

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2019082105

王程程, 郑升辉, 张洪武. 利用近红外长余辉发光成像技术研究纳米颗粒经肺暴露后在生物体的迁移途径[J]. 环境化学, 2020, 39(11): 3017-3023.

WANG Chengcheng, ZHENG Shenghui, ZHANG Hongwu. A near-infrared long-term persistent luminescence imaging technique for tracking nanoparticles after endotracheal instillation[J]. Environmental Chemistry, 2020, 39(11): 3017-3023.

利用近红外长余辉发光成像技术研究纳米颗粒经肺暴露后在生物体的迁移途径*

王程程^{1,2} 郑升辉^{1,2} 张洪武^{1**}

(1. 城市污染物转化重点实验室, 中国科学院城市环境研究所, 厦门, 361021; 2. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 大气中的超细颗粒物(粒径小于 100 nm)由于其超小的粒径,容易进入生物体的循环系统,对其造成极大的伤害;并且因其粒径小,这些超细颗粒物很难在生物体内被示踪,因此研究超细颗粒物在生物体内的迁移过程对于研究大气颗粒物毒理具有重要意义.在本文中,采用近红外长余辉发光成像技术来研究超细颗粒物经肺暴露后在生物体内的迁移示踪,选择了具备良好生物相容性的多孔二氧化硅为载体,负载具良好近红外长余辉发光性能的 $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}$ (ZGO)模拟大气中的超细颗粒物($\text{ZGO}@\text{SiO}_2$).研究结果表明,颗粒经由气管入肺后,会经循环系统迁移到体内其他器官,主要分布于心脏、肝脏和脾脏中,少量分布于肾脏,这可以为下一步研究超细颗粒物的生物毒理提供支持.

关键词 超细颗粒, 近红外长余辉成像技术, 气管滴注.

A near-infrared long-term persistent luminescence imaging technique for tracking nanoparticles after endotracheal instillation

WANG Chengcheng^{1,2} ZHENG Shenghui^{1,2} ZHANG Hongwu^{1**}

(1. Key Laboratory of Urban Pollutant Conversion, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, 361021, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract: The ultra-fine particulate matters (less than 100 nm) are easy to enter into circulatory system of organism due to their small particle sizes, which would bring serious harm to organism. On the other hand, these ultra-fine particulate matters are difficult to be observed due to their small particle sizes. Thus, it is very important to investigate the migration behavior of ultra-fine particulate matters in organism. In this paper, we adopted the near-infrared long-term persistent luminescence imaging technology to visualize the migration behavior of ultra-fine particulate matters in organisms via the exposure of lung. Here, the mesoporous silica with good biocompatibility were chosen as templates to load near-infrared long-term persistent luminescence nanoparticles $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}$ to form $\text{ZGO}@\text{SiO}_2$ nanospheres, which could be regarded as stimulated ultra-fine particulate matters. The obtained results showed that nanoparticles could easily enter into other organs after passing through the trachea into the lungs. The nanoparticles mainly distribute in the heart, liver, and spleen, while

2019年8月21日收稿(Received: August 21, 2019).

* 福建省国际合作重点项目(2019I0032)资助.

Supported by the Key Program of International Cooperation of Fujian Province (2019I0032).

** 通讯联系人, Tel: +86 0592 6190773, E-mail: hwzhang@iue.ac.cn

Corresponding author, Tel: +86 0592 6190773, E-mail: hwzhang@iue.ac.cn

little distributed in the kidney. This long time in vivo imaging technique could provide much support for the further investigation on toxicity of ultra-fine particulate matters in the future.

Keywords: ultra-fine particulate matters, near-infrared long-term persistent luminescence imaging technology, endotracheal instillation.

大气细颗粒物($PM_{2.5}$)已经成为我国大气污染的主要诱因,影响着人们生活的各个方面,其中最严重的是它对人体健康所造成的危害^[1-3].在细颗粒物中粒径小于 100 nm 的纳米颗粒(超细颗粒物)由于其粒径小、易穿透生物屏障、体内循环时间长且由于其大的比表面积易于携带其他污染物等,对生物体造成的伤害更为严重^[4-8].

