

引用格式: 袁野, 李万万. 无重金属近红外量子点及其荧光成像应用进展[J]. 中国材料进展, 2025, 44(6): 581-591.  
YUAN Y, LI W W. Advances in Heavy-Metal-Free Near-Infrared Quantum Dots and Their Fluorescence Imaging Applications[J]. Materials China, 2025, 44(6): 581-591.

# 无重金属近红外量子点及其荧光成像应用进展

袁野, 李万万

(上海交通大学材料科学与工程学院, 上海 200240)

**摘要:** 荧光成像作为一种高灵敏、实时响应的生物医学成像方式已被广泛应用。近红外(NIR)组织光学窗口内生物组织光吸收和光散射低, 易于获取信噪比高、穿透深和灵敏度高的生物成像。量子点(QDs)因量子限域效应, 具备独特可控的光电特性和出色的光学性能, 是荧光成像的理想材料。相比于高毒性重金属(镉、汞和铅)QDs, 磷化铟、铜铟硫和银基QDs等低生物毒性无重金属QDs更受青睐。通过选择性调节合成方法和材料结构制备高量子效率、NIR发光和低渗透毒性的无重金属QDs仍是挑战。NIR QDs探针构建需要进行靶向、伪装和时效的多种策略方案考虑。聚焦用于荧光成像的无重金属NIR QDs, 兼顾材料的性能调控、光学特性及其荧光成像设计策略, 并展望其在临床应用中的前景。

**关键词:** 近红外窗口; 无重金属量子点; 生物毒性; 荧光成像; 探针设计

中图分类号: TB383; O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-3962(2025)06-0581-11

## Advances in Heavy-Metal-Free Near-Infrared Quantum Dots and Their Fluorescence Imaging Applications

YUAN Ye, LI Wanwan

(School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** Fluorescence imaging has emerged as a highly sensitive and real-time responsive modality for biomedical imaging. Within the near-infrared (NIR) tissue optical window, light absorption and light scattering of tissue are much lower, contributing to high signal-to-noise ratio, deep penetration and highly sensitive bioimaging. Quantum dots (QDs) have garnered significant attention as ideal fluoroprobes for imaging in organisms, owing to their unique and controllable optoelectronic properties arising from the quantum confinement effect. To address biotoxicity concerns, low biotoxicity heavy-metal-free QDs, including InP, CuInS<sub>2</sub> and Ag-based QDs, are favored over their heavy metal containing (Cd, Hg, and Pb) counterparts. However, obtaining heavy-metal-free QDs emitting in the NIR window necessitates selective synthesis methods and QDs structure tuning, which remain challenging in achieving high quantum yield, redshift of the emission band and low permeability toxicity. Moreover, the successful construction of NIR QDs probes for diverse fluorescence imaging scenarios mandates a multi-strategy approach encompassing targeting, camouflage and timing considerations through appropriate surface modifications. This review focuses on heavy-metal-free NIR QDs for fluorescence imaging, considering performance modulation, optical properties of the materials and design strategies for bioimaging. Furthermore, it summarizes the persisting challenges and provides an outlook on the clinical application prospects of such materials.

**Key words:** near-infrared window; heavy-metal-free quantum dots; biotoxicity; fluorescence imaging; probe design

### 1 前言

荧光成像是一种重要的生物医学成像模式, 借助光激发外源荧光探针产生光信号, 实现高信噪比和高分辨率的实时成像。临床前试验已证明荧光成像可用于肿瘤识别、脑损伤鉴定、癌细胞追踪和手术引导等医学诊疗领域, 是疾病早期诊断、病理即时反馈和精准医疗发展的重要支持技术<sup>[1-5]</sup>。由于生物组织中常见的分子会对

收稿日期: 2023-12-18 修回日期: 2024-01-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81971704, 82372089)

第一作者: 袁野, 男, 1998年生, 硕士研究生

通讯作者: 李万万, 男, 1976年生, 研究员, 博士生导师,

Email: wwli@sjtu.edu.cn

DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202312012

紫外至可见光产生吸收和散射作用, 限制该波段光线穿透组织结构的能力<sup>[6, 7]</sup>, 荧光成像波长逐渐从可见光波段红移到近红外(near-infrared, NIR)波段。近红外窗口(650~1880 nm), 也被称为生物组织光学窗口, 可分为650~950 nm 范围的近红外一区(NIR-I)<sup>[8, 9]</sup>和1000~1880 nm 范围的近红外二区(NIR-II)<sup>[10, 11]</sup>, 具有组织穿透能力强、背景自发荧光低等优点(图 1), 更适于监测或激发体内荧光探针。

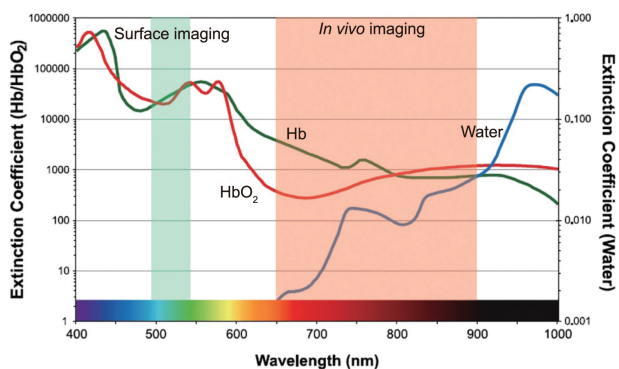


图 1 水和氧合/脱氧血红蛋白在可见光到近红外波段的消光系数<sup>[9]</sup>  
Fig. 1 Extinction coefficient value of water and oxy-/deoxyhemoglobin from visible to near-infrared wavelength<sup>[9]</sup>

