

上转换发光纳米材料在生物成像中的应用的研究进展

刘波^①, 胡丹^②, 刘玉萍^①, 马志亚^①, 赵元弟^{①*}

① 武汉光电国家实验室(筹)Britton Chance 生物医学光子学研究中心-华中科技大学生物医学工程系, 武汉 430074;

② 湖北兴发化工集团股份有限公司, 宜昌 443007

* 联系人, E-mail: zydi@mail.hust.edu.cn

2012-06-03 收稿, 2012-09-13 接受, 2012-11-06 网络版发表

国家自然科学基金(31100704, 81000661)和华中科技大学自主创新研究基金(2011QN238, 2012TS016)资助

摘要 稀土上转换发光纳米材料是一类利用近红外光激发而短波长发射的荧光材料, 因其具有发光性质稳定、无光漂白现象、弱的生物样品损伤和高荧光信噪比等优点, 在荧光成像中可弥补传统荧光标记材料的不足而发挥重要作用. 本文重点介绍上转换发光纳米材料在生物成像中应用的进展.

关键词

上转换发光
纳米材料
生物成像

荧光成像技术是通过激发光激发荧光探针发光进行成像, 因其具有高灵敏度、高空间分辨率、成本低廉、简单、快速等优点而被广泛地应用于生物成像中. 有机染料和荧光蛋白是最常用的荧光探针, 但存在光学稳定性差、斯托克斯(Stokes)位移小、发射峰宽等缺点, 故在生物成像方面的应用受到了一定限制. 半导体量子点具有光学稳定性好、发光效率高和发射峰窄等优点而受到人们的青睐, 但由于其在体内荧光成像时因厚而不透明的组织需要较高能量的激发光, 这会引发较强的非特异性荧光, 从而干扰成像效果. 非特异性荧光是荧光成像中背景噪音的主要来源, 虽然当前采用不同的成像技术可分离背景光, 但是很难完全消除背景噪音, 而这些背景噪音会降低荧光成像的灵敏度. 因此, 如何避免生物样品的背景干扰成为荧光成像领域的关键科学问题.

稀土上转换发光纳米材料是一类利用近红外光(通常用 980 nm)激发而短波长发射的荧光材料. 上转换发光纳米材料能够克服下转换荧光材料成像时背景荧光强的缺点而受到广泛的关注, 本文将近年来上转换发光纳米材料在生物成像中应用的最新进展进行了综述.

1 稀土上转换发光纳米材料

上转换发光是指吸收两个或两个以上低能光子

而辐射一个高能光子的发光现象, 即是一种在近红外光激发下能发出可见或紫外光的发光材料. 上转换发光材料的最大特点是材料所吸收的光子能量低于发射的光子能量, 所以称为上转换材料^[1]. 上转换发光材料的发光机理是基于双光子或多光子过程. 由于这种现象违背 Stokes 定律, 因而又称为反 Stokes 发光. 上转换发光机制的研究一直受到人们的重视, 经过几十年的探索, 人们对上转换发光机理已经有了深入的了解. 其机制主要分为三大类, 即激发态吸收(excited state absorption, ESA)、能量转移(energy transfer, ET)和“光子雪崩”过程(photon avalanche, PA)^[2].

稀土上转换发光材料通常由基质材料、激活剂和敏化剂组成. 目前, 稀土离子上转换发光的无机基质材料包括多晶粉末、单晶和非晶三大类材料. 稀土离子 Ho^{3+} , Nd^{3+} , Tm^{3+} , Er^{3+} 等具有很丰富的能级, 由于受 4f 能级外层的电子屏蔽作用, 能级寿命较长, 因此有很高的上转换发光效率, 是当前研究较多的上转换材料激活剂. 为提高其发光效率, 经常使用 Yb^{3+} 离子进行共掺杂. 稀土离子 Yb^{3+} 的吸收光谱的最大峰值在 980 nm, 与 Er^{3+} 第一激发态的吸收能量相一致, 而且吸收截面远远大于 Er^{3+} , 吸收能量后可传递给 Er^{3+} , 因而是一种很有效的上转换敏化剂, 加入 Yb^{3+}

引用格式: 刘波, 胡丹, 刘玉萍, 等. 上转换发光纳米材料在生物成像中的应用的研究进展. 科学通报, 2013, 58: 517-523

Liu B, Hu D, Liu Y P, et al. Research progress in upconversion nanophosphors for biological imaging (in Chinese). Chin Sci Bull (Chin Ver), 2013, 58: 517-523, doi: 10.1360/972012-775

后 Er^{3+} 的上转换发光效率可提高 1~2 个数量级^[3,4]. 21 世纪初, 随着纳米科技的迅猛发展, 具有较强上转换发光效率的水溶性纳米颗粒(<30 nm)已被合成出来. 稀土上转换发光纳米材料的制备方法有很多, 目前共沉淀法、水热法、溶胶-凝胶法、微乳液法、燃烧法、喷雾热解法、气相沉积法等均被用于该类材料的制备^[5].

