纳米颗粒被动靶向可实现对

骨病

Chao Mi[1,*]、Xun Zhang[1]、Chengyu Yang[2]、Jianqun Wu[5]、Xinxin Chen[3]、Chenguang Ma[1]、Sitong Wu[1,4]、Zhichao Yang[1,4]、Pengzhen Qiao[1]、Yang Liu[2]、Weijie Wu[1]、Zhiyong Guo[1,5]、Jiayan Liao[4]、Jiajia Zhou[4]、Ming Guan[1]、Chao Liang[3,*]、Chao Liu[2,5,*]和Dayong Jin[1,4,*]

1. 悉尼科技大学—南方科技大学生物医学材料与器件联合研究中心，南方科技大学生物医学工程系，中国深圳 2. 南方科技大学生物医学工程系，中国深圳 3. 南方科技大学生物学系， 生命科学学院，中国深圳 4. 悉尼科技大学生物医学材料与器件研究所（IBMD），理学院，澳大利亚 5. 南方科技大学广东省先进生物材料重点实验室，中国深圳

*通讯作者（电子邮箱：jindy@sustech.edu.cn（D. Jin）；liuc33@sustech.edu.cn（C. Liu）；liangc@sustech.edu.cn（C. Liang）；mic@sustech.edu.cn（C. Mi））

摘要：

骨骼健康相关的骨骼疾病通常通过X射线成像进行诊断，但辐射限制了其应用。通过近红外二区窗口（近红外二区，1000-1700 nm）进行光激发和光学成像，可穿透深层组织且无辐射风险，但造影剂的靶向性不具特异性。在此，我们报告，镧系元素掺杂纳米晶可由内皮细胞和巨噬细胞从血管被动转运至骨髓微环境。我们发现，这种被动靶向机制可持续两个月以上。因此，我们开发了一套用于骨病诊断的活体三维及高分辨率平面成像仪器。我们展示了对1 mm骨缺损进行定期监测 超过10天，其分辨率与X射线成像结果相近，同时在预后评估中的应用更加灵活。此外，被动靶向还可用于揭示关节处炎症的早期发作，即类风湿关节炎早期阶段的滑膜炎。此外，所提出的方法在识别骨关节炎症状方面可与μCT相媲美，包括股骨轻度骨质增生（比正常情况厚~100 μm）以及膝关节内毫米级骨赘的生长，这进一步证明了该方法在骨病诊断中的有效性和普适性。

关键词：近红外二区、镧系元素、三维成像、类风湿关节炎、骨关节炎

意义

这项工作为利用具有高空间分辨率的近红外二区成像无创诊断骨病开辟了新方向。专门设计的分子尺寸纳米颗粒可实现超灵敏的活体三维和二维骨骼成像，同时揭示了骨髓细胞摄取与体内清除之间的关联。这不仅能够对活体小鼠进行长达两个月以上的长期监测，还可准确诊断多种常见骨病，包括皮质骨缺损（直径 1 mm）、滑膜炎、类风湿关节炎、骨关节炎、骨赘和骨质增生。

哺乳动物骨骼与肌腱和肌肉共同发挥支撑体重和实现运动的重要功能。从骨骼结构的微观视角可以看到广泛分布的血管网络，以及间充质干细胞和造血干细胞及其后代细胞的生态位[1]。骨骼健康对于维持身体运动能力、免疫力和新陈代谢至关重要[2]。然而，除非使用X射线成像[3–6]，否则一系列常见骨病，包括骨折、骨骼畸形、骨质疏松症、类风湿关节炎、骨关节炎和骨肿瘤，往往难以被发现，直至出现晚期症状。尽管如此，定期暴露于X射线辐射会导致DNA损伤和白细胞死亡，并被世界卫生组织列为“已知人类致癌物”。更具体地说，澳大利亚的一项研究显示，儿童期或青春期接受X射线计算机断层扫描（CT扫描，平均有效辐射剂量为4.5 mSv）会使总体癌症发病率高出24%，且发病率比会随着CT扫描次数增加而上升[7]。据美国食品药品监督管理局称，腹部和骨盆CT扫描的有效辐射剂量为10 mSv，可能使癌症风险增加约2000[8]分之一。迄今为止，尚无其他成像方法能够在活体中观察骨骼的微观结构并监测骨骼健康功能异常。

光学成像能够定期、实时地观察细胞及其功能[9–11]。更重要的是，与可见光（400-700 nm）和近红外一区（700-900 nm）范围相比，近红外二区窗口（1000-1700 nm）的光激发和发射能够穿透深层组织，从而实现高空间分辨率和时间分辨率以及高信背比（SBR）；这是因为光的波长较长，组织散射和自发荧光极少[12–15]。为实现上述潜力，人们已开发出多种近红外二区发光荧光材料，包括半导体量子点（QDs）[16–18]、碳纳米管[19,20]，、镧系元素掺杂纳米晶（LnNCs）[21–25]和有机分子[26–30]，用于诊疗一体化应用[31–33]。然而，要将这些纳米颗粒有效递送至骨细胞结构仍面临挑战，因为纳米颗粒通常会被单核吞噬细胞系统过滤，尤其是在肝脏和脾脏中[34,35]，，更不用说缓慢的血流和骨复合物的高密度了[36]。这些层层叠加的屏障使得使用主动靶向配体最终仅带来有限的改善，注射剂量的靶向率约为0.9%[37,38]。

在此，我们报告一组发射波长为~1550 nm的镧系元素掺杂纳米颗粒能够通过自发细胞转运，从血流被动 迁移至骨髓。这些纳米颗粒在骨骼微环境中具有较高的渗透性，作为近红外二区造影剂，可对骨病早期发病过程进行长期、高分辨率成像。我们展示了其在骨骼疾病精准诊断方面的生物医学转化潜力，适用疾病包括皮质骨缺损、骨赘、骨质增生、 骨关节炎、滑膜炎和类风湿关节炎。

结果与讨论

ErNCs近红外二区探针的制备。我们首先精心合成了形貌和光学均一性极高的 $NaYbF_4$: Er^{3+}, Ce^{3+} 。随后，我们通过异质外延生长惰性壳层，使表面猝灭剂钝化，从而大幅增强荧光，制备出高性能的 $NaYbF_4$: Er^{3+}, Ce^{3+} @$NaYF_4$ (ErNCs)近红外二区探针，如图 1a所示。随后，我们在 ErNCs 表面接枝聚乙二醇（PEG），以延长血液循环时间并减少肝脏摄取（图 1a）；经给药后，聚乙二醇包覆的 ErNCs 可逃避免疫系统中肝脏和脾脏内的单核吞噬细胞。各步骤制备的纳米晶体均表现出高度均一的形貌和良好的分散性（图 1b），聚乙二醇包覆的 ErNCs 在约 1550 nm 处具有近红外二区发射带（图 1c）。根据图 S1所示的细胞毒性检测结果，聚乙二醇包覆的 ErNCs 表现出良好的生物相容性。

选择 ErNCs 作为近红外二区造影剂进行高分辨率成像。我们进一步证实，~1550 nm 的 ErNCs 近红外二区b（1500-1700 nm）发射，与近红外二区a（1000-1500 nm）荧光团的发射相比[11,39]，（例如~1000 nm 的吲哚菁绿发射、~1060 nm 的 $NaYF_4$: Nd^{3+} （NdNCs）的发射，以及~1340 nm 的 NdNCs 发射），能够显著提升成像分辨率，如图1d和S2所示。通过标准的离体测试，图1e和1f进一步以半峰全宽（FWHM）对分辨率提升进行了定量展示：1000、1060、1340 和 1550 nm 通道的数值分别为 1.05、0.86、0.78 和 0.64 mm；而对淋巴管成像的活体结果证实，与 NdNCs 相比，发射波长较长的 ErNCs 表现更优（图1g和1h）。