从荧光窗口与探针的需求综合考虑, 量子点(quantum dots, QDs)凭借其独特的特性成为荧光成像探针的理想选择之一: ①量子限域效应, 可通过改变材料尺寸调节带隙, 从而影响吸收和发射<sup>[12]</sup>; ②光稳定性优良, 长效成像, 不易淬灭<sup>[13]</sup>; ③斯托克斯(Stokes)位移较传统荧光染料更大, 使用单一激发波长可以进行多色成像<sup>[14]</sup>; ④荧光寿命可调, 具有开发延时探针的能力<sup>[15]</sup>。胶体 QDs 一般由金属阳离子和非金属阴离子组成, 根据金属阳离子类型可分为重金属和无重金属两类(图 2)。其中, 重金属一般指 Cd, Hg 和 Pb, 而 Cu 和 Ag 因其组成的 QDs 具有低生物毒性而被认为是 QDs 研究领域的非重金属元素<sup>[16-19]</sup>。重金属 QDs 凭借优异的量子产率(photoluminescence quantum yield, PLQY)在光电器件和纳米探针等领域备受关注, 但重金属的浸出毒性极大限制了其临床应用<sup>[17, 20, 21]</sup>。随着纳米颗粒的生长控制和结构设计的水平提升, InP<sup>[12]</sup>、Ag<sub>2</sub>Te<sup>[22]</sup>和碳量子点(carbon quantum dots, CQDs)<sup>[23]</sup>等无重金属 NIR QDs 被成功制备, 并表现出良好的生物相容性和极低水平的细胞毒性。近些年, 低毒的无重金属 QDs 作为重金属 QDs 的替代材料被广泛研究, 其合成理论、技术和性能调节方法获得了不断优化和完善。

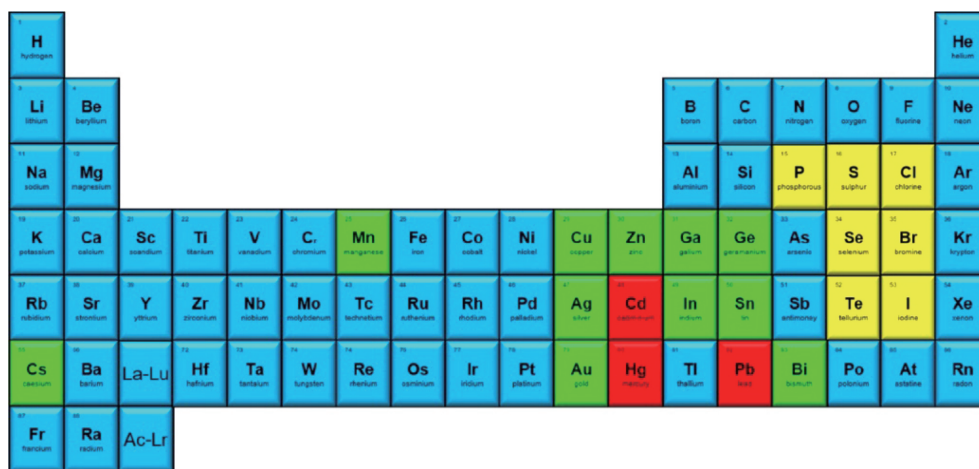


图 2 常见的量子点组成元素和重金属/非重金属元素划分, 红色为重金属阳离子元素, 绿色为非重金属阳离子元素, 黄色为非金属阴离子元素<sup>[17]</sup>

Fig. 2 Common quantum dots constituent elements and heavy/non-heavy metal elements division, red and green represent heavy and non-heavy metal cationic element, yellow is a non-metal anionic element<sup>[17]</sup>

本文主要介绍无重金属 NIR QDs 在性能调控方面的最新进展, 包括光学特性优化、新型制备方法与生物毒性研究, 将按照元素族类分别介绍 III-V 族(如 InP)、I-VI 族(如 Ag<sub>2</sub>S)、多元(如 CuInS<sub>2</sub>)和 IV 族(如 CQDs)等 NIR QDs(汇总见表 1)。其后, 讨论了 NIR

QDs 在生物医学领域荧光成像应用中的最新设计思路, 包括非特异性、主动靶向和环境响应, 每种思路从探针构建、作用机制和特异性分析 3 方面进行介绍。最后, 讨论了 NIR QDs 在临床应用中仍需克服的难题和未来发展前景。

表 1 代表性无重金属近红外量子点性能

Table 1 Performance of representative heavy-metal-free near-infrared quantum dots

Element group	Material	$E_M$ /nm	Size/nm	PLQY/%	FWHM/nm	Ref.
III-V	InP/ZnS	~750	—	40	—	[24]
	InP/ZnS	728	11.5±1.6	16	43	[25]
	Cu:InP	1100	5.8	~4.5	~110	[26]
	ZnSe/InP/ZnS	845	6.8±0.71	4.0	174	[12]
I-VI	Ag <sub>2</sub> S	1050	~3.3	—	216	[3]
	Ag <sub>2</sub> S	1110	40	7.4~7.8	250	[4]
	Ag <sub>2</sub> S	1058	10.2±0.4	—	21	[27]
	Ag <sub>2</sub> S	1220	~10	2.3	~160	[28]
	Ag <sub>2</sub> S	1400	~6.5	—	—	[29]
	Ag <sub>2</sub> Se	1200	2.4±0.5	3.1	120	[2]
	Ag <sub>2</sub> Te	2100	5.9±0.8	12	~100	[30]
	Ag <sub>2</sub> Te/Ag <sub>2</sub> S	1560	5.71±0.11	4.3	—	[22]
Multinary	CuInS <sub>2</sub> /ZnS	1050	9.2	26	—	[31]
	CuInSeS/ZnS	1300	7.8±0.9	—	—	[32]
	AgInSe <sub>2</sub>	1240	23±6	21	~100	[33]
	AgInS <sub>2</sub> /ZnS	760	4.8	55	128	[34]
	ZnCuInSe/ZnS	~800	3~4	20~30	~130	[15]
IV	CQDs	784	6	11	~140	[35]
	CQDs	673	2.7±0.7	31~59	20	[36]
	CQDs	770	6	10	64	[37]
	CQDs	700	2.45	6.8~10.7	~80	[38]