当稀土上转换发光纳米材料应用到生物标记领域时, 会有许多优点, 例如窄带发射, 较大的反 Stokes 位移, 较深的组织穿透深度和空间分辨率, 对生物组织无损伤, 生物组织不会受激发光(无背景荧光), 较好的光稳定性等. 此外, 稀土上转换发光只需要低功率密度的近红外连续激光器(典型的是 980 nm), 相对于通过价格昂贵的高功率密度脉冲激光器激发产生的双光子上转换发光, 更具有普适性. 所有这些优点都表明, 上转换发光纳米材料将在生物成像中具有巨大的应用潜力.

2 生物成像的应用

2.1 体外细胞成像

相对于传统的有机染料, 稀土上转换发光纳米材料具有很强的荧光效率、很好的光稳定性和抗漂白性. 稀土上转换纳米材料是以近红外(通常是以 980 nm 的激光)为激发光源, 这使得稀土上转换发光纳米材料成像具有很强的穿透能力(能深入到组织内几厘米)^[6], 对组织的损伤较小且组织不会产生自发荧光, 从而使稀土上转换发光纳米材料成为继量子点之后又一类用于生物成像的优秀荧光探针.

1999 年, Zijlmans 等人^[7]首次将上转换荧光纳米颗粒(200~400 nm)用于高性能生物细胞成像后, 人们对上转换荧光纳米颗粒的研究兴趣迅速增加, 一系列的上转换荧光纳米颗粒被合成出来^[7-12]. 最近几年, 随着上转换发光纳米颗粒合成方法逐渐成熟, 一系列小尺寸上转换发光纳米颗粒被应用于各种细胞成像研究. 没有功能化的上转换发光纳米颗粒可通过细胞的内吞作用标记不同类型的细胞, 使用 980 nm 的激光激发时细胞没有自发荧光产生, 并且使用上转换荧光纳米颗粒标记的组织和细胞在 4℃ 保存 6 个月强度都没有明显的减弱, 这表明上转换发光纳米材料可望作为细胞长时间标记的一种材料.

使用稀土上转换发光纳米颗粒标记的生物成像

中不仅焦平面上的上转换发光纳米颗粒被激发, 而且非焦平面的上转换发光纳米颗粒也有可能被激发, 这些来自样品中非焦平面的上转换发光会使焦面细节模糊, 导致图像分辨率下降. Yu 等人^[13]发展了一种激光扫描上转换发光显微成像(laser scanning up-conversion luminescence microscopy, LSUCLM)技术, 利用这一技术能避免非焦平面的上转换发光信号的干扰, 显著提高上转换发光图像的分辨率. LSUCLM 具有三维分辨率, 光漂白很弱, 且能完全消除来自生物体内源性荧光物质及其他外源性荧光的背景干扰, 对所成像的对象具有超高的选择性和灵敏度.

肿瘤细胞表面存在一些特异性的受体, 这些受体会在肿瘤组织中过度表达, 而在正常组织中不表达或低表达. 借助这些受体介导的内吞作用, 利用配体-受体的高度结合能力, 可将结合特异性配体的荧光物靶向转运到特定的组织和细胞, 以达到肿瘤组织靶向分布和显像的目的. 偶联生物分子的上转换发光纳米颗粒已经运用于肿瘤跟踪等方面的靶向成像^[14-17]. 叶酸能够被一些人体肿瘤如卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、鼻咽癌等细胞表面过度表达的叶酸受体摄入到真核细胞胞浆内, 而叶酸受体在正常组织的表达又高度保守, 因此利用叶酸受体进行肿瘤特异性显像和治疗备受人们的关注. 将叶酸或具有免疫性的抗体等分子被连接到上转换发光纳米颗粒上用于生物成像的研究相继被报道. Chatterjee 等人^[15]报道应用 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米颗粒偶联叶酸分子后加入到表面含有大量叶酸受体的人腺癌细胞 HT29 和人卵巢癌细胞 OVCAR3 中, 结果表明连接了叶酸的上转换发光纳米颗粒能够特异性地进入到这些细胞内. Wang 等人^[16]在 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 和 $\text{NaYbF}_4:\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}/\text{Ho}^{3+}$ 上转换发光纳米颗粒表面连接兔抗 anti-CEA8 抗体, 形成抗体靶向的上转换发光纳米颗粒, 将这些表面连接了抗体的上转换发光纳米颗粒孵育 HeLa 细胞, 结果表明这些颗粒能够和 HeLa 细胞膜表面的人癌胚抗体(CEA)结合从而使纳米颗粒标记在 HeLa 细胞的表面. 最近, Liu 等人^[17]合成一个 Ir(III)配合物包被的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 纳米晶体, 通过氰根阴离子(CN^-)来阻断上转换发光纳米颗粒和表面包覆的 Ir(III)配合物发生荧光共振能量转移(FRET), 可高选择性地检测 CN^- 及对含有 CN^- 的活细胞进行成像. 这个探针对于 CN^- 具有较低的检测限, 达到 0.18 $\mu\text{mol/L}$.