为了更好地了解纳米颗粒物(NPs)经肺暴露后对生物体的影响,对暴露后 NPs 在生物体体内的迁移途径进行示踪具有十分重要的意义.然而,传统的检测方法对在动物体内纳米颗粒的示踪存在许多局限性,电子显微镜方法只能观测生物体微小尺寸内的 NPs 形态,而 ICP-MS 虽然定量检测 NPs,但不能区分 NPs 和离子.因此,急需发展一种新型的示踪技术来解决纳米颗粒在生物体内的难以定位的问题.

近年来,一种新型发光生物成像技术-近红外长余辉发光成像技术^[9-11]逐渐引起研究者的关注.近红外长余辉成像技术是通过纳米长余辉探针在体外蓄光,然后通过肺暴露在体内缓慢释放储存的光,这样就不需要外界激发源来照射生物体,避免了生物体中自激发荧光的影响,极大地提高了发光成像的灵敏度.由于该技术具备成本低、灵敏度高、生物体透过率高、原位长时间实时检测、所造成的生物损伤最小,且可在体外原位反复激发,获得高信噪比的活体图像^[9-13]的特征,因而十分符合纳米颗粒体内示踪的要求.此外,无毒性对于生物体示踪探针来说是其在生物体内使用的保障^[14-15].

在本实验中,选择具有良好生物相容性的纳米二氧化硅作为载体,通过负载具有良好近红外长余辉发光性能的 $ZnGa_2O_4:Cr$ (ZGO)纳米颗粒,形成低毒性近红外纳米长余辉探针,进而通过肺暴露的方式使探针进入小鼠体内,采用活体发光成像技术来研究纳米颗粒经肺暴露后在生物体的迁移途径.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 试剂与仪器

正硅酸乙酯(TEOS)、丙酮、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、无水乙醇、二乙醇胺(DEA)、六水合硝酸锌、九水合硝酸镉都是国药试剂公司(Sinopharm Chemical Reagent, China)的分析纯试剂;六水合硝酸镓采购于阿拉丁试剂公司(Shanghai, China);超纯水($18.2 M\Omega \cdot cm$);马弗炉;H-7650 型透射电子显微镜(TEM, Hitachi, Japan);JEM-2100 (JEOL, Japan);IVIS lumina II 小动物活体成像仪(PerkinElmer, USA);FLS920 光谱仪(Edinburgh, UK);离心机;成年的雄性 KM 小鼠购自上海实验动物中心(Shanghai, China).

1.2 实验方法

(1) 二氧化硅长余辉纳米颗粒的制备及表征

参照之前 Qiao 及其同事已经发表的文章^[16]中的方法,多孔二氧化硅会以 CTAB 作为模板来合成.具体步骤如下:25 mL 超纯水与 0.2 g CTAB 混合,加入 5 mL 无水乙醇和 50 μL 的 DEA,混合均匀,60 $^{\circ}C$ 水浴中持续搅拌 30 min.然后滴加 2 mL TEOS 于上述混合液后再搅拌 2 h.混合液冷却至室温后,将 20 mL 丙酮加入其中,超声 1 min 后再搅拌 5 min.离心洗涤收集沉淀,70 $^{\circ}C$ 烘干.干燥后的样品在马弗炉中 550 $^{\circ}C$ 煅烧 5 h 可去除 CTAB 模板,随即得到多孔二氧化硅.用 TEM 对多孔二氧化硅大小和形貌进行表征.

二氧化硅长余辉纳米颗粒($ZGO@SiO_2$)参照 Shi 等的方法^[9]合成.将 $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 、 $Ga(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 和 $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 分别配置成 $1 mol \cdot L^{-1}$ 、 $2 mol \cdot L^{-1}$ 和 $0.1 mol \cdot L^{-1}$ 的溶液,按 $ZnGaO_4:1\% Cr$ 的比例取上述金属离子溶液混合.然后将离子溶液分若干次与 100 mg 的多孔二氧化硅混合均匀,在 60 $^{\circ}C$ 烘箱中干燥,反复操作直至全部加完,然后再 110 $^{\circ}C$ 烘干干燥 3 h.最后经过 700 $^{\circ}C$ 煅烧 2 h 即得到目标产物 $ZGO@SiO_2$.以 TEM 对合成的 $ZGO@SiO_2$ 大小和形貌进行表征.