持续两个月以上的活体**骨骼成像**。尾静脉注射 ErNCs 后~4 小时，血管中的近红外二区信号逐渐消失（图S3和 S4），表明纳米颗粒从血液循环中快速清除。有趣的是，近红外二区成像显示纳米晶体逐渐在骨骼中积聚。无论在活体还是离体条件下，骨结构均可清晰呈现，且具有高分辨率和高对比度。尾静脉注射三天后，背部、胸部和四肢的骨骼结构，包括颅骨、脊柱、胸骨、胫骨、指骨、肋骨和股骨，均已清晰分辨，如活体图像所示（见图2a）。此外，还可清晰观察到多处形态细节，包括脊柱和胸骨的多个节段、生长板以及软骨下骨（膝关节放大区域，经μCT 验证，见图S5）。相比之下，NdNCs 获得的成像结果较为模糊，分辨率也较低（图2b）。值得注意的是，骨结构的长期活体成像可持续 30 天以上（图S6）。注射后，骨骼中的近红外二区信号持续增强，直至第 5 天（图2c和2d），并最终在超过 70 天的长期观察后消失（图S6）。

三维（3D）活体**和**离体**成像**。三维成像比二维图案能够提供更真实、丰富的形态特征。为实现骨骼的三维成像，我们采用多角度旋转法构建小鼠胫骨的多视角图像。如图2e所示，重建的立体图像生动地展示了胫骨和膝关节的三维结构。此外，离体三维成像结果与活体结果吻合良好（图2e、视频1和 2）。与X射线和CT成像相比，近红外二区成像不产生辐射，可用于骨病相关骨骼疾病的长期、无创及时间关键性诊断。

纳米颗粒对骨髓的被动靶向。纳米颗粒的活体转运和分布对其生物医学应用具有重要意义，包括骨靶向成像和药物递送[5]。近期研究认为，这种被动靶向主要归因于PEG包覆纳米颗粒独特的羟基磷灰石矿物结合能力[40]。在我们的研究中，冲洗掉骨髓后，骨骼中的荧光消失，而骨髓间充质则呈现出强烈信号（图 3a）。此外，脱钙后，近红外二区信号

与未脱钙骨相比显著增强（图 3b）。这些结果证实，ErNCs主要积聚在骨髓中，而非与皮质骨结合。

这促使我们深入研究骨髓靶向机制。通过对骨髓切片进行共定位共聚焦成像，我们确认 ErNCs@Cy3 的 Cy3荧光与巨噬细胞通道重叠（图 3c），皮尔逊相关系数高达 0.57，这表明巨噬细胞摄取了 ErNCs。这是因为血浆蛋白（例如免疫球蛋白、黏附介质、补体蛋白）可能充当调理素，与纳米材料结合，从而使巨噬细胞能够有效地吞噬这些纳米材料[35,41,42]。考虑到骨髓内部致密毛细血管网络中的血流缓慢[36,43],，局部巨噬细胞有充足时间捕获纳米颗粒，并将其运送至远离血管的位置[44]。

研究表明，多达 97% 的纳米颗粒通过内皮细胞进入肿瘤，这些内皮细胞位于血管中[45]。我们推测骨髓中也存在类似过程。荧光共定位结果证实了内皮细胞对 ErNCs 的内吞作用（图 3d ）。相反，皮质骨的整个区域完全没有 Cy3 信号（图 3e ）。总之，凭借较长的血液循环时间，ErNCs 经由骨髓内皮细胞和巨噬细胞被动转运，这构成了其卓越骨靶向能力的基础。

毒性研究与完整纳米晶体的体内清除。接下来，我们仔细考察了ErNCs在骨髓中蓄积可能导致的潜在毒性。如图S7所示，ErNCs注射后14天和70天的组织切片苏木精-伊红染色结果显示，细胞结构未见明显损伤或异常。此外，注射后13天内，我们监测到粪便中稳定的近红外二区荧光，表明纳米颗粒正逐渐排出（图S8）。用于活体近红外二区成像的ErNCs具有 良好的生物相容性、可代谢性，且使用安全。

活体**近红外二区检测骨缺损，持续时间最长可达11天**。为评估成像分辨率，我们特意在小鼠胫骨上制造了~1 毫米的单皮质骨缺损（图4a）[3,46]。X射线成像证实，骨损伤部位的直径约为1毫米（图4b）。令人印象深刻的是，活体近红外二区 成像诊断也显示，皮质骨缺损直径约为1.2毫米，尽管手术后近红外二区强度有所下降（图4a和4b）。值得注意的是，

受伤部位周围6毫米范围内荧光强度下降，可能是血液循环受损所致。

由于手术会对软组织造成附带损伤，并导致手术部位 ErNCs 的血液循环不畅，因此我们将 ErNCs 的注射时间推迟至骨手术后 5 天，以便受损的血管网络得以愈合。如图4c所示，骨缺损手术后第 6 至 11 天的长期监测显示，阴影区域与骨缺损的大小相符。接受假手术的对照组在术后第 6 天软组织伤口周围出现轻微异常。横截面强度进一步证实，左后肢的骨缺损大小为 1.2 mm（图4d）；相比之下，术后 11 天在右后肢未检测到缺损，因为骨 损伤的恢复通常比软组织伤口愈合更慢（图S9）。更多近红外二区成像案例见图S10，成像准确测定了手术中任意制备的骨缺损大小，分别为 1.2、1.36 和 1 mm。

高特异性炎症成像揭示类风湿关节炎（RA）的早期发病与进展。RA 是一种慢性自身免疫性骨骼疾病，全球年发病率为每万人 3 例，患病率为 1%[47,48]。近红外二区成像为类风湿关节炎诊断带来了新机遇。在胶原诱导性关节炎（CIA）这一 RA 金标准动物模型中进行近红外二区成像显示，一只患有轻度 RA 的小鼠爪中，有两个趾关节的近红外二区强度高于其他趾关节；而严重 RA 导致的重度肿胀爪在所有趾关节处均出现过曝，与正常小鼠爪中清晰可见的骨骼和关节形成鲜明对比（图 5a 和图 S11）。μCT 分析一致地显示 RA 病情加重（图 5b–5d），这可从爪部三维图像、骨矿物质密度（BMD）以及骨微结构参数骨体积分数（BV/TV）中得到证实，表明近红外二区成像有望用于监测类风湿关节炎进展。

准确识别滑膜炎。类风湿关节炎的早期诊断和治疗受到其病因学未知、初期表现又与其他炎症性疾病相似的限制[49]。类风湿关节炎的病理生理学始于滑膜的慢性炎症，随后侵蚀关节软骨和关节旁骨[48]。若不加以治疗，慢性类风湿关节炎可导致全身性炎症，进而引起心脏、

肝脏及其他器官异常[47]。因此，类风湿关节炎的早期诊断取决于能否准确识别滑膜炎。如图5e 和图 S12a所示，注射 ErNCs 后，发生炎症的脚趾呈现更高的强度，这是因为增殖的巨噬细胞主动吞噬 ErNCs。值得注意的是，这种局部强度增强对炎症具有很高的特异性和敏感性，因为只有近红外二区信号较强的远端关节确实发生了炎症，而同一脚趾中强度正常的近端关节并未发生炎症；这一点经炎症因子 IL- 的免疫荧光成像证实1β (图 5f 和图 S12b)。此外，凭借高分辨率，增强的强度分布与关节侧面的滑膜分布高度吻合（图 5g 和图 S12c），从而排除了类似的炎症性疾病，并确定为滑膜炎。