最近,上转换发光纳米颗粒也被用于转运和监测小干扰核糖核酸(siRNA)的研究^[18-20]. Jiang 等人^[18]在上转换发光纳米颗粒上同时连接抗体和 siRNA,通过抗体和细胞上的抗原相互作用而达到转运 siRNA 的目的,同时利用上转换发光纳米颗粒的荧光可以监测转运过程.例如,他们将叶酸和 anti-Her2 抗体连接到 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 上转换发光纳米颗粒上标记 HT-29 和 SK-BR-3 细胞,将 siRNA 偶联到连接了 anti-Her2 抗体的上转换发光纳米颗粒上,通过颗粒表面的 anti-Her2 抗体和 SK-BR-3 细胞上的 Her2 受体之间的免疫反应从而达到将 siRNA 转运到 SK-BR-3 细胞中的目的.这种细胞内的转运过程和 siRNA 的基因沉默效果可以通过装有近红外激光的共聚焦显微镜来监测.

2.2 在体组织和小动物活体成像

近年来,上转换发光纳米材料应用于活体成像取得了较大的进展而引起了人们极大的兴趣^[21-28]. 2006 年, Lim 等人^[29]首次将 50~150 nm 的 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 稀土上转换发光纳米材料用于线虫的培养,并对线虫的肠道作了成像分析,用 980 nm 激光作为激发光源,可以清晰地看到纳米材料在线虫体内的分布.但是这些发光材料的尺寸比较大,导致它们并不适合用于细胞和活体动物成像.随后, Lim 等人^[30]优化了合成方法而得到了小于 10 nm 的 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 纳米颗粒,这种小的颗粒能更好地对生物体系精细结构标记.但是由于其表面没有修饰合适的官能团而阻碍了其用于生物活体成像.

最近几年,一些具有很强上转换荧光强度和很好水溶性的小尺寸上转换发光纳米颗粒被合成出来用于小动物的活体成像^[31-39].例如,2008 年, Parasad 等人^[32]利用近红外激发和近红外发射的 $\text{NaYF}_4:\text{Tm}^{3+}/\text{Yb}^{3+}$ 稀土上转换发光纳米材料在 Balb-c 小鼠活体中进行了成像研究,激发和发射都是近红外光范围使其能对更深层的组织进行成像. Zhang 等人^[33]开发了一种生物相容性较好的用硅包被的 $\text{NaYF}_4:\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 稀土上转换发光纳米材料,并将其作为细胞示踪成像试剂,将标记了上转换发光纳米颗粒的鼠 SkMS 细胞通过尾静脉注射到小鼠体内后,共聚焦成像观察到小鼠的耳朵血管中有稀土纳米颗粒的荧光信号. Hilderbrand 等人^[34]报道了用生物相容性较好的聚乙二醇修饰稀土上转换发光纳米颗粒 $\text{Y}_2\text{O}_3:\text{Yb}^{3+}/$

Er^{3+} , 用于裸鼠血管的活体成像, 包覆的聚乙二醇能减少其与血管组织的非特异性结合, 延长纳米颗粒在血管中循环的周期. 2011 年, Liu 等人^[35]设计并合成了一种小于 10 nm 的 cit-Lu6-Tm 用于黑鼠的成像, 这也是上转换发光纳米材料第一次用于黑鼠的活体成像, 结果表明 cit-Lu6-Tm 标记的信噪比是 cit-Y1-Tm 的 12 倍, 在黑鼠 2 cm 的深度都能检测到上转换纳米颗粒的信号, 表明 Lu6 具有较好的穿透能力.