(2) 实验动物分组与处理

从上海斯莱克实验动物中心购入健康清洁级 18—22 g 雄性 KM 小鼠 10 只.小鼠购入后于如下条件动物房中饲养:温度为 18—22 °C,相对湿度 50%—60%,昼夜皆是 12 h.适应性饲喂 1 周,期间小鼠自由进食饮水.1 周后小鼠采用经由咽部的非暴露式气管滴注方法^[17],分两组,分别以 50 nm 的 ZGO@SiO₂ 处理 1 次.处理组 1 (3 只):滴注体积为 60 μL (分两次,900 μg);处理组 2 (7 只):滴注体积为 35 μL (17.5 μg).两个处理组的对照皆为未进行过任何处理的正常小鼠.

(3) 二氧化硅长余辉纳米颗粒的体内实时成像

小鼠被处理的即时成像时间记作 0 h,处理后 5 h 记作 5 h,24 h 后记作 1 d,以此类推.先将小鼠以 10% 水合氯醛经腹腔注射进行麻醉后,除掉腹部毛发,进行非暴露式气管滴注处理.材料在滴注前先由 254 nm 的紫外灯激发 10 min.滴注后的小鼠马上放入 IVIS lumina II 小动物活体成像仪的成像仓内收集信号得到成像图片.在第 1 天、第 4 天和第 7 天成像前,使用异氟烷对小鼠实施麻醉后,以 30 W 655 nm 的 LED 灯照射小鼠 60 s 后,IVIS lumina II 小动物活体成像仪收集信号,获得成像图片.处理组 1 和处理组 2 的曝光时间分别是 120 s 和 90 s.对照小鼠则是异氟烷麻醉后,未经 655 nm 的 LED 灯照射,分别以两个处理组的成像设置获取活体成像图像.

(4) 二氧化硅长余辉纳米颗粒的离体器官成像

经非暴露式气管滴注处理后的小鼠,分别在处理后第 1 天 (1 d) 和第 7 天 (7 d) 各取 3 只小鼠先使其颈椎脱臼死亡,解剖分离小鼠心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胃、肠道和睾丸,并用生理盐水反复冲洗.然后用 655 nm 的 LED 灯照射 1 min 后,IVIS lumina II 小动物活体成像仪成像,设置曝光时间 90 s 得到成像结果.

2 结果和讨论 (Results and discussions)

2.1 二氧化硅长余辉纳米颗粒的性质表征

本次实验应用材料的构建和活体成像的流程示意图见图 1A,应用模板法经两步合成了复合材料多孔近红外长余辉发光纳米颗粒 ZGO@SiO₂,再将其在活体层次进行了生物成像.通过 TEM 对本实验中多孔二氧化硅的大小和形貌进行了表征 (图 1B 和 C).制备出的多孔二氧化硅分散性较好,形貌均一,颗粒的尺寸直径为 50—90 nm (图 1B).ZGO@SiO₂ 颗粒形状大致为球形,分散性较好,由高温产生的烧结现象较少,符合生物成像应用的颗粒尺寸和分散性的标准.