骨关节炎的近红外二区成像诊断。骨关节炎是最常见的退行性关节疾病，也是导致身体残疾的首要原因。其发生伴随着骨赘形成和软骨丢失[4,50]，，如图6a所示。为展示近红外二区成像在骨关节炎诊断中的优势，我们通过前交叉韧带切断手术建立了小鼠模型。 μCT和番红O-固绿染色结果（图6b）证实，在骨关节炎形成过程中，软骨逐渐退变，骨量逐渐减少。如图6c所示，对照组右膝关节在近红外二区和μCT图像中，从三个视角观察均显示正常形态；而前交叉韧带切断手术后，左膝关节形成的明显毫米级骨赘，则可通过近红外二区和μCT图像清晰分辨。

有趣的是，我们还发现，局部近红外二区强度下降可能预示着骨质增生的生长。如图6d所示，虽然三例对照病例的近红外二区图像均显示了股骨和胫骨，但骨关节炎患者左膝的股骨结构成像不够清晰，因为骨关节炎模型中的近红外二区强度差Δ2 比Δ1 对照病例高出两倍以上（图6e）。这些结果可能表明，骨关节炎的症状表现为皮质骨骨质增生形成及骨赘生长[4,50]，，这会阻挡来自股骨骨髓的近红外二区信号。通过μCT检查证实了近红外二区成像对骨质增生的诊断：左侧股骨内侧髁的骨厚度增加了200 μm以上，而作为对照的右侧股骨通常薄于100 μm（图6f 和6g；更多比较试验见图S13-S15）。相比之下，胫骨很可能没有发生骨质增生

在ACLT组中，因为其近红外二区强度与对照组相似。随后进行的μCT测量证实了这一结论：ACLT组和对照组的胫骨骨厚度均正常且相近（图S16-S17）。

结论与展望

尽管近红外二区体内成像在过去十年中备受关注，但关于近红外二区荧光剂的效率、其骨靶向机制、体内清除途径、生物相容性和毒性的研究仍处于起步阶段[51,52]。本研究通过开发具有高亮度、发射波长为 ~1550 nm 的分子尺度纳米晶体，并对其进行表面聚乙二醇化，实现了对小型皮质骨缺损、类风湿关节炎和骨关节炎的无创、高灵活性、高分辨率影像诊断。与传统的X射线和 μCT 技术相比，近红外二区成像能够提供详细的病灶特征，并获得同样可靠的诊断结果；更重要的是，它没有辐射风险，适合定期使用和长期监测潜在骨病及治疗进展。高分辨率光学成像系统和高效光学材料的快速发展，以及针对不同尺寸和表面性质的纳米颗粒开展体内转运与特异性靶向研究、改善其体内清除的持续努力，将继续推动近红外二区成像领域迈向临床前研究和临床转化。

方法

D详细信息及相关参考文献见补充信息 .

数据可用性

支持本研究结论的所有相关数据均可在本文中查阅，也可在提出合理请求后向通讯作者索取。

参考文献

1. Grüneboom, A. 等。跨皮质毛细血管网络是长骨血液循环的主要通路。Nat .

Metab. **1**, 236–250 (2019). 2. Sivaraj, K. K. & Adams, R. H. 骨中的血管形成与功能。Dev. **143**, 2706–2715 (2016). 3. Liu, C. 等。机械负荷促进原始成骨祖细胞的扩增，并在长骨缺损中组织基质和血管形态。J. Bone Miner. Res. **34**, 896–910 (2019). 4. Zhen, G. 等。机械应力决定关节软骨中 TGFβ 激活的构型。Nat. Commun. **12**, 1–16 (2021). 5. Hu, Y. 等。负载 17β-雌二醇的 PEG化上转换纳米粒子作为骨靶向药物纳米载体。ACS Appl. Mater. Interfaces **7**, 15803–15811 (2015). 6. Grüneboom, A. 等。骨骼系统及其血液供应的下一代成像。Nat. Rev. Rheumatol .

15, 533–549（2019）。7. Mathews, J. D. 等。儿童期或青春期接受计算机断层扫描的 68 万人癌症风险：对 1,100 万澳大利亚人的数据关联研究。BMJ **346**, 1–18（2013）。8. Budoff, M. J. & Shinbane, J. S.《心脏 CT成像：心血管疾病的诊断》。（施普林格国际出版公司，2016）。doi:10.1007/978-3-319-28219-0。9. Gratton, E. 等。一种新型激光断层成像方法。生物成像 **1**, 40–46（1993）。10. Li, B. 等。具有长血液半衰期、用于活体动态血管成像的有机近红外二区分子。Nat. Commun. **11**, 3102（2020）。11. Zhong, Y. 等。利用超亮近红外二区b稀土纳米粒子进行免疫疗法活体分子成像。Nat. Biotechnol. **37**, 1322–1331（2019）。12. Wang, F. 等。使用超导纳米线单光子探测器进行超过 1,700 nm 的活体无创共聚焦荧光成像。Nat. Nanotechnol.（2022）doi:http://dx.doi.org/10.1038/s41565-022-01130-3。13. Qi, J. 等。用于活体大鼠近红外二区解析的高稳定性、高亮度聚集诱导发光点。Nano Today **34**, 100893（2020）。14. Zhao, M. 等。一种肿瘤微环境响应型镧系–花菁FRET传感器，用于肝细胞癌近红外二区发光寿命原位成像。Adv. Mater. **2001172**, 1–7（2020）。15. Mateos, S. 等。利用近红外二区发光纳米点对急性心肌梗死进行即时活体成像。《小型》**16**, 1–10（2020）。16. Yu, M. 等。具有增强近红外二区窗口光致发光的铅掺杂硒化银量子点。《小型》**17**

1–9（2021）

。17. Lian, W. 等. 基于 CuInSe2 量子点的宽带激发近红外二区发光纳米生物探针用于检测循环肿瘤细胞。Nano Today **35**, 100943 (2020). 18. Song, X. 等. 一类新型基于近红外二区金纳米簇的蛋白质生物标记物，用于活体肿瘤靶向成像。Angew. Chemie - Int. Ed. **60**, 1306–1312 (2021). 19. Liang, C. 等. 利用单壁碳纳米管进行成像引导的光热治疗抑制肿瘤转移。Adv. Mater. **26**, 5646–5652 (2014). 20. Robinson, J. T. 等. 利用长循环、具有超高肿瘤摄取能力的碳纳米管，在第二近红外窗口进行体内荧光成像。J. Am. Chem. Soc. **134**, 10664–10669 (2012). 21. Fan, Y. 等. 寿命工程化近红外二区纳米颗粒实现多重体内成像。Nat. Nanotechnol.**13**, 941–946 (2018). 22. Pei, P. 等. 用于近红外二区成像的X射线激活持久发光纳米材料。Nat. Nanotechnol. **16**, 1011–1018 (2021). 23. Chihara, T. 等. 利用稀土掺杂陶瓷颗粒在第二近红外生物窗口中通过荧光寿命进行生物深部温度成像。Sci. Rep. **9**, 1–8 (2019). 24. Yu, S., Tu, D., Lian, W., Xu, J. & Chen, X. 用于生物应用的镧系元素掺杂近红外二区发光纳米探针。Sci. China Mater. **62**, 1071–1086 (2019). 25. Luo, Z. 等. 使用生物正交近红外二区b纳米颗粒进行高特异性体内肿瘤成像。Adv. Mater. **33**