Notes:  $E_M$ : max emission wavelength; PLQY: photoluminescence quantum yield; FWHM: full width at half maximum; CQDs: carbon quantum dots

## 2 无重金属近红外量子点的性能调控

### 2.1 III-V 族近红外量子点

InP 的块体材料带隙 (1.27 eV<sup>[39]</sup>) 小于 CdTe 的 (1.58 eV<sup>[40]</sup>), InP QDs 理论上具备代替 NIR-I Cd 基 QDs 的发光潜力。InP QDs 的细胞毒性与组织病理学研究都未见明显毒性, 呈现良好的生物相容性<sup>[41, 42]</sup>。Xie 等<sup>[24]</sup> 将肉豆蔻

酸作为调节剂, 在脂肪胺体系中使用羧酸钠和硅基磷合成了发射波长达 720 nm 的 InP QDs 核心, 该核心使用 ZnS 包壳后发射波长进一步红移至 750 nm, 是目前 I 型 InP QDs 最长发射波长。然而, 中间体魔幻尺寸团簇 (magic-sized clusters, MSC) 的自发形成阻碍了 InP 核心进一步生长<sup>[43]</sup>。如图 3 所示, 伯胺 (黄色虚线) 会破坏 MSC 的形成, 增加势能, 而羧酸配体则会稳定 MSC, 限制核心的生长<sup>[44]</sup>。

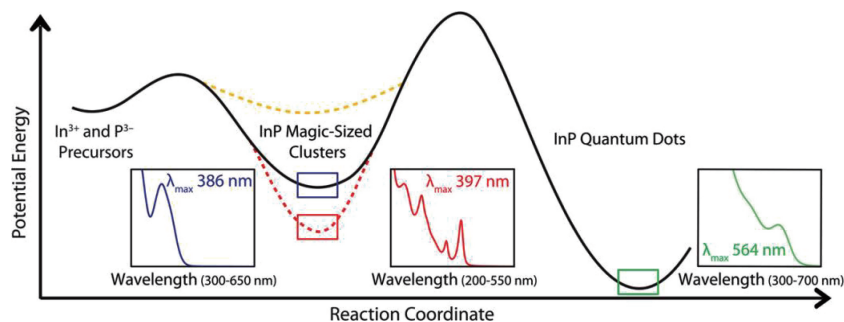


图 3 InP QDs 魔幻尺寸团簇的两步形核生长机理<sup>[44]</sup>

Fig. 3 Two-step nucleation growth mechanism of InP QDs magic-sized clusters<sup>[44]</sup>

绕开瓶颈的策略主要有 Cu 掺杂和核壳设计两种。Xie 等<sup>[26]</sup>最早研究 Cu 掺杂的 InP (Cu:InP) QDs, 通过将 Cu 引入带间能级, Cu:InP QDs 得到超过 1000 nm 的发射波长。Saeboe 等<sup>[12]</sup>设计了反 I 型 InP QDs, 使用连续离子层积反应法在 ZnSe 核心上连续生长单层 InP, 得到了发射波长在 515 ~ 845 nm 波长范围内可调的 ZnSe/InP/ZnS QDs (图 4a)。经过有效质量模型计算得出, 电子被限制在 ZnSe 核心, 空穴来自 InP 壳层, 从而缩小了材料带隙, 实现本征 InP QDs 最长发射波长。

2013 年, 一种使用无机铟和氨基膦作为前体的 InP 合成体系被报道, 该体系更加安全和经济, 目前已在 InP 合成中广泛使用<sup>[45, 46]</sup>。氨基膦体系一般需要添加锌前体, 其复杂作用机制对 InP QDs 的形核与生长有重要调控作用: ① 歧化反应: 卤化锌作为吸电子基团参与磷前体的转氨反应歧化途径, 促进还原型一价磷中间体生成, 从而实现 QDs 尺寸分布窄化<sup>[47, 48]</sup>。② 离子交换: InP QDs

表层的 In 与 Zn 发生置换, 有效粒径降低, 使得 QDs 发光蓝移, 同时又辅助了 ZnS 等壳层生长<sup>[49]</sup>。③ 表面钝化: 卤化锌作为 Z 型配体钝化 InP 表面磷悬挂键并阻断核心生长<sup>[50, 51]</sup>。相比于溴化物和碘化物, 氯化物前体 (InCl<sub>3</sub> 或 ZnCl<sub>2</sub>) 表面钝化引起的发射波长蓝移更短<sup>[47, 52]</sup>。鉴于锌前体的生长抑制作用, Yadav 等<sup>[25]</sup>以 InCl 代替常用的 InCl<sub>3</sub> 作为铟源和还原剂, 在无锌溶液中合成出窄 NIR 发光的 InP QDs, 包壳后发射峰波长可达 728 nm, 半高全宽 (full width at half maximum, FWHM) 仅 43 nm (图 4b)。在氢氟酸原位刻蚀后, InP 核心的 PLQY 可达 40%, 但是包覆 ZnS 壳层后反而降低至 16%, 化学稳定性与 PLQY 之间的平衡仍有待改善。显然, 可综合窄 FWHM 与长发射波长特性的合成方法仍是目前 NIR InP QDs 性能调节的关键与难点。为避免锌前体表面钝化对 InP 核心的生长抑制, 进行前体开发或分离转氨反应与形核步骤有望成为 NIR InP QDs 合成的新突破口。