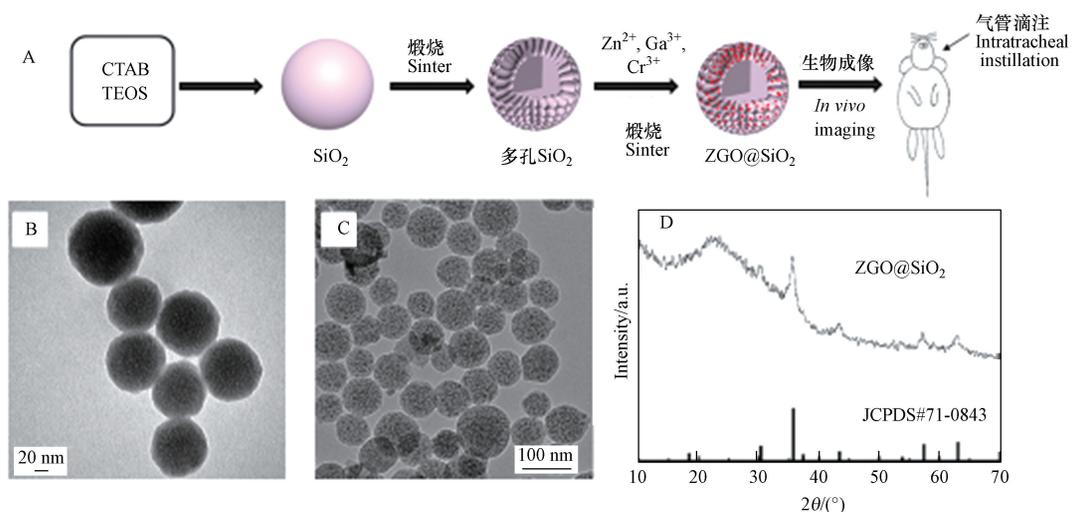


图 1 (A) 复合发光材料 ZGO@SiO₂ 的合成和活体成像示意图; (B) 多孔二氧化硅的 TEM 成像, 标尺为 20 nm; (C) ZGO@SiO₂ 的 TEM 成像, 标尺为 100 nm; (D) ZGO@SiO₂ 的 XRD 图谱

Fig.1 (A) Schematic illustration of preparation of ZGO@SiO₂ for *in vivo* bioimaging; (B) TEM images of mesoporous SiO₂, Scale bar=20 nm; (C) TEM images of ZGO@SiO₂, Scale bar=100 nm; (D) XRD patterns of ZGO@SiO₂

复合发光材料 ZGO@SiO₂ 的 XRD 结果(图 1D) 显示其晶型基本符合镓酸锌 ZnGa₂O₄ 晶型标准卡片 (JCPDS:71-0843). 图 2 为 ZGO@SiO₂ 的激发和发射光谱(图 2A) 和余辉曲线(图 2B). 从发射光谱(图 2A) 看出波长 254 nm 的光激发材料后, 697 nm 处(近红外区) 出现窄带发射峰. 这个发射峰位于第一近红外窗口, 具有比较好的组织穿透能力, 适于生物成像. 激发光谱显示该材料能被可见光激发, 且在 252 nm, 417 nm 和 562 nm 处分别有一个激发峰, 分别归属于⁴A₂→⁴T₁ 和⁴A₂→⁴T₂ 这两个带间跃迁^[18-19]. 图 2B 显示, 经 254 nm 紫外灯激发, ZGO@SiO₂ 在 696 nm 处有明显的长余辉发光, 可持续 2400 s. 更为重要的是, 用 655 nm 的红光 LED 灯重复激发样品 5 min 后, 在 696 nm 处检测长余辉, 发现还可以引起持续发光. 这表明 ZGO@SiO₂ 的余辉信号可能通过原位和体内的重复激发而实现.

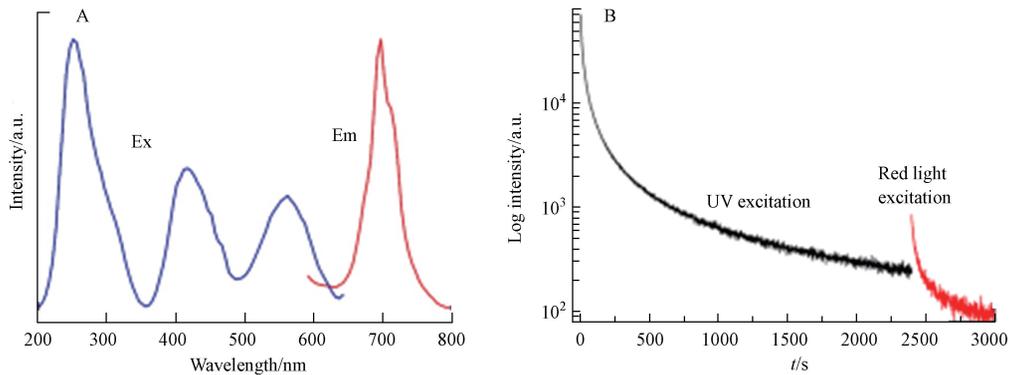


图 2 (A) 复合发光材料 ZGO@SiO₂ 的激发与发射光谱; (B) ZGO@SiO₂ 的余辉曲线

Fig.2 (A) Excitation and emission spectra of ZGO@SiO₂; (B) Afterglow decay curve of ZGO@SiO₂ after 5 min of irradiation with a 254 nm UV lamp and a red light