，

2102950（2021）。26. Wu, X. 等。通过近红外二区窗口的宽场照明，在自由活动小鼠中实现无系绳光热深脑刺激。Nat. Biomed. Eng.（2022）doi:10.1038/s41551-022-00862-w。27. Zhou, H. 等。骨肉瘤及肺转移的特异性小分子近红外二区荧光成像。Adv. Healthc. Mater. **9**，1–9（2020）。28. Li, T. 等。用于图像引导的光热治疗的多肽偶联第二近红外有机荧光团。ACS Nano **13**，3691–3702（2019）。29. Wan, H. 等。一种用于生物组织深层三维成像的高亮度有机近红外二区纳米荧光团。Nat. Commun. **9**，1171（2018）。30. Tian, R. 等。编辑近红外二区荧光团的基因工程策略。Nat. Commun. **13**，2853（2022）。

31. Li, Y.、Wen, X.、Deng, Z.、Jiang, M. 和 Zeng, S. 使用发射波长为1525纳米的镧系纳米探针，对骨髓进行活体高分辨率生物成像并诊断骨折。Nano Lett. **22**，2691–2701（2022）。32. Zhu, W. 等。两性离子型聚集诱导发光分子：用于近红外二区荧光成像引导协同光疗的合理分子设计。Adv. Funct. Mater. **31**，2007026（2021）。33. Zhang, M. 等。在近红外二区b窗口发射~1,600纳米的高亮度量子点，用于深层组织荧光成像。Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **115**，6590–6595（2018）。34. Blanco, E.、Shen, H. 和 Ferrari, M. 纳米颗粒设计原理：克服药物递送中的生物屏障。Nat. Biotechnol. **33**，941–951（2015）。35. Walkey, C. D.、Olsen, J. B.、Guo, H.、Emili, A. 和 Chan, W. C. W. 纳米颗粒尺寸和表面化学决定血清蛋白吸附及巨噬细胞摄取。J. Am. Chem. Soc. **134**，2139–2147（2012）。36. Zhu, J. 等。硼替佐米-儿茶酚偶联前药胶束：结合骨靶向与芳基硼酸酯介导的pH响应性药物释放，用于癌症骨转移治疗。《纳米尺度》**10**，18387–18397（2018）。37. Cheng, Y. H.、He, C.、Riviere, J. E.、Monteiro-Riviere, N. A. 和 Lin, Z. 使用基于生理学的药代动力学建模与仿真方法对纳米颗粒递送至肿瘤进行荟萃分析。ACS Nano **14**，3075–3095（2020）。38. Ackun-Farmmer, M. A.、Xiao, B.、Newman, M. R. 和 Benoit, D. S. W. 巨噬细胞耗竭可提高骨靶向纳米颗粒的靶向特异性。J. Biomed. Mater. Res. - Part A **110**，229–238（2022）。39. Mi, C. 等。小鼠胃肠道成像的高空间和时间分辨率近红外二区b成像。Nano Lett. **22**，2793

2800（2022）。40. He, S. 等。用于近红外二区成像的高骨骼亲和性稀土掺杂纳米颗粒。《纳米快报》**19**，2985–2992（2019）。41. Weissleder, R.、Nahrendorf, M. 与 Pittet, M. J. 利用纳米颗粒对巨噬细胞进行成像。《自然·材料》**13**，125–138（2014）。42. Sou, K.、Goins, B.、Takeoka, S.、Tsuchida, E. 与 Phillips, W. T. 表面修饰磷脂囊泡在活体内被骨髓巨噬细胞选择性摄取。《生物材料》**28**，2655–2666（2007）。43. Sun, W. 等。结合唑来膦酸与光热治疗的骨靶向纳米平台，用于治疗乳腺癌骨转移。ACS Nano **13**，7556–7567（2019）。44. Lin, Z. P. 等。纳米颗粒血管外渗后，巨噬细胞会主动将其运送至肿瘤中。ACS Nano **16**，6080–6092（2022）。

45. Sindhwani, S. 等。纳米颗粒进入实体瘤。《自然·材料》**19**，566–575（2020）。46. Liu, C. 等。采用新型骨愈合力学生物学模型研究机械负荷对骨皮质缺损修复的影响。骨**108**，145–155（2018）。47. Prasad, P. 等。类风湿关节炎：治疗策略的进展。《分子与细胞生物化学》（2022）doi:10.1007/s11010-022-04492-3。48. Aletaha, D. 与 Smolen, J. S. 类风湿关节炎的诊断与管理：综述。《美国医学会杂志》**320**，1360–1372（2018）。49. Chen, J. 等。托珠单抗偶联共轭聚合物纳米颗粒用于近红外二区光声成像引导的类风湿关节炎治疗。Adv. Mater. **32**，1–9（2020）。50. Chang, S. H. 等。过度机械负荷通过 gremlin-1–NF-κB 通路促进骨关节炎。Nat. Commun. **10**，1442（2019）。51. Che, Y. 等。利用短波红外荧光量子点对骨骼进行活体实时成像。《纳米尺度》**12**，22022–22029（2020）。52. Li, D. 等。用于骨骼近红外二区荧光成像的金纳米簇。《小型》**16**，1–9（2020）。

致谢

作者感谢国家自然科学基金委员会（62005179、82172386、81922081）、中国博士后科学基金会（2020M682866）、深圳市科技计划（KQTD20170810110913065、20200925174735005）、深圳市科技创新委员会（KQTD20200820113012029、JCYJ20210324104201005）、国家自然科学基金委员会（62005116、51720105015）以及广东省先进生物材料重点实验室（2022B1212010003）提供的经费支持。

作者贡献

D. Jin 和 C. Mi 构思了该项目。D. Jin、C. Liu、C. Liang 和 C. Mi 负责监督研究。X. Zhang、C. Yang、C. Mi、J. Wu、X. Chen 和 Y. Liu 制备了动物模型并进行了成像。S. Wu、Z. Yang、C. Mi 和 Z. Guo 进行了三维成像。C. Mi、C. Ma、P. Qiao 和 W. Wu 合成并表征了纳米晶体。C. Mi、D. Jin 和 C. Liu 开展了研究实验并进行了数据分析。C. Mi 和 D. Jin 制作了图表和补充材料，并在其他作者提供意见的基础上撰写了稿件。所有作者均参与了结果讨论。