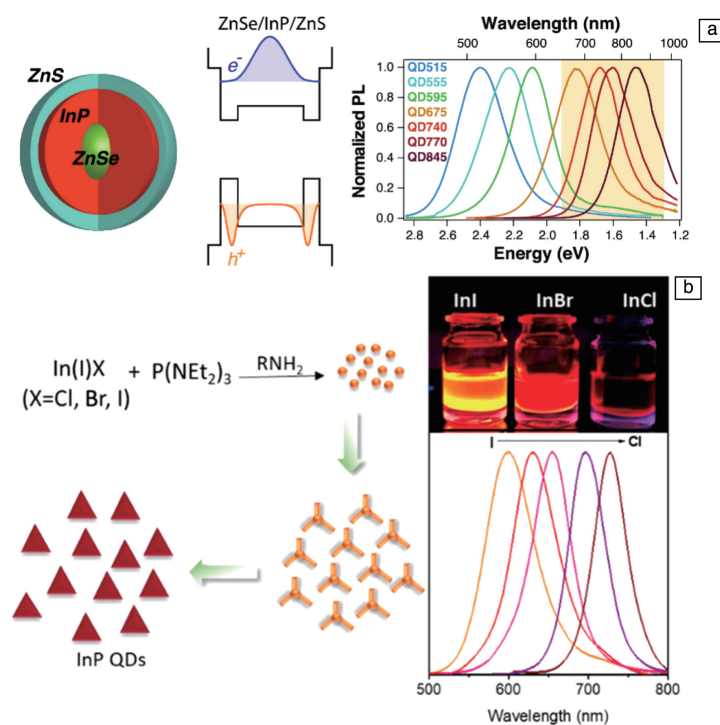


图 4 反 I 型 ZnSe/InP/ZnS QDs 的结构设计、带隙排列与发射光谱 (a)<sup>[12]</sup>, 窄发射 InP NIR QDs 的合成路线和发射光谱 (b)<sup>[25]</sup>

Fig. 4 Structure design, bandgap alignments and photoluminescence spectra of inverse-type I ZnSe/InP/ZnS QDs (a)<sup>[12]</sup>, synthesis routes and photoluminescence spectra of narrow-emission InP NIR QDs (b)<sup>[25]</sup>

## 2.2 I-VI 族近红外量子点

Ag 基 QDs 普遍具有优异的生物相容性, 在细胞增殖、凋亡、活性氧水平和 DNA 损伤方面未观察到显著毒性反应, 在医疗领域被认为是无/低毒 QDs<sup>[53, 54]</sup>。Du 等<sup>[27]</sup>首次使用单一前体, 二乙基二硫代氨基甲酸银的水

合物, 在 1-十八碳烯、油胺 (oleylamine, OAm) 和油酸混合体系中加热到 100 °C, 得到发射波长为 1058 nm 的 Ag<sub>2</sub>S QDs, 且 FWHM 仅为 21 nm。这种单一前体合成体系广泛应用于后续 Ag 基 QDs 研究<sup>[55, 56]</sup>。Ortega 等<sup>[28]</sup>则发现 1-十二硫醇 (1-dodecanethiol, DDT) 在 OAm 溶液体

系中的物质的量分数可同时影响  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs 的荧光寿命和 PLQY (图 5a)。通过精细控制合成体系中的  $n_{\text{Ag}}:n_{\text{S}}$  比例,  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs 的荧光寿命从 184 延长到 1200 ns, 绝对 PLQY 从 0.2% 增加到 2.3%。Deng 等<sup>[29]</sup> 开发了一种细胞内原位合成  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs 的方法, 利用结肠癌细胞中过表达的  $\text{H}_2\text{S}$  和银-鸡蛋蛋白复合物反应合成出 NIR-II  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs, 该 QDs 发射波长范围为 1000~1400 nm。原位生成 QDs 的方法不仅规避了表面修饰对 QDs 光学性能的影响, 还提高了 QDs 在体内荧光成像的精准程度。

$\text{Ag}_2\text{Te}$  QDs 直接带隙更窄, 且具有与  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs 相

同的优异性能和生物相容性<sup>[57]</sup>。Zhang 等<sup>[22]</sup> 采用热注入法将三丁基磷碲注入醋酸银和 DDT 中得到  $\text{Ag}_2\text{Te}$  核心, 随后加入 OAm-S 包壳得到 NIR-II 发射的  $\text{Ag}_2\text{Te}/\text{Ag}_2\text{S}$ 。  $\text{Ag}_2\text{S}$  钝化富 Ag 表面的设计会减弱热电子的非辐射跃迁, 显著提升材料的 PLQY 和稳定性。Liu 等<sup>[30]</sup> 从软硬酸碱理论出发, 成功破解了  $\text{Ag}_2\text{Te}$  QDs 的尺寸控制难题。作为软碱的三烷基磷碲 ( $\text{R}_3\text{P}=\text{Te}$ ) 在合成过程中与作为软酸的  $\text{Ag}^+$  配位,  $\text{R}_3\text{P}$  可诱导小尺寸  $\text{Ag}_2\text{Te}$  的溶解, 使 QDs 发射波长在 950~2100 nm 的宽范围内精准可调 (图 5b)。