稀土上转换发光纳米颗粒不仅能用于小动物活体成像, 而且有望在临床医学研究中发挥重要作用. 连接生物分子的上转换发光纳米颗粒已经被广泛用于肿瘤的靶向性活体成像或药物转运的研究^[36,37]. 近年来, 叶酸被偶联到上转换发光纳米颗粒上被广泛用于叶酸受体过度表达的肿瘤靶向成像. Xiong 等人^[38]通过水热微乳法一步合成得到氨基功能化且水溶性的 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 上转换发光纳米颗粒, 利用交联剂(EDC 和 sulfo-NHS)将叶酸共价偶联到氨基修饰的上转换发光纳米颗粒的表面用于叶酸受体过度表达的 HeLa 肿瘤的活体和组织成像, 在经静脉注射偶联叶酸的上转换发光纳米颗粒探针 24 h 后, 在肿瘤部位可观察到明显的上转换发光信号, 而未偶联叶酸的上转换发光纳米颗粒注射后在小鼠的 HeLa 肿瘤中几乎没有观察到上转换发光信号. 对小鼠进行解剖后, 考察小鼠组织的上转换发光成像发现, 注射偶联叶酸的上转换发光纳米颗粒的小鼠在 HeLa 肿瘤组织显示出明显的上转换发光信号; 相反, 注射未偶联叶酸的上转换发光纳米颗粒的小鼠在 HeLa 肿瘤组织没有检测到上转换发光信号. 表明偶联叶酸的上转换发光纳米颗粒可以用于叶酸受体过度表达的 HeLa 肿瘤的活体和组织靶向成像, 且具有超高的信噪比和光稳定性. RGD 肽是一类含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp)的短肽, 广泛存在于生物体内, 是细胞外多种配体蛋白与整合素结合的位点. 其中, $\alpha_v\beta_3$ 是整合素家族中重要的一员, 整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在多种肿瘤细胞表面和新生血管内皮细胞上有高表达, 但在成熟血管内皮细胞和绝大多数正常器官系统中 $\alpha_v\beta_3$ 不表达或者很少表达, 表明整合素 $\alpha_v\beta_3$ 在肿瘤生长、侵袭和转移过程中起着关键作用. Xiong 等人^[39]设计合成了具有绿光、红光和近红外光发射的稀土上转换发光纳米材料($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$)作为荧光探针, 在上转换发光纳米颗粒上包裹聚乙二醇来延长上转换发光纳米颗粒在活体内的血

液循环时间, 并提高材料的稳定性并降低非特异性吸收, 还能偶联 RGD 肽. RGD 偶联的上转换发光纳米颗粒能对整合素 $\alpha_v\beta_3$ 过度表达的 U87MG 肿瘤进行活体和组织成像, 在注射 4 h 后 U87MG 肿瘤中的上转换发光信号仍然很强, 可持续 24 h; 肿瘤与背景的荧光信噪比高达~24, 在组织深度 600 μm 仍没有自发荧光干扰.

当前, 上转换发光纳米颗粒用于活体成像体系中最大的难题是没有现成的商业成像系统. 2008 年, 马萨诸塞州总医院的分子成像研究中心最先搭建了一套用于上转换发光纳米颗粒标记小动物活体成像的系统^[40], 他们利用该系统进行活体成像和组织解剖证实, 通过尾静脉注射到小鼠体内的上转换发光纳米颗粒主要聚集在肝脏中. 2009 年, 哈佛医学院的 Vinegoni 等人^[41]搭建了一套不同的系统, 通过该系统对上转换发光纳米颗粒标记的小鼠活体成像实验表明, 在成像的过程中几乎没有自发荧光的干扰. 最近, Xiong 等人^[39]也搭建了一套上转换发光纳米颗粒用于小动物活体成像的系统, 该系统能直接对具有稳态激光泵浦上转换发光性质的材料进行实时、安全的活体成像.

上转换发光纳米颗粒如要进一步应用于生物科学和生物医药领域, 其在小动物活体中的毒性研究显得非常重要^[42~45]. Xiong 等人^[43]合成了聚丙烯酸(PAA)包覆的 NaYF_4 稀土上转换发光纳米材料, 这种颗粒粒径均一, 具有好的分散性、水溶性和血清稳定性. 他们长时间研究了其在活体内的分布和毒性, 结果表明 PAA 包覆的上转换发光纳米颗粒对小鼠的生长发育、组织病理学及免疫系统的活性都没有产生明显的影响, 表明可以安全地用于生物活体成像研究.

2.3 多模式活体成像

传统的医学影像技术如 MRI 和 CT 等具有组织分辨率高、对成像深度没有限制等优点, 但价格昂贵且无法获取分子信息, 荧光分子成像技术具有成像快速、价格低廉、无放射性以及具有分子水平的敏感性, 可对活体状态下的生物过程进行细胞和分子水平的定性和定量研究, 但其不足在于无法获取结构信息. 因此将两种或多种成像技术融合, 可实现活体内目标分子的高灵敏度实时、原位监测.