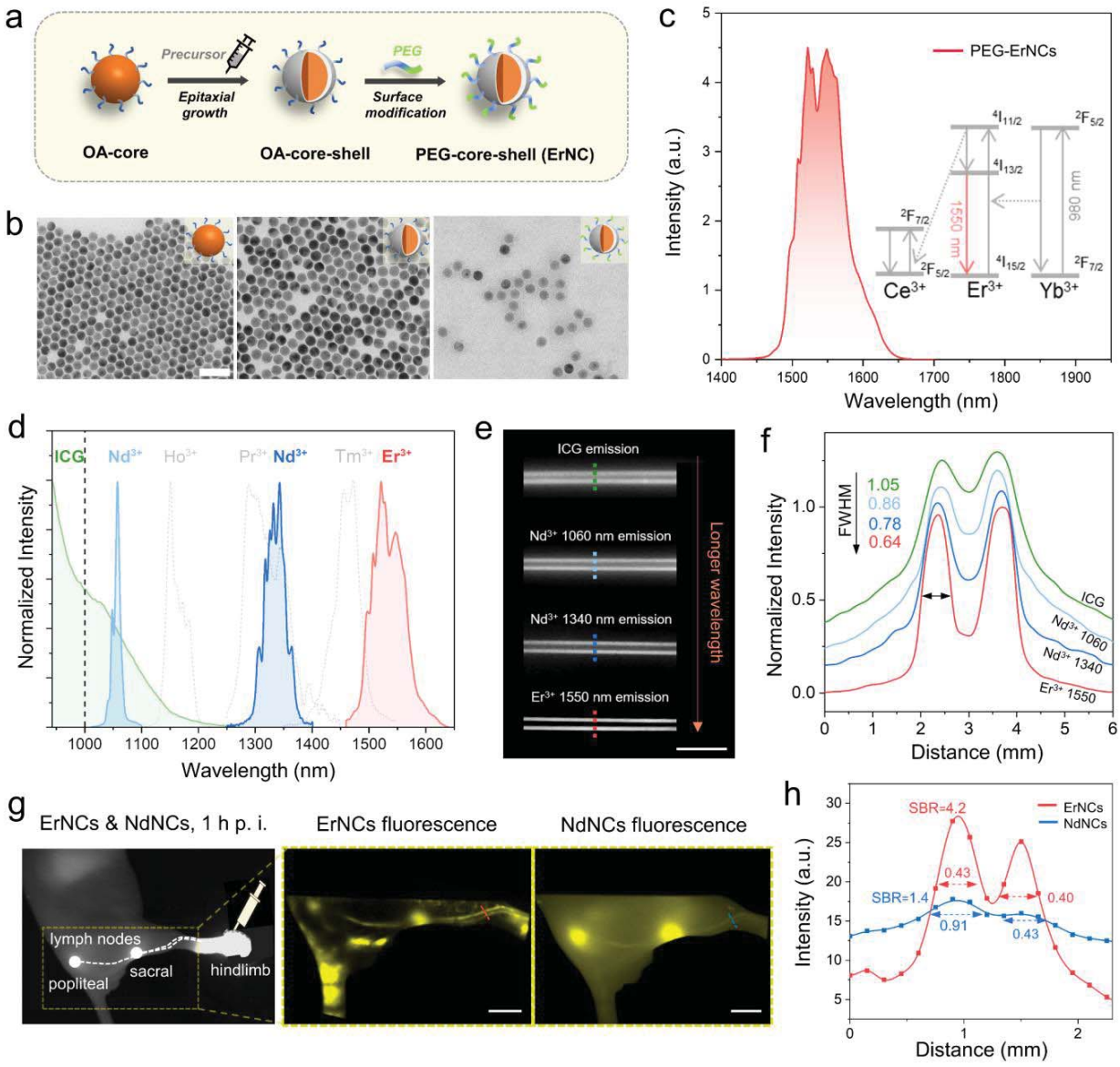


图1. 用于高分辨率NIR-II成像的ErNCs的设计与表征。 a，.....的制备

ErNCs。b，从左至右分别为合成的油酸包覆核、核壳结构 ErNCs，以及聚乙二醇包覆核壳结构 ErNCs 的透射电子显微镜结果。Yb^{3+}、Er^{3+} 和 Ce^{3+}的掺杂浓度分别为 92%、4% 和 4%。比例尺：100 nm。c，制备的聚乙二醇包覆核壳结构 ErNCs 在 980 nm 连续波激光器激发下的发射光谱。插图展示了掺杂的 Yb^{3+}、Er^{3+} 和 Ce^{3+}离子之间实现~1550 nm 发射的简化能量传递路径。d，镧系纳米晶在不同光谱带宽下的近红外二区发射，以及临床批准染料吲哚菁绿的发射。镧系纳米晶包括 Ln=、Nd^{3+}、Ho^{3+}、Pr^{3+}、T m^{3+}和 Er^{3+}。e，代表性近红外二区荧光图像：被 2 mm 厚的 1% 脂肪乳剂覆盖的玻璃毛细管，分别填充吲哚菁绿（~1020 nm 长通）、NdNCs（分别为 1064 nm 带通和 ~1340 nm 带通）和 ErNCs（~1319 nm 长通）。比例

比例尺：5 mm。**f**，对应荧光图像（**e**）中虚线所示横截面的归一化信号强度剖面。**g**，分别使用ErNCs（980纳米激发，38 $mWcm^{-2}$，1319纳米长通滤光）和NdNCs（808纳米激发，34 $mWcm^{-2}$，900纳米长通滤光）对小鼠后肢淋巴系统进行体内近红外二区成像。图像于在同一位置注射10 μl ErNCs和10 μl NdNCs混合物后1小时（1 h p. i.）拍摄。比例尺：5 mm。**h**，比较（**g**）中虚线所示横截面强度剖面上的血管半高全宽和峰值信背比。