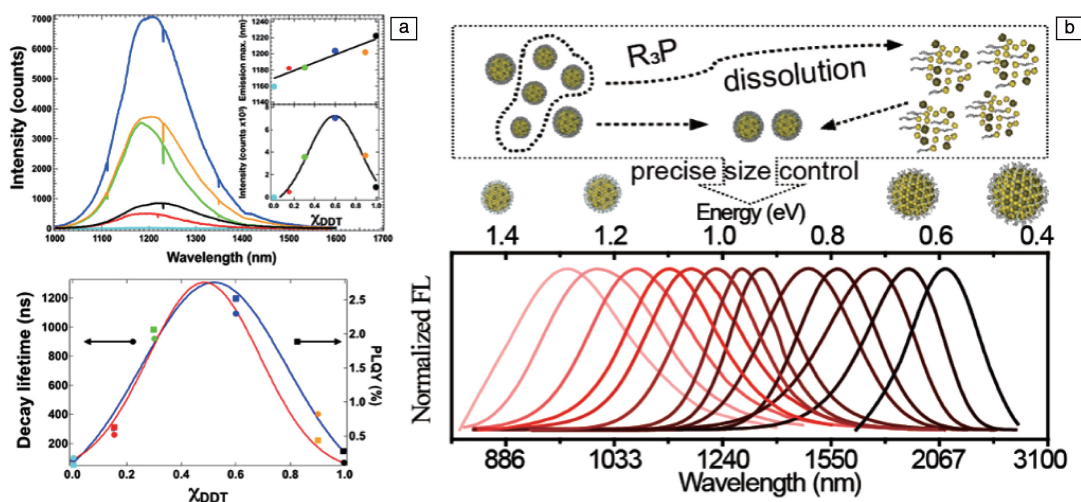


图5 1-十二烷硫醇物质的量分数对  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs 荧光强度、量子产率和荧光寿命的影响(a)<sup>[28]</sup>,  $\text{R}_3\text{P}$  对  $\text{Ag}_2\text{Te}$  尺寸调控示意图和发光调节效果(b)<sup>[30]</sup>

Fig. 5 Effect of 1-dodecanethiol molar fraction on the photoluminescence intensity, photoluminescence quantum yield and fluorescence lifetime of  $\text{Ag}_2\text{S}$  QDs (a)<sup>[28]</sup>, schematic diagram of  $\text{Ag}_2\text{Te}$  precise size control by  $\text{R}_3\text{P}$  and consequent photoluminescence spectra (b)<sup>[30]</sup>

### 2.3 I-III-VI 族等多元近红外碳量子点

$\text{CuInS}_2$  (CIS) 和  $\text{AgInS}_2$  (AIS) 等 I-III-VI 族 QDs 具有带隙发射位于 NIR-I 区的特性, 且生物毒性较低, 是药物递送和多模态荧光成像领域的热门材料<sup>[58]</sup>。Xia 等<sup>[31]</sup> 认为纤锌矿结构 CIS QDs 具备更长发射波长, 使用 In(III) 替换  $\text{CuS}$  中的 Cu(I), 包壳后得到在 750~1100 nm 发光的 CIS/ $\text{ZnS}$ , 在 820 nm 处 PLQY 高达 75%, 在 1050 nm 处 PLQY 可达 26% (图 6a)。Lim 等<sup>[59]</sup> 使用两种硫源 (DDT 和六甲基二硅硫烷) 进行合成, 以改进 CIS 的尺寸均匀性, 所得 QDs 发射波长可达 920 nm。Kubicek 等<sup>[32]</sup> 还报道了一种四元的  $\text{CuInSeS}/\text{ZnS}$  QDs, 通过改变  $n_{\text{Se}}:n_{\text{S}}$  比例调控该 QDs 在 550~1300 nm 范围内的发射波长, 其生物毒性远低于商业化 Cd 基 QDs。Kays 等<sup>[60]</sup> 研究了 CIS/ $\text{ZnS}$  QDs 和 Zn:CIS QDs 的光学性能与生物相容性。ZnS 包覆 CIS 核心将导致发射波长蓝移 140 nm, 而不影响细胞毒性; Zn 掺杂仅导致 10 nm 轻微蓝移, 但裸露核心在小鼠体内诱发了严重的肝、脾毒性。CIS 展现出 NIR-I

全谱范围的可调发光性能和较高 PLQY, 但仍需研发合适的包壳方法, 以避免核心快速分解导致的浸出毒性。

有机相制备的 AIS 等 QDs 在转水相过程中会产生大量表面缺陷, 严重影响其光学性能, 因此目前普遍采用水相体系进行合成<sup>[61]</sup>。Langevin 等<sup>[33]</sup> 提出了新的热解法, 通过 Ag-In-硫代酸络合物热解再进行阴离子交换, 获得了在 950~1250 nm 发光的  $\text{AgInSe}_2$  QDs。Delices 等<sup>[34]</sup> 报道了一种两步合成 AIS/ $\text{ZnS}$  QDs 的水相热注入法, 合成路线见图 6b。快速注入获得的核心具备更高的 PLQY (36%), 包覆 ZnS 后 PLQY 可达 55%, 偶联单链 DNA 修饰后亮度并未减损。Soares 等<sup>[62]</sup> 系统性研究了微波水热法制备 AIS 过程的主要参数, 开发了用于指导可重复、高精度微波合成的参数优化数学模型, 模型预测结果与实验结果具有良好的一致性。