最近几年, 基于上转换发光纳米颗粒的多模式成像用探针的研究成为分子影像技术研究的热点

之一^[46~55]. 例如, Liu 等人^[52]发展了一种简单、快速、高效的方法制备了含有 ^{18}F 和下转换荧光分子的稀土上转换发光纳米晶体. 该方法根据 α -杯芳香烃和上转换发光纳米颗粒表面上的油酸分子通过主客体结合, 将不同尺寸(100~400 nm)或不同合成方法(水热法、共沉淀法和热分解法等)得到的表面为油酸分子的憎水性颗粒转成水溶性的颗粒, 之后在表面组装一个憎水性的下转换荧光分子 Os(II) 配合物, 又通过 ^{18}F 和稀土纳米粒子表面上的 Y^{3+} 离子的特异性结合将 ^{18}F 固定在上转换发光纳米颗粒表面上. 该颗粒通过尾静脉注射到昆明小鼠体内, 能对整个昆明小鼠进行下转换荧光、上转换荧光和 PET 的三模式成像.

Xia 等人^[53]通过在 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ 纳米颗粒(20 nm)表面包被一层 Fe_xO_y (5 nm)作为壳而合成了一类能同时用于 MRI 和上转换荧光双模式成像的核壳式纳米颗粒. 这种核壳式纳米颗粒在 980 nm 激光的激发下发射 800 nm 的近红外上转换荧光, 并且表现出较好的顺磁效应(饱和磁化强度大约为 12 emu/g). 近红外的发射避免了 Fe_xO_y 壳的吸收, 因此可得到较高的信噪比并能够使成像达到更深层的组织, 这种复合颗粒能应用于裸鼠活体的淋巴系统进行 T2 增强的 MRI 和荧光上转换的双模式成像. 毒性实验表明, 该颗粒对小鼠没有明显的毒性影响.

Gd^{3+} 具有 7 个未成对的电子, 能轻易与周围环境中的氢离子结合, 表现出很高的顺磁弛豫, 含有 Gd^{3+} 的材料通常被应用到 MRI 的 T1 正向显影剂中. 2011 年, Zhou 等人^[54]合成了一种含 ^{18}F 和掺杂有 Gd^{3+} 的稀土上转换发光纳米颗粒 $\text{NaYF}_4:\text{Gd}^{3+}/\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$, 该复合颗粒同时具有放射性、磁性和上转换特性, 可用于活体 T1 加权的 MRI, PET 和上转换荧光的三模式成像: 通过掺杂 Yb^{3+} 和 Er^{3+} 来提高在可见光区的上转换荧光强度, 通过掺杂 60% 的 Gd^{3+} 来提供 MRI 的顺磁磁像, 通过标记 ^{18}F 应用于 PET 成像.

CT 具有高分辨率, 可使三维器官和结构清楚显影呈现出病变部位. Xing 等人^[55]合成了一种能用于 CT/MRI/上转换荧光的三模式成像的纳米颗粒. 通过调节包被在上转换发光纳米颗粒($\beta\text{-NaY/GdF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$)表面上二氧化硅的厚度, 吸附在二氧化硅表面的金纳米颗粒能使上转换发光纳米颗粒的荧光强度增加 3~4 倍.

光热治疗是利用光能产生热量而热消融癌细胞的一种治疗方式^[56~59]. 最近, Cheng 等人^[60,61]用逐层

自组装的方法合成了一类集上转换荧光和 MRI 双模式活体成像与光热治疗于一体的稀土上转换发光纳米颗粒。通过金作为壳将 $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 稀土上转换发光纳米颗粒和磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒同时包被形成一个复合颗粒, $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ 提供上转换荧光, Fe_3O_4 提供 MRI 成像, 表面包被的金吸收近红外光而产生热量用于光热治疗。该复合颗粒通过磁场的作用在肿瘤周围聚集程度非常高, 用于小鼠乳腺癌的光热治疗能获得 100% 肿瘤清除效果。

3 前景与展望

光学成像是研究细胞、组织和活体结构和功能的一种非常有效的手段。上转换发光纳米材料是一种低毒、稳定、发光寿命长的新型荧光探针, 其采用近红外连续激光作为激发光源, 具有较深的光穿透深

度、对生物组织几乎无损伤、无生物背景荧光干扰等显著优势。上转换发光纳米材料的研究和应用近几年取得了突飞猛进的发展, 特别是很容易将不同的成像方式所需要的探针集合在一种上转换发光纳米颗粒上而实现多模式的成像。随着上转换发光纳米材料在生物成像中的广泛应用, 如何采用更加简便绿色的方法合成出超小、高量子产率、水溶性的上转换发光纳米颗粒, 如何对上转换发光纳米颗粒表面改性使之兼具高生物相容性和发光量子效率, 将是今后的研究重点。另外, 颗粒的尺寸、组成等都会影响其在生物体系中的毒性水平、生物分布和代谢途径, 所以系统地研究颗粒的性质和其生物学行为之间的关系将是另一个研究重点。伴随着探测技术及成像设备的改进, 上转换纳米发光颗粒在生物成像中将有广阔的应用前景。