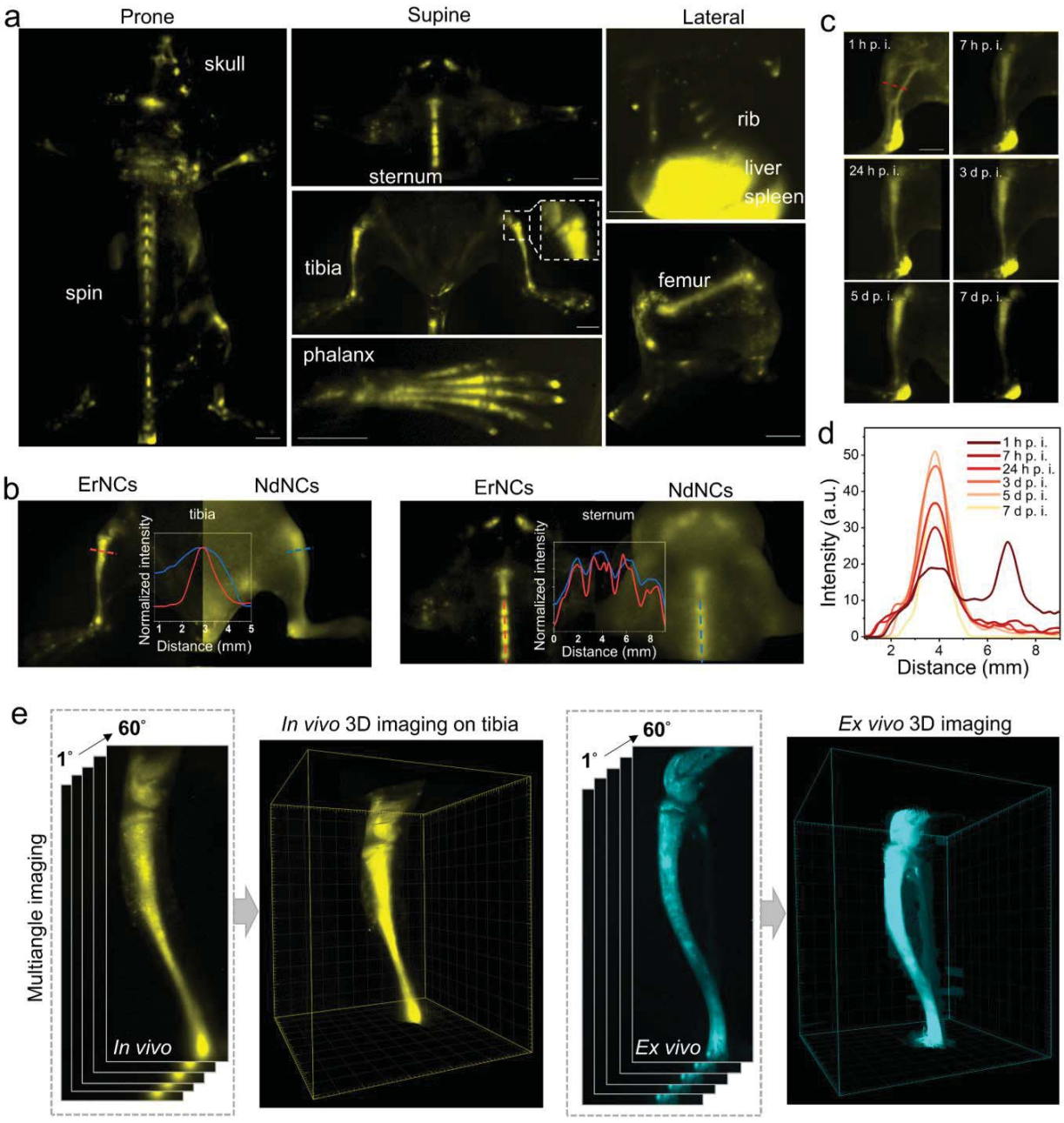


图2. 小鼠骨骼的二维和三维高分辨率NIR-II成像。a, 近红外二区活体

使用1550纳米荧光ErNCs（980纳米激发，38 mWcm^{-2}，1319纳米长通滤光）对小鼠骨骼进行成像，展示其俯卧（颅骨、脊柱）、仰卧（胸骨、胫骨、指骨、放大图中的软骨下骨）和侧卧（肋骨、股骨）姿势。比例尺：2 mm。**b**，分别使用ErNCs（980纳米激发，38 mWcm^{-2}，1319纳米长通滤光）和NdNCs（808纳米激发，34 mWcm^{-2}，900纳米长通滤光）进行骨成像及相应的横截面强度剖面。**c**，在不同注射后时间点（d：天），使用ErNCs（980纳米激发，38 mWcm^{-2}，1319纳米长通滤光，60 ms）对小鼠胫骨进行体内近红外二区成像。 比例尺：2 mm。**d**，横截面

时间序列图像中沿同一位置的强度分布曲线，该位置由（**c**）中的红色虚线表示。**e**，通过采集沿胫骨中心轴旋转不同角度（0°–60°）时记录的一系列图像，重建小鼠胫骨的三维近红外二区成像。

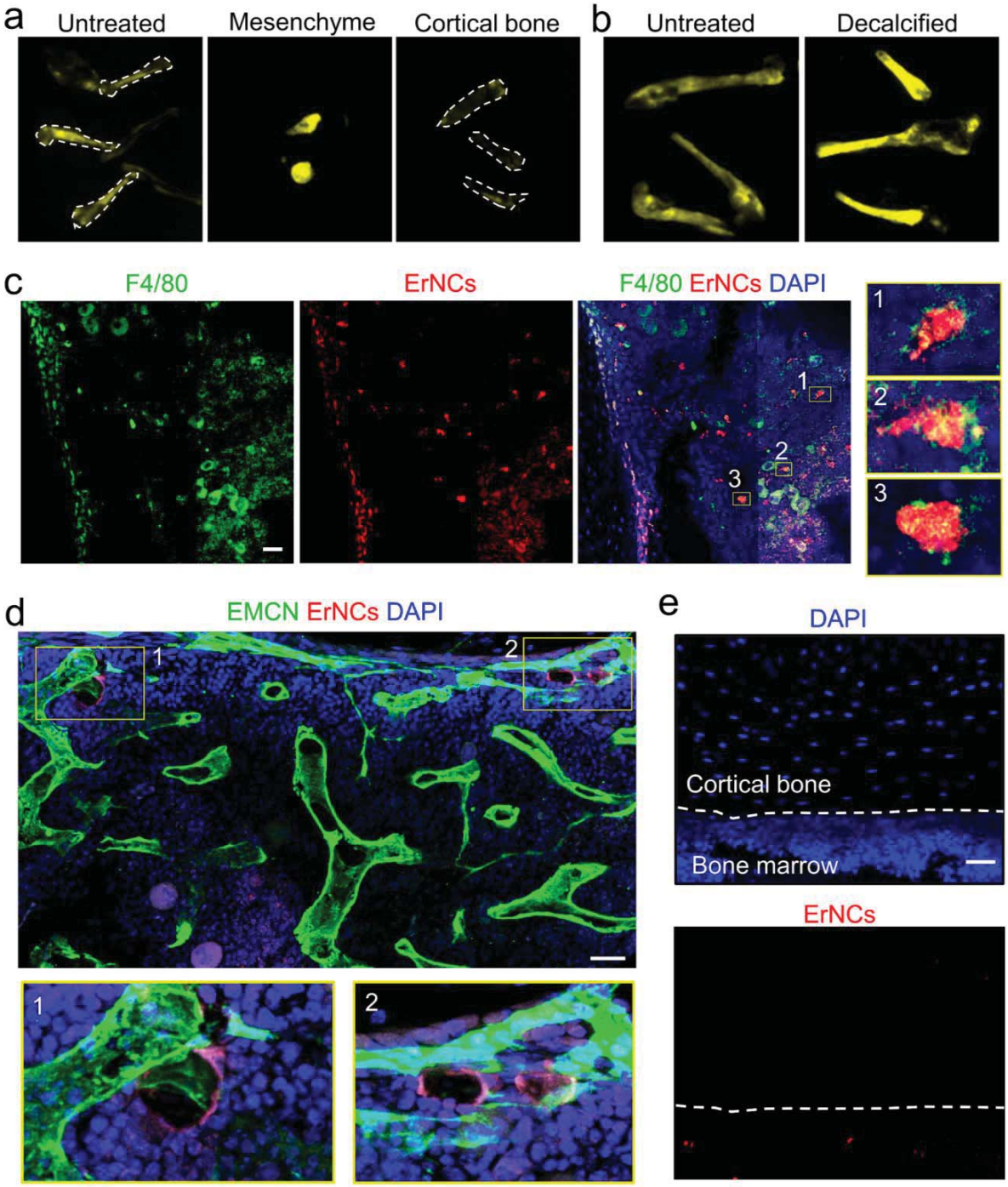


图 3. 细胞摄取　　小鼠骨髓中 ErNCs 的摄取。a，未经处理小鼠股骨的离体近红外二区成像，

给予 ErNCs 后股骨的骨髓间充质，以及去除间充质后的股骨（980纳米激发，38 mWcm^{-2}，1319纳米长通滤光，200 ms）。**b**，给予 ErNCs 后未脱钙骨与 脱钙骨之间的离体近红外二区成像对比（980纳米激发，38 mWcm^{-2}，1319纳米长通滤光，300 ms）。**c**，从一只小鼠采集的染色胫骨切片中骨髓的共聚焦图像，采集时间为36小时

ErNCs@Cy3注射后拍摄的图像，包括三个放大感兴趣区域。绿色通道：F4/80标记的巨噬细胞。红色通道：ErNCs@Cy3。蓝色通道：DAPI标记的细胞核。比例尺：30 μm。**d**，ErNCs@Cy3注射后1 h采集的小鼠胫骨切片染色样本中骨髓的共聚焦图像，包括两个放大感兴趣区域。绿色通道：内皮黏蛋白（EMCN）标记的内皮细胞。红色通道：ErNCs@Cy3。蓝色通道：DAPI标记的细胞核。比例尺：30 μm。**e**，同一小鼠胫骨中（**c**）所示的染色皮质骨区域的共聚焦图像。比例尺：30 μm。