2.2 二氧化硅长余辉纳米颗粒的体内成像

为直观地了解所合成的 ZGO@SiO₂ 作为新型成像方法的探针在应用中的表现, 选取了一个较大的剂量进行了实验(处理组 1). 在经过 900 μg 的非暴露式气管滴注处理 1 次后, 对其进行了几次体内成像, 结果见图 3. 从图 3 可知, 组织的自发荧光对长余辉成像几乎没有影响. 在处理后的即时成像(0 h) 中, 即便没有解剖也能清楚地看到, 发光材料 ZGO@SiO₂ 进入了小鼠的呼吸系统(气管和双肺), 这与实验预期相符. 图上的气管和双肺轮廓明显、清晰, 此实验成功实现了活体层次的器官呈现. 随后的时间点, 使用组织穿透力较强, 同时又兼具较低生物损伤的 655 nm 红光灯作为长余辉颗粒的再激发光源. 5 h 后的成像图中, 右肺部和气管的光信号仍旧很强, 说明此时纳米发光材料在这两个部位有大量沉积. 1 d 后小鼠咽部(气管上部) 和肺部的光信号即有明显的减弱, 直至在第 4 天和第 7 天几乎检测不到 ZGO@SiO₂ 的信号存在. 因为 5 h、1 d、4 d 和 7 d 均为使用 655 nm LED 灯在相同设置的条件下取得的成像图, 所以认为信号强度的减弱甚至于消失是纳米颗粒被转移出这些部位的结果, 这个结果真实反映了纳米发光材料在小鼠体内的迁移和转化过程的. 即便暴露于高浓度的纳米颗粒(小于 100 nm) 中 1 次, 经呼吸进入小鼠体内的绝大部分的纳米颗粒在 1 周内被排出.

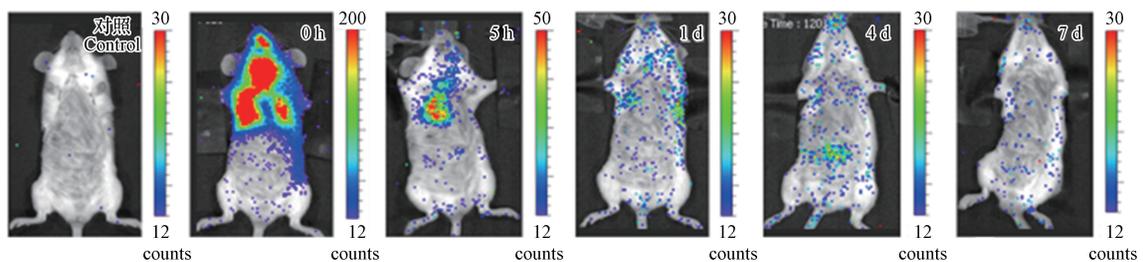


图 3 长余辉纳米颗粒 ZGO@SiO₂ 大剂量气管滴注处理后的小鼠活体成像

Fig.3 *In vivo* persistent luminescence imaging of a mouse after endotracheal instillation of ZGO@SiO₂ NPs with a large amount of dosage

基于上面 ZGO@ SiO₂ 作为探针,大剂量使用后得到的结果,认为此次合成的 ZGO@ SiO₂ 可以作为新型成像方法的探针来使用.于是为了得到更接近于实际生活中的结果,处理组 2 以大气环境中的 PM_{2.5} 平均浓度为 500 μg·m⁻³ 来计算实验剂量,成年小鼠的通气量约为每分钟 24 mL,则一日吸入的颗粒量约为 17.5 μg.按照这个剂量对小鼠进行非暴露式气管滴注处理 1 次,获取不同时间点小鼠的活体成像结果(图 4A),了解该剂量下纳米颗粒在体内的迁移和转化行为.在滴注后的即时成像(0 h)中看到在小鼠腮部和脖子两侧有光信号,会咽部也有光信号存在,但却并未像图 3 中相应时间点那样明确观测到其进入气管和肺部.虽然确定气管滴注后,纳米颗粒一定会进入气管和肺部,应该在这两个部位采集到光信号,但出现这样的结果,推测最主要的原因应该是实验剂量.在这样的剂量下,虽然材料的发射光在近红外区,具有较好的组织穿透能力,但是 ZGO@ SiO₂ 的总量少而使得发光强度不足,最终导致没有得到理想的实验结果.在之后的成像时间点,使用红光激发 ZGO@ SiO₂ 后的结果,也没有看到像图 3 一样的纳米颗粒信号从肺部和气管的聚集到逐渐减少至消失的过程.但是观察到从 5 h 开始,成像图片中较强的信号主要集中在了小鼠嘴巴四周、下颌骨和后脚,尾巴也显示出一定程度上的发光.此外,在小鼠身体两侧及腹面部位也有光信号的存在.虽然处理组 1 的小鼠在上述时间点也在提到的这些位置也有些许光信号,但强度和范围与处理组 2 都显示出了明显的差别.似乎以相对较低剂量处理的组 2, ZGO@ SiO₂ 更倾向于停留分布在组织深度较浅的皮下.