参考文献

- 1 Yi G, Peng Y, Gao Z. Strong red-emitting near-infrared-to-visible upconversion fluorescent nanoparticles. *Chem Mater*, 2011, 23: 2729–2734
- 2 Auzel F. Upconversion and anti-Stokes processes with f and d ions in solids. *Chem Rev*, 2004, 104: 139–173
- 3 Wang F, Liu X G. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals. *Chem Soc Rev*, 2009, 38: 976–989
- 4 Haase M, Schafer H. Upconverting nanoparticles. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 5808–5829
- 5 Bouzigues C, Gacoin T, Alexandrou A. Biological applications of rare-earth based nanoparticles. *ACS Nano*, 2011, 5: 8488–8505
- 6 Wang M, Abbineni G, Clevenger A, et al. Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications. *Nanomedicine*, 2011, 7: 710–729
- 7 Zijlmans H J M A A, Bonnet J, Burton J, et al. Detection of cell and tissue surface antigens using up-converting phosphors: A new reporter technology. *Anal Biochem*, 1999, 267: 30–36
- 8 Wu S, Han G, Milliron D J, et al. Non-blinking and photostable upconverted luminescence from single lanthanide-doped nanocrystals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 10917–10921
- 9 Chen C, Sun L D, Li Z X, et al. Ionic liquid-based route to spherical NaYF_4 nanoclusters with the assistance of microwave radiation and their multicolor upconversion luminescence. *Langmuir*, 2010, 26: 8797–8803
- 10 Pichaandi J, Boyer J, Delaney K R, et al. Two-photon upconversion laser (scanning and wide-field) microscopy using Ln^{3+} -doped NaYF_4 upconverting nanocrystals: A critical evaluation of their performance and potential in bioimaging. *J Phys Chem C*, 2011, 115: 19054–19064
- 11 Jiang G, Pichaandi J, Johnson N J J, et al. An effective polymer cross-linking strategy to obtain stable dispersions of upconverting NaYF_4 nanoparticles in buffers and biological growth media for biolabeling applications. *Langmuir*, 2012, 28: 3239–3247
- 12 Priyam A, Idris N M, Zhang Y. Gold nanoshell coated NaYF_4 nanoparticles for simultaneously enhanced upconversion fluorescence and darkfield imaging. *J Mater Chem*, 2012, 22: 960–965
- 13 Yu M, Li F, Chen Z, et al. Laser scanning up-conversion luminescence microscopy for imaging cells labeled with rare-earth nanophosphors. *Anal Chem*, 2009, 81: 930–935
- 14 Ang L Y, Lim M E, Ong L C. Applications of upconversion nanoparticles in imaging, detection and therapy. *Nanomedicine*, 2011, 7: 1273–1288
- 15 Chatterjee D K, Rufaihah A J, Zhang Y. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals. *Biomaterials*, 2008, 29: 937–943
- 16 Wang M, Mi C, Wang W, et al. Immunolabeling and NIR-excited fluorescent imaging of HeLa cells by using $\text{NaYF}_4:\text{Yb},\text{Er}$ upconversion nanoparticles. *ACS Nano*, 2009, 3: 1580–1586