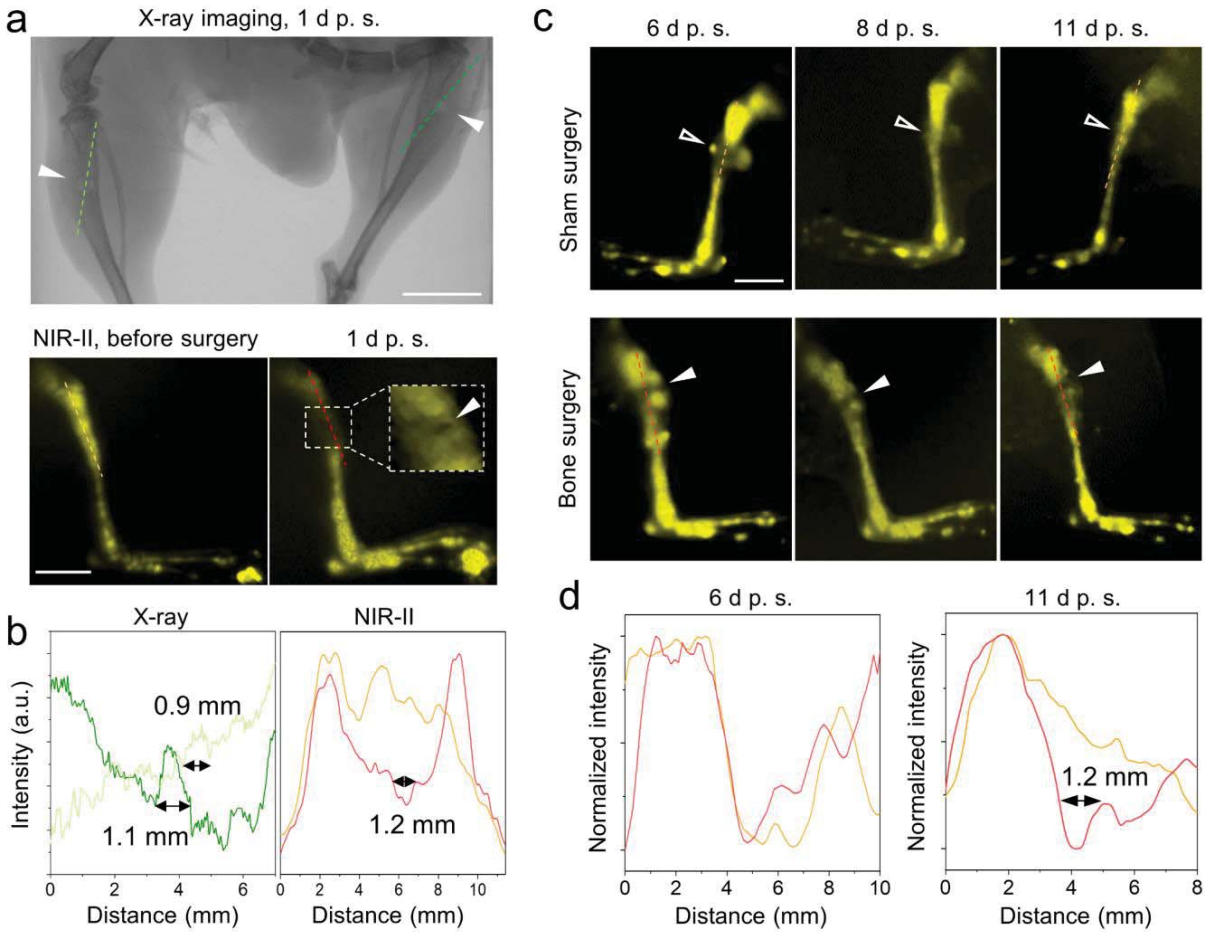


图4. 长期　　小鼠胫骨骨缺损的近红外二区活体成像，与X射线检查进行对比。 a,

胫骨缺损（实心箭头）处X射线成像与NIR-II活体成像的比较。X射线成像于手术后（p. s.）1 d进行，NIR-II成像则分别于手术前和手术后1 d进行。比例尺：5 mm。**b**, 横截面上的强度分布曲线以（**a**）中对应颜色的虚线标示。图中给出了测得的胫骨缺损尺寸。**c**，小鼠手术后第6、8和11天右后肢（假手术作为对照）和左后肢（骨手术）的NIR-II活体成像。右后肢有假手术造成的软组织伤口（空心箭头），而左后肢同时存在软组织伤口和骨缺损（实心箭头）。手术后第5天经尾静脉注射ErNCs。比例尺：5 mm。**d**, （**c**）中假手术组（橙色）和骨手术组（红色）的横截面强度分布曲线以虚线表示。