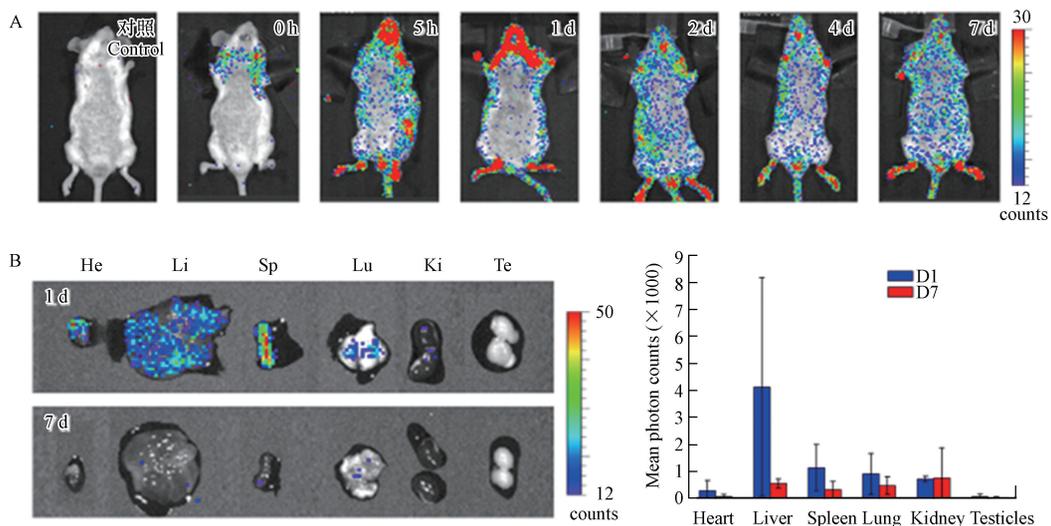


图 4 长余辉纳米颗粒 ZGO@ SiO₂ 的体内和体外成像

- (A) 气管滴注 (17.5 μg ZGO@ SiO₂) 处理后不同时间点的小鼠体内成像;
 (B) 气管滴注处理小鼠在不同时间点离体器官心脏 (He)、肝脏 (Li)、脾脏 (Sp)、肺 (Lu)、肾 (Ki) 和睾丸 (Te) 的体外成像;
 (C) 离体器官不同时间点的光信号强度.强度值以平均值±标准差的形式展示 (n=3)

Fig.4 *In vivo* and *in vitro* persistent luminescence imaging

(A) *In vivo* persistent luminescence imaging of mice after endotracheal instillation of ZGO@ SiO₂ NPs with a dosage of 17.5 μg at different time points. (B) *In vitro* persistent luminescence imaging of heart (He), liver (Li), spleen (Sp), lung (Lu), kidney (Ki) and testicles (Te) collected from KM mice after endotracheal instillation of ZGO@ SiO₂ NPs at different time points. (C) Persistent luminescence intensities of from isolated organs at different time points.

The data represent the mean ±SD (n=3)

为更进一步了解滴注后的纳米颗粒在小鼠体内的分布,解剖分离出了第 1 天和第 7 天这两个时间点的小鼠主要器官.在用 655 nm 波长的 LED 灯激发 1 min 后,获得其体外成像结果(图 4B).在滴注 1 d 后,大部分的器官都检测到了 ZGO@ SiO₂ 的光信号,这与小鼠的体内成像结果不符,却也证实了上文的推测——因剂量不足而导致发光信号穿透组织后太弱而未被相机捕捉到.心脏和脾脏出现了较强的光信号,肝脏有大面积的部位检测到了光信号,肺的部分位置也有光信号,甚至肾脏也存在微弱的光信号.造成这个结果的原因是小于 100 nm 的纳米颗粒容易穿破屏障进入血液,纳米颗粒随着血液循环而进入了其他器官^[4],这就解释了为什么经呼吸道进入的最该在肺部的纳米颗粒会出现在其他主要器官中.心