- 17 Liu J, Liu Y, Liu Q, et al. Iridium(III) complex-coated nanosystem for ratiometric upconversion luminescence bioimaging of cyanide anions. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 15276–15279
- 18 Jiang S, Zhang Y, Lim K M, et al. NIR-to-visible upconversion nanoparticles for fluorescent labeling and targeted delivery of siRNA. *Nanotechnology*, 2009, 20: 155101
- 19 Wang F, Banerjee D, Liu Y, et al. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst*, 2010, 135: 1839–1854
- 20 Jiang S, Zhang Y. Upconversion nanoparticle-based FRET system for study of siRNA in live cells. *Langmuir*, 2010, 26: 6689–6694
- 21 Jalil R A, Zhang Y. Biocompatibility of silica coated NaYF₄ upconversion fluorescent nanocrystals. *Biomaterials*, 2008, 29: 4122–4128
- 22 Wang M, Mi C, Zhang Y, et al. NIR-responsive silica-coated NaYbF₄:Er/Tm/Ho upconversion fluorescent nanoparticles with tunable emission colors and their applications in immunolabeling and fluorescent imaging of cancer cells. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 19021–19027
- 23 Kobayashi H, Kosaka N, Ogawa M, et al. In vivo multiple color lymphatic imaging using upconverting nanocrystals. *J Mater Chem*, 2009, 19: 6481–6484
- 24 Tian Z, Chen G Y, Li X, et al. Autofluorescence-free in vivo multicolor imaging using upconversion fluoride nanocrystals. *Lasers Med Sci*, 2010, 25: 479–484
- 25 Eliseeva S, Bunzli J C G. Lanthanide luminescence for functional materials and bio-sciences. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 189–227
- 26 Zhou J C, Yang Z L, Dong W, et al. Bioimaging and toxicity assessments of near-infrared upconversion luminescent NaYF₄:Yb,Tm nanocrystals. *Biomaterials*, 2011, 32: 9059–9067
- 27 Zhan Q, Qian J, Liang H, et al. Using 915 nm laser excited Tm³⁺/Er³⁺/Ho³⁺-doped NaYbF₄ upconversion nanoparticles for *in vitro* and deeper *in vivo* bioimaging without overheating irradiation. *ACS Nano*, 2011, 5: 3744–3757
- 28 Zhou J, Liu Z, Li F Y. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging. *Chem Soc Rev*, 2012, 41: 1323–1349
- 29 Lim S F, Riehn R, Ryu W S, et al. *In vivo* and scanning electron microscopy imaging of upconverting nanophosphors in *caenorhabditis elegans*. *Nano Lett*, 2006, 6: 169–174
- 30 Lim S F, Riehn R, Ryu W S, et al. Upconverting nanophosphors for bioimaging. *Nanotechnology*, 2009, 20: 405701
- 31 Yang T, Sun Y, Liu Q, et al. Cubic sub-20 nm NaLuF₄-based upconversion nanophosphors for high-contrast bioimaging in different animal species. *Biomaterials*, 2012, 33: 3733–3742
- 32 Nyk M, Kumar R, Ohulchanskyy T Y, et al. High contrast *in vitro* and *in vivo* photoluminescence bioimaging using near infrared to near infrared up-conversion in Tm³⁺ and Yb³⁺ doped fluoride nanophosphors. *Nano Lett*, 2008, 8: 3834–3838
- 33 Idris N M, Li Z, Ye L, et al. Tracking transplanted cells in live animal using upconversion fluorescent nanoparticles. *Biomaterials*, 2009, 30: 5104–5113
- 34 Hilderbrand S A, Shao F, Salthouse C, et al. Upconverting luminescent nanomaterials: application to *in vivo* bioimaging. *Chem Commun*, 2009, 45: 4188–4190
- 35 Liu Q, Sun Y, Yang T, et al. Sub-10 nm hexagonal lanthanide-doped NaLuF₄ upconversion nanocrystals for sensitive bioimaging *in vivo*. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 17122–17125
- 36 Cao T, Yang Y, Gao Y, et al. High-quality water-soluble and surface-functionalized upconversion nanocrystals as luminescent probes for bioimaging. *Biomaterials*, 2011, 32: 2959–2968
- 37 Chen Q, Wang X, Chen F, et al. Functionalization of upconverted luminescent NaYF₄:Yb/Er nanocrystals by folic acid-chitosan conjugates for targeted lung cancer cell imaging. *J Mater Chem*, 2011, 21: 7661–7667
- 38 Xiong L Q, Chen Z G, Yu M X, et al. Synthesis, characterization, and *in vivo* targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. *Biomaterials*, 2009, 30: 5592–5600
- 39 Xiong L Q, Chen Z G, Tian Q W, et al. High contrast upconversion luminescence targeted imaging *in vivo* using peptide-labeled nanophosphors using peptide-labeled nanophosphors. *Anal Chem*, 2009, 81: 8687–8694
- 40 Salthouse C, Hildebrand S, Weissleder R, et al. Design and demonstration of a small-animal up-conversion imager. *Opt Express*, 2008, 16: 21731–21737
- 41 Vinegoni C, Razansky D, Hilderbrand S A, et al. Transillumination fluorescence imaging in mice using biocompatible upconverting nanoparticles. *Opt Lett*, 2009, 34: 2566–2568
- 42 Casanova D, Bouzigues C, Nguyen T, et al. Single europium-doped nanoparticles measure temporal pattern of reactive oxygen species production inside cells. *Nat Nanotech*, 2009, 4: 581–585
- 43 Xiong L Q, Yang T S, Yang Y, et al. Long-term *in vivo* biodistribution imaging and toxicity of polyacrylicacid-coated upconversion nanophosphors. *Biomaterials*, 2010, 31: 7078–7085
- 44 Nam S H, Bae Y M, Park Y I, et al. Long-term real-time tracking of lanthanide ion doped upconverting nanoparticles in living cells. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 6093–6097