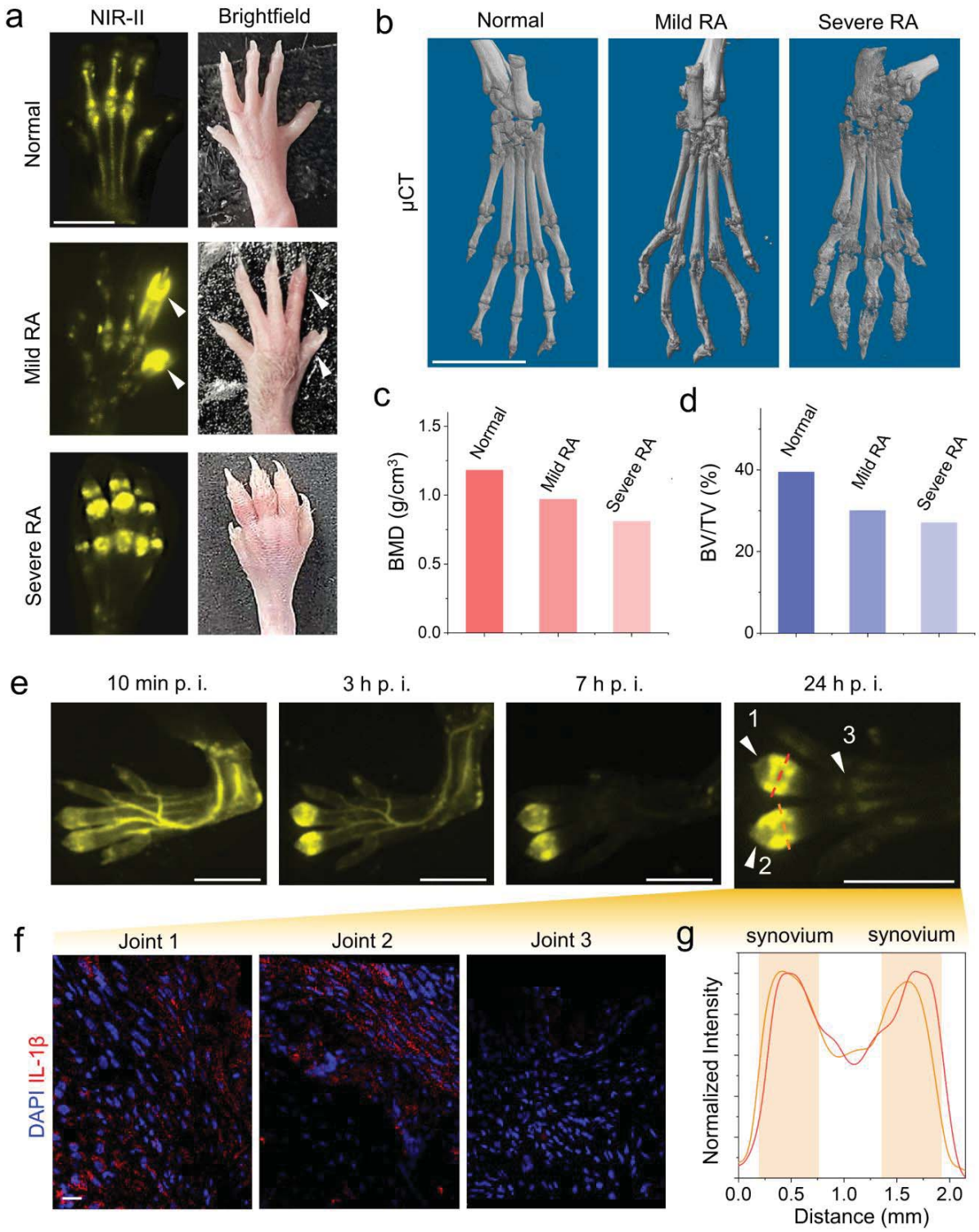


图5. 早期识　　别类风湿关节炎（RA），通过精准的炎症近红外二区成像。 a,

正常小鼠、患有轻度类风湿关节炎（RA）的CIA模型小鼠以及患有重度RA的CIA模型小鼠的后爪在近红外二区成像和明场下的图像。比例尺：5 mm。**b**，代表性的后爪μCT图像

分别来自正常小鼠、患有早期关节炎的CIA小鼠和患有晚期关节炎的CIA小鼠。比例尺：5 mm。**c, d,** 对（b）中所示趾关节的骨矿物质密度（BMD）（c）和骨体积分数（BV/TV）（d）进行定量μCT分析。**e.** 对患有早期关节炎的CIA小鼠后爪进行近红外二区成像的时间序列。 比例尺：5 mm。**f,** 对（e）中后爪三个趾关节（编号箭头所示）滑膜组织中的炎症因子IL-1β 进行免疫荧光分析。比例尺：20 μm。**g,** （e）中虚线所示横截面上的归一化强度曲线。

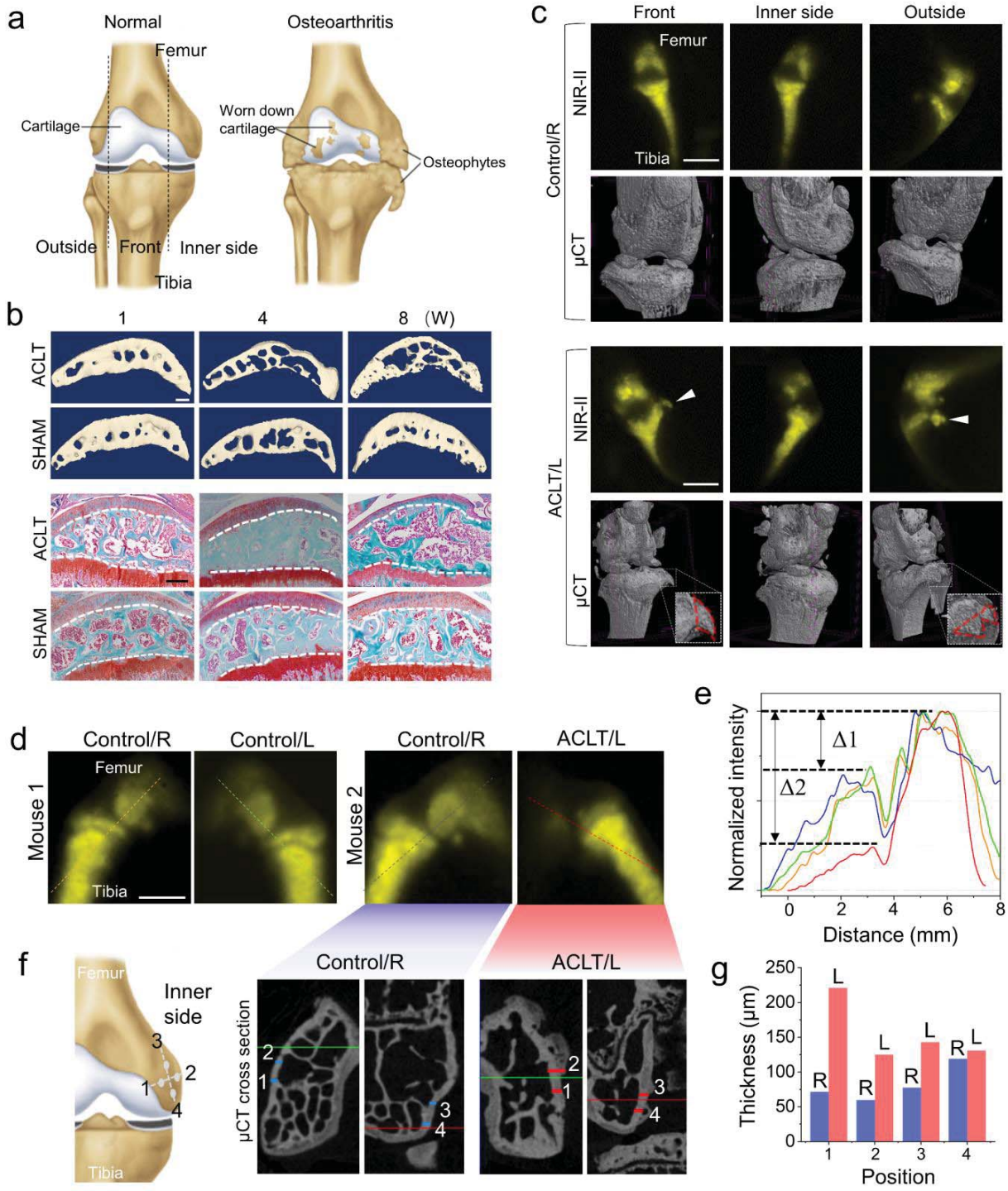


图6. 活体**近红外二区成像诊断骨关节炎，并由μCT证实。** **a**，骨关节炎示意图

与正常关节病相比。**b**，ACLT和假手术后1、4和8周期间，胫骨内侧平台冠状切面的代表性重建μCT图像（第一、二行）以及胫骨平台番红O-固绿染色图像（第三、四行）。比例尺：200 μm。**c**，活体近红外二区成像及

同一只小鼠双侧后膝关节对应的离体重建μCT图像。左膝关节（ACLT/L）于8周前接受了前交叉韧带切断手术，而右膝（对照/R）作为对照未接受手术。实心箭头和红色虚线表示左膝的骨赘。比例尺：5 mm。**d**，两只小鼠膝关节的活体近红外二区成像；只有小鼠2的左膝（ACLT/L）于8周前接受了前交叉韧带切断手术，小鼠1的双膝及小鼠2的右膝未接受处理，作为对照（L：左，R：右）。比例尺：2 mm。**e**，沿横截面的归一化强度曲线如（**d**）中的虚线所示。（橙色：小鼠1右膝，绿色：小鼠1左膝，蓝色：小鼠2右膝，红色：小鼠2左膝）。**f**，（d）中小鼠2左右股骨的离体μCT横截面图像，并示出股骨横截面的位置。**g**，比较小鼠2双侧股骨（L：左，R：右）中（**f**）以编号短线标示的各位置的皮质骨厚度（蓝色：右侧股骨；红色：左侧股骨）。