脏的发光部位更是主要集中在与主动脉连接的上部(即心房),这更说明此部位纳米颗粒的来源是血液.根据已有的报道,超细颗粒物可能直接被肺泡毛细血管转运并作用于心血管系统,引起血液黏稠度的增加和血栓的形成,成为诱发心血管疾病的直接诱因^[4].网状内皮系统(reticuloendothelial system, RES)器官(肝和脾)内含大量巨噬细胞,这些细胞会吞噬捕获纳米探针,这也就使其成为了纳米颗粒被捕获的主要部位.随着时间推移,滴注处理 7 d 后的 RES 器官部位的持续发光信号接近消失,肝脏与脾脏仅有微弱的信号.心脏和肺的发光信号也十分微弱.这一结果与图 3 的体内成像结果一致,说明 ZGO@SiO₂经呼吸系统进入人体后,大部分的纳米颗粒确实在 7 d 内就会代谢排出体外.众所周知,网状内皮系统是一种细胞和组织的网络,它遍布全身,通常存在于结缔组织、肝脏、脾脏和肺中,具有很高的代谢水平和清除异源性物质的能力^[20-21].纳米颗粒在肝脏、脾脏和肺等器官的累积揭示 RES 中的巨噬细胞拦截了其对于纳米颗粒的摄取,并可能随着时间的推移而部分代谢,导致了发光信号的消失.这种涉及 RES 的摄取机制是纳米颗粒在体内的经典行为^[22].例如已有的研究表明各种类型的上转换纳米颗粒通常主要沉积在肝脏、脾脏和肺中,并且可以长时间停留在上述位置^[23].这一实验展示了超细颗粒物经呼吸系统进入体内,又经由呼吸器官进入血液,随血液循环运送到肺外器官和组织中再分布的迁移途径.

3 结论(Conclusions)

本文通过两步法合成了复合纳米近红外长余辉发光材料 ZGO@SiO₂,该材料具有粒径较小,形貌规则,分散性较好的特征,适于作为长余辉成像探针使用.所制备的 ZGO@SiO₂最大发射峰为 697 nm,位于第一近红外成像窗口,具有较好的组织穿透率.经非暴露式气管滴注方式对小鼠进行处理 1 次后,在合适剂量下可以实现在活体层次的器官成像,颗粒经由气管入肺,随后进入到体内其他器官.在相对较小的剂量下,活体内的成像结果受到影响,但体外的器官成像结果仍较为理想.体外结果显示,颗粒经由气管入肺后,会再进入到体内其他器官,主要分布于心脏、肝脏和脾脏中,少量分布于肾脏,随后颗粒会随代谢活动排出体外.

参考文献(References)

- [1] JANSSEN N A, HOEK G, SIMIC-LAWSON M, et al. Black carbon as an additional indicator of the adverse health effects of airborne particles compared with PM₁₀ and PM_{2.5}[J]. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(12): 1691-1699.
- [2] SUHAIMI N F, JALALUDIN J. Biomarker as a research tool in linking exposure to air particles and respiratory health[J]. *Biomed Research International*, 2015, 10: 962853.
- [3] ALEXANDRA G, HURLEY J F, TUOMISTO J T, et al. Health impacts due to personal exposure to fine particles caused by insulation of residential buildings in Europe[J]. *Atmospheric Environment*, 2014, 84: 213-221.
- [4] 胡彬, 陈瑞, 徐建勋, 等. 雾霾超细颗粒物的健康效应[J]. *科学通报*, 2015, 60(30): 2808-2823.
HU B, CHEN R, XU J X, et al. Health effects of ambient ultrafine (nano) particles in haze[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(30): 2808-2823 (in Chinese).
- [5] OBERDÖRSTER G, STONE V, DONALDSON K. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective[J]. *Nanotoxicology*, 2009, 1(1): 2-25.
- [6] LI N, SIOUTAS C, CHO A, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage[J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111(4): 455-460.
- [7] HOHR D, STEINFARTZ Y, SCHINS R P, et al. The surface area rather than the surface coating determines the acute inflammatory response after instillation of fine and ultrafine TiO₂ in the rat[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2002, 205(3): 239-244.
- [8] 李秀, 张勇, 张家泉, 等. 黄石城区夏季大气 PM₁₀/PM_{2.5}中元素特征分析[J]. *环境化学*, 2014, 33(2): 357-358.
LI X, ZHANG Y, ZHANG J Q, et al. Analysis of element characteristics in PM₁₀/PM_{2.5} atmosphere of Huangshi City in summer[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(2): 357-358 (in Chinese).
- [9] SHI J P, SUN X, ZHENG S H, et al. A new near-infrared persistent luminescence nanoparticle as a multifunctional nanoplatfor for multimodal imaging and cancer therapy[J]. *Biomaterials*, 2018, 152: 15-23.
- [10] SUN X, SHI J P, FU X, et al. Long-term *in vivo* biodistribution and toxicity study of functionalized near-infrared persistent luminescence nanoparticles[J]. *Scientific Report*, 2018, 8(1): 10595.
- [11] ZOU R, HUANG J J, SHI J, et al. Silica shell-assisted synthetic route for mono-disperse persistent nanophosphors with enhanced *in vivo*