### 2.4 IV 族近红外碳量子点

IV 族 CQDs 在单壁碳纳米管纯化过程中被发现, 具有优异的生物相容性, 以及良好的光学特性和 NIR 发光

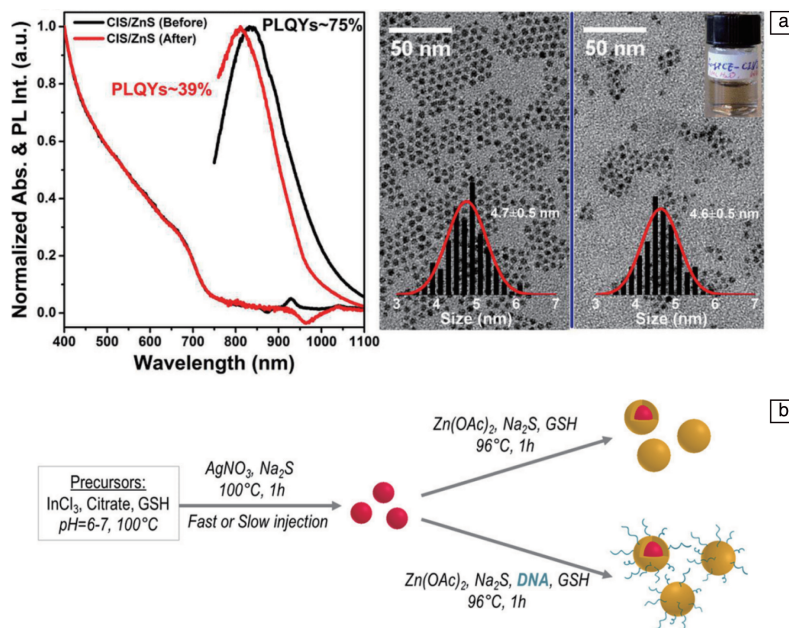


图 6 发射波长为 820 nm 的 CIS<sub>2</sub>/ZnS 在有机相中和水相中的发光性能与粒径对比 (a)<sup>[31]</sup>, AIS/ZnS NIR QDs 的水相热注入制备和 DNA 修饰合成示意图 (b)<sup>[34]</sup>

Fig. 6 Photoluminescence properties and particle size of CIS<sub>2</sub>/ZnS with 820 nm emission in organic and aqueous phases (a)<sup>[31]</sup>, schematic diagram of aqueous-phase hot-injection and DNA-modified synthesis of AIS/ZnS NIR QDs (b)<sup>[34]</sup>

特性, 引起了广泛的研究<sup>[23, 63]</sup>。Li 等<sup>[35]</sup>通过结合溶剂热法和微波加热方法合成出 780 nm 发光和具有热致上转换特性的 CQDs。他们使用柠檬酸、尿素和二甲基酰胺在高压釜中合成石墨烯层状红光 CQDs, 之后经过微波照射剥脱出 NIR CQDs。Liu 等<sup>[36]</sup>报道了用红豆杉叶片制备高性能深红激发 CQDs, 该 CQDs 在 660 nm 激发下的 PLQY 可达 31%, FWHM 仅为 20 nm。Li 等<sup>[64]</sup>利用西瓜汁等生物质原料, 采用水热法合成了可用于肿瘤光热治疗 (photothermal therapy, PTT) 的 NIR-II CQDs 探针, 该探针发射波长达 900~1200 nm, 兼具高 PLQY 和可被肾脏快速滤除的特点 (图 7)。Li 等<sup>[37]</sup>发现利用电子受体基团, 即富含氧化硫/羰基的分子或聚合物, 对 CQDs 进行表面修饰, 可调控 CQDs 的 NIR 吸收和 NIR 荧光增强。使用聚乙烯吡咯烷酮修饰的 CQDs 实现了 NIR-I 激发和发射, 及在 NIR-II 窗口激发的双光子/三光子诱导荧光。IV 族 CQDs 显示出了从多激发到多发射的丰富发光机制, 有利于复杂 NIR 荧光探针的设计。CQDs 的生物质合成特色与可持续发展的绿色化学理念相契合, 低温合成技术的突破有望推进体内原位生成荧光探针的研发。

### 3 无重金属近红外量子点的荧光成像设计策略

#### 3.1 非特异性荧光成像

荧光成像的高分辨率、快速响应特性与 NIR QDs 的

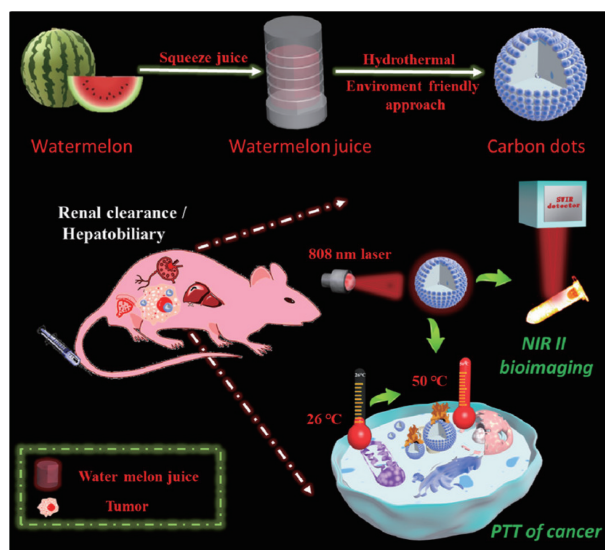


图 7 NIR-II CQDs 的生物质合成及其荧光成像与光热治疗应用示意图<sup>[64]</sup>

Fig. 7 Schematic diagram of biomass synthesis of NIR-II CQDs and their application in fluorescence imaging and photothermal therapy<sup>[64]</sup>

光学特性相得益彰, 尤其是为需要反复成像、检测的应用场景提供了便捷无创的手段。NIR QDs 经过无毒亲水的聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG) 简单修饰后即可用于循环系统内的显影成像, 修饰后 QDs 在体内的滞留时间是设计中的关键考量因素。Awasthi 等<sup>[4]</sup>研究发现调节 PEG 链长能相应延长或缩短 QDs 在血液中的滞留时间,

Ag<sub>2</sub>S-PEG 探针实现了可持续 24 h 显影的 NIR-II 血管系统成像。Saeboe 等<sup>[12]</sup>演示了 NIR InP-PEG 在淋巴循环系统中的多路复用体内成像, QDs 信号精准反映了淋巴管内的淋巴引流(图 8a)。基于 QDs 荧光寿命的时间门控成像能显著提高细胞层级的成像灵敏度, 利用荧光寿命差异监测血管内血细胞与肿瘤细胞流速, 能区分毫米每秒

