injury: an evidence-based analysis. *BJU Int* 2004;94(3):277–89.
- [46] Delacroix SE Jr, Winters JC. Urinary tract injuries: recognition and management. *Clin Colon Rectal Surg* 2010;23(3):221.
- [47] Yu M, Liu J, Ning X, Zheng J. High-contrast noninvasive imaging of kidney clearance kinetics enabled by renal clearable nanofluorophores. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015;54(51):15434–8.
- [48] Yu M, Zhou J, Du B, Ning X, Authement C, Gandee L, et al. Noninvasive staging of kidney dysfunction enabled by renal-clearable luminescent gold nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl* 2016;55(8):2787–91.
- [49] Huang J, Lyu Y, Li J, Cheng P, Jiang Y, Pu K. A renal-clearable duplex optical reporter for real-time imaging of contrast-induced acute kidney injury. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019;58(49):17796–804.
- [50] Huang J, Xie C, Zhang X, Jiang Y, Li J, Fan Q, et al. Renal-clearable molecular semiconductor for second near-infrared fluorescence imaging of kidney dysfunction. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019;58(42):15120–7.
- [51] Huang J, Weinfurter S, Daniele C, Perciaccante R, Federica R, Ciana LD, et al. Zwitterionic near infrared fluorescent agents for noninvasive real-time transcutaneous assessment of kidney function. *Chem Sci* 2017;8(4):2652–60.