- recharged near-infrared persistent luminescence[J]. *Nano Research*, 2017, 10(6): 2070-2082.
- [12] ZOU R, GONG S M, SHI J P, et al. Magnetic-NIR persistent luminescent dual-modal ZGOCS@MSNs@Gd₂O₃ core-shell nanoprobes for *in vivo* imaging[J]. *Chemistry of Materials*, 2017, 29(9): 3938-3946.
- [13] SHI J P, FU H X, SUN X, et al. Magnetic, long persistent luminescent and mesoporous nanoparticles as trackable transport drug carriers [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2015, 3(4): 635-641.
- [14] SHI J P, SUN X, LI J L, et al. Multifunctional near infrared-emitting long-persistence luminescent nanoprobes for drug delivery and targeted tumor imaging[J]. *Biomaterials*, 2015, 37: 260-270.
- [15] MALDINEY T, BESSIERE A, SEGUIN J, et al. The *in vivo* activation of persistent nanophosphors for optical imaging of ascularization, tumours and grafted cells[J]. *Nature Materials*, 2014, 13: 418.
- [16] QIAO Z A, ZHANG L, GUO M Y, et al. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles via controlled hydrolysis and condensation of silicon alkoxide[J]. *Chemistry of Materials*, 2009, 21(16): 3823-3829.
- [17] 贾晓峰, 郭新彪. 改进型快速小鼠气管滴注法——透射灯下经口直视滴注法研究[J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(3): 217-219.
JIA X F, GUO X B. Improved technique for rapid endotracheal instillation in mice: Directviewing intubation through oropharynx under the trans-illumination[J]. *Journal of Environmental Health*, 2012, 29(3): 217-219 (in Chinese).
- [18] PAN Z W, LU Y Y, LIU F. Sunlight-activated long-persistent luminescence in the near-infrared from Cr³⁺-doped zinc gallogermanates[J]. *Nature Materials*, 2011, 11: 58.
- [19] LI Y, ZHOU S F, LI Y Y, et al. Long persistent and photo-stimulated luminescence in Cr³⁺-doped Zn-Ga-Sn-O phosphors for deep and reproducible tissue imaging[J]. *Journal of Materials Chemistry C*, 2014, 2(15): 2657.
- [20] CHEN Z, CHEN H, MENG H, et al. Bio-distribution and metabolic paths of silica coated CdSe quantum dots[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 230(3): 364-371.
- [21] YANG Y, SUN Y, CAO T Y, et al. Hydrothermal synthesis of NaLuF₄:¹⁵³Sm, Yb, Tm nanoparticles and their application in dual-modality upconversion luminescence and SPECT bioimaging[J]. *Biomaterials*, 2013, 34(3): 774-783.
- [22] ZHANG X Y, YIN J L, PENG C, et al. Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration [J]. *Carbon*, 2011, 49(3): 986-995.
- [23] GNACH A, LIPINSKI T, Bednarkiewicz A, et al. Upconverting nanoparticles: Assessing the toxicity[J]. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44(6): 1561-1584.