级的差异<sup>[15]</sup>(图 8b)。尽管借助高渗透长滞留效应也可实现非特异性探针在肿瘤部位成像, 但癌组织内的异质分布和关键器官内不可控积累使得这种策略不适用于特定疾病成像应用<sup>[13]</sup>。而在血管内转移性癌症检测和免疫反应研究方面, 无重金属 NIR QDs 的高质量成像效果显示出作为循环系统精细显像剂的潜力<sup>[65]</sup>。

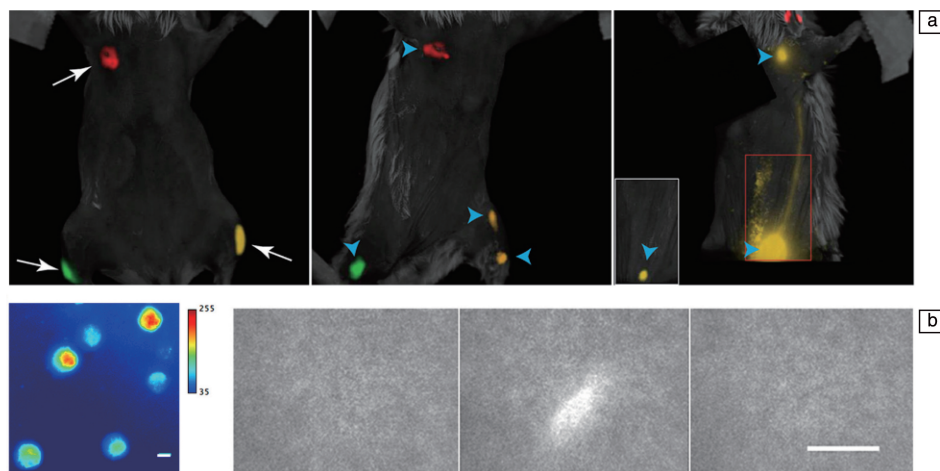


图 8 基于 InP NIR QDs 的淋巴引流成像, 红色、绿色和黄色分别表示 675, 720 和 790 nm 的荧光信号(a)<sup>[12]</sup>; ZnCuInSe QDs 标记肿瘤细胞的表现荧光显微镜照片(左)和 3 张连续体内时间门控荧光照片(右)(b)<sup>[15]</sup>

Fig. 8 Lymphatic drainage imaging based on InP NIR QDs, with red, green and yellow indicating the fluorescence signals at 675, 720 and 790 nm, respectively (a)<sup>[12]</sup>; classical epi-fluorescence microscopy image (left) and three consecutive *in-vivo* time-gated fluorescence images (right) of tumor cells labeled with ZnCuInSe QDs (b)<sup>[15]</sup>

### 3.2 主动靶向荧光成像

主动靶向是针对肿瘤部位特异性成像的常用探针设计策略, 探针由实现荧光的 QDs 和实现靶向功能的表面配体构成。NIR QDs 靶向修饰常用分子包括: ① 单克隆抗体, 如对抗表皮生长因子受体的西妥昔单抗, 相比于按 250 mg/m<sup>2</sup> 的重复给药剂量, 靶向功能只需约 50 mg 的总西妥昔单抗修饰剂量<sup>[66]</sup>。抗体作为临床分子靶向药物, 可与 NIR QDs 构建靶向治疗与成像的诊疗一体化探针<sup>[67]</sup>。② 寡肽, 如精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)三肽片段, 用于靶向癌细胞上普遍过表达的整联蛋白  $\alpha_v\beta_3$ <sup>[68]</sup>。Deng 等<sup>[69]</sup>报道, RGD 修饰的 ZnAgInSe/ZnS QDs 探针具有主动靶向功能, 并表现出网状内皮系统捕获降低的特性(图 9a)。由 RGD 介导的细胞内吞促进了靶向部位摄取率和滞留时间的提升, 有利于进一步设计载药型诊疗一体化探针<sup>[70, 71]</sup>。③ 小分子, 如叶酸(folate, FA), 用于靶向卵巢癌、肺癌和肾癌等肿瘤中过表达的叶酸受体- $\alpha$ 。Li 等<sup>[72]</sup>所设计的具有 NIR-II 发光和磁性的 CuInSe<sub>2</sub>@ZnS:Mn QDs 探针即采用 FA 修饰, 可对体内肿瘤进行 NIR-II/磁共振(magnetic resonance, MR)双模态灵敏成像(图 9b 和 9c), 靶向效果支持对肺部微小转移性肿瘤进行 MR 检测。葡萄糖(glucose, Glc)作为肿瘤葡萄

糖转运蛋白过表达的靶向小分子也能引导肿瘤细胞渗透, Ge 等<sup>[2]</sup>报道的 Glc-Ag<sub>2</sub>Se 可实现长达一周的肿瘤靶向部位长效荧光监测。

纳米材料探针在生物体内一般会被单核吞噬系统(mononuclear phagocyte system, MPS)识别和捕获, 随后被肝脏和脾脏快速摄取。结合适当 MPS 逃逸伪装策略将有效实现靶向探针长效滞留。Li 等<sup>[38]</sup>依据大氨基酸结构模拟思路, 设计了由多个成对  $\alpha$ -羧基和氨基功能化的 CQDs 探针, 该探针兼具肿瘤部位靶向和细胞渗透长效滞留能力。Zhang 等<sup>[73]</sup>采用细胞膜伪装策略构建具有免疫逃逸和同型靶向功能的 NIR-II 探针。通过构建细胞膜衍生囊泡(cell membrane-derived vesicles, CV)覆盖的 Ag<sub>2</sub>Te QDs, 实现了基于蛋白质自我靶向功能的特异性成像, 该 QDs 体内滞留时间有效增强近 5 倍。以 CV 为代表的囊泡 MPS 逃逸伪装策略兼具同型靶向和屏障穿透功能, 可满足全身组织与细胞内荧光探针的设计需求<sup>[74]</sup>。