- 45 Yu X F, Sun Z B, Li M, et al. Neurotoxin-conjugated upconversion nanoprobes for direct visualization of tumors under near-infrared irradiation. *Biomaterials*, 2010, 31: 8724–8731
- 46 Park Y, Kim J H, Lee K T, et al. Nonblinking and nonbleaching upconverting nanoparticles as an optical imaging nanoprobe and T1 magnetic resonance imaging contrast agent. *Adv Mater*, 2009, 21: 4467–4471
- 47 Kumar R, Nyk M, Ohulchanskyy T Y, et al. Combined optical and MR bioimaging using rare earth ion doped NaYF₄ nanocrystals. *Adv Funct Mater*, 2009, 19: 853–859
- 48 Hu H, Xiong L Q, Zhou J, et al. Multimodal-luminescence core-shell nanocomposites for targeted imaging of tumor cells. *Chem Eur J*, 2009, 15: 3577–3584
- 49 Zhou J, Yao L, Li C, et al. A versatile fabrication of upconversion nanophosphors with functional-surface tunable ligands. *J Mater Chem*, 2010, 20: 8078–8085
- 50 Cheng L, Yang K, Li Y, et al. Facile preparation of multifunctional upconversion nanoprobes for multimodal imaging and dual-targeted photothermal therapy. *Angew Chem Int Ed*, 2011, 50: 7385–7390
- 51 Liu Q, Sun Y, Li C, et al. ¹⁸F-Labeled magnetic-upconversion nanophosphors via rare-earth cation-assisted ligand assembly. *ACS Nano*, 2011, 5: 3146–3157
- 52 Liu Q, Chen M, Sun Y, et al. Multifunctional rare-earth self-assembled nanosystem for tri-modal upconversion luminescence/fluorescence/positron emission tomography imaging. *Biomaterials*, 2011, 32: 8243–8253
- 53 Xia A, Gao Y, Zhou J, et al. Core-shell NaYF₄:Yb³⁺,Tm³⁺@Fe₃O₄ nanocrystals for dual-modality T₂-enhanced magnetic resonance and NIR-to-NIR upconversion luminescent imaging of small-animal lymphatic node. *Biomaterials*, 2011, 32: 7200–7208
- 54 Zhou J, Yu M, Sun Y, et al. Fluorine-18-labeled Gd³⁺/Yb³⁺/Er³⁺ co-doped NaYF₄ nanophosphors for multimodality PET/MR/UCL imaging. *Biomaterials*, 2011, 32: 1148–1156
- 55 Xing H, Bu W, Zhang S, et al. Multifunctional nanoprobes for upconversion fluorescence, MR and CT trimodal imaging. *Biomaterials*, 2012, 33: 1079–1089
- 56 Zhang P, Steelant W, Kumar M, et al. Versatile photosensitizers for photodynamic therapy at infrared excitation. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 4526–4527
- 57 Chatterjee D K, Zhang Y. Upconverting nanoparticles as nanotransducers for photodynamic therapy in cancer cells. *Nanomedicine*, 2008, 3: 73–82
- 58 Xia Y N, Cobley C M, Au L, et al. Targeting gold nanocages to cancer cells for photothermal destruction and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, 2010, 7: 577–587
- 59 Chen J Y, Glaus C, Laforest R, et al. Gold nanocages as photothermal transducers for cancer treatment. *Small*, 2010, 6: 811–817
- 60 Wang C, Cheng L, Liu Z. Drug delivery with upconversion nanoparticles for multi-functional targeted cancer cell imaging and therapy. *Biomaterials*, 2011, 32: 1110–1120
- 61 Cheng L, Kang K, Li Y, et al. Multifunctional nanoparticles for upconversion luminescence/MR multimodal imaging and magnetically targeted photothermal therapy. *Biomaterials*, 2012, 33: 2215–2222

Research progress in upconversion nanophosphors for biological imaging

LIU Bo¹, HU Dan², LIU YuPing¹, MA ZhiYa¹ & ZHAO YuanDi¹

¹Britton Chance Center for Biomedical photonics, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics-Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China;

²Hubei Xingfa Chemicals Group Co. Ltd, Yichang 443007, China

The upconversion nanophosphors are a kind of fluorescence materials with near infrared excitation and short wavelength emission. The upconversion nanophosphors can compensate for the deficiencies of the traditional fluorescent labeling materials because of the stability, non-photobleaching, weak photodamage of biological samples, and high fluorescence signal to noise ratio of biological samples. This review focuses on the upconversion nanophosphors in bioimaging applications.

upconversion luminescence, nanomaterials, biological imaging

doi: 10.1360/972012-775