### 3.3 环境响应荧光成像

环境响应探针在常态下保持荧光静默, 被病理环境特征触发或活化后恢复荧光特性<sup>[75]</sup>。环境响应荧光成像具有低信噪比和按需激活的优势, 呈现出以病理环境(如氧化还原、pH 值和酶等)刺激为导向的广义靶向能力,

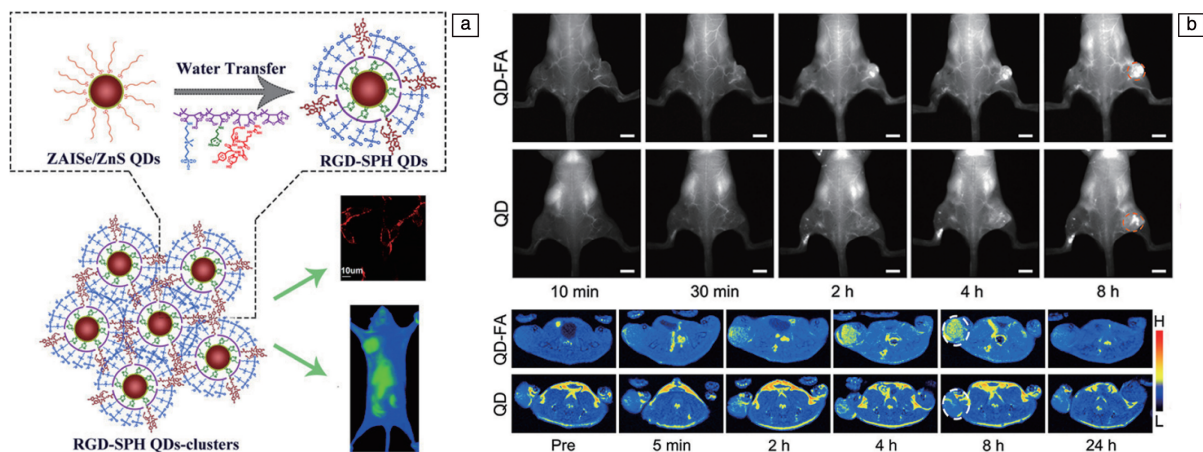


图 9 RGD 修饰的 ZnAgInSe/ZnS QDs 探针设计和肿瘤靶向成像(a)<sup>[69]</sup>; 双模态 QDs 对皮下肿瘤 NIR-II 荧光成像(b)和 T<sub>1</sub> 加权磁共振照片(c)<sup>[72]</sup>

Fig. 9 RGD-ZnAgInSe/ZnS QDs probe design and tumor-targeted imaging(a)<sup>[69]</sup>; NIR-II fluorescence images (b) and T<sub>1</sub>-weighted magnetic resonance images (c) of subcutaneous tumors by bimodal QDs<sup>[72]</sup>

可用于肿瘤、器官损伤等多类型疾病诊断<sup>[76]</sup>。① 氧化还原响应: NIR 吸收剂 A1094 常用作 NIR QDs 荧光静默修饰, 通过与 QDs 之间发生 Förster 共振能量转移实现荧光信号淬灭, 当受到氧化破坏或因酸性环境从探针中分离时解除荧光淬灭<sup>[77]</sup>。Li 等<sup>[3]</sup> 基于创伤性脑损伤部位的过氧硝酸盐 (ONOO<sup>-</sup>) 微环境设计了 VCAM1&A1094@Ag<sub>2</sub>S, ONOO<sup>-</sup> 氧化 A1094 后“打开”探针荧光信号, 实现对损伤部位的特异性成像, 靶向结合肽 VCAM1 可进一步增强该探针荧光滞留效果。② pH 响应: 肿瘤部位的酸性环境可触发 pH 响应机制。Liu 等<sup>[78]</sup> 设计的 pH 响应亲疏水转化聚合物囊泡包裹 Ag<sub>2</sub>S 探针在肿瘤酸性 pH 环境释放 QDs-PEG, 发射 NIR 信号。③ 酶促响应: 肿瘤表面过表达酶的底物肽是特异性酶促反应激活探针的设计基础。将基质金属蛋白酶活化肽作为 QDs 与 A1094 的偶联片段, 即可使探针在目标肿瘤表面被特异性酶促反应分

解, 解除 A1094 对 QDs 的荧光淬灭, 实现酶响应荧光成像<sup>[79]</sup>。组织蛋白酶和成纤维细胞激活蛋白等肿瘤标志物和人中性粒细胞弹性蛋白酶等炎症预测因子也可作为识别肽偶联设计的靶标<sup>[80, 81]</sup>。响应型探针的非特异性吸附或脱靶结合会带来信号干扰, 成像使用剂量和注射方式的控制有助于改善成像精准程度。

Ag<sub>2</sub>S QDs 独特的原位制备特性和结构特质启发了基于其自身结构实现自转化机制的探针的设计策略, 简化了复杂响应系统的构建过程。Zhang 等<sup>[82]</sup> 报道的 Ag/Ag<sub>2</sub>S 纳米颗粒可响应肝损伤和肿瘤部位的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 环境, 在 Ag 被氧化后 Ag<sub>2</sub>S 终止了等离子体电子转移过程, 恢复了 NIR 荧光(图 10a)。H<sub>2</sub>S 既是肝硬化、结肠癌、糖尿病等的参考指标物, 也是 Ag<sub>2</sub>S 原位合成的主要原料, 因此可设计利用 Ag<sub>2</sub>S QDs 的生成过程作为触发机制, 实现 H<sub>2</sub>S 环境响应型 NIR 荧光信号输出<sup>[29, 83]</sup>。Wang 等<sup>[84]</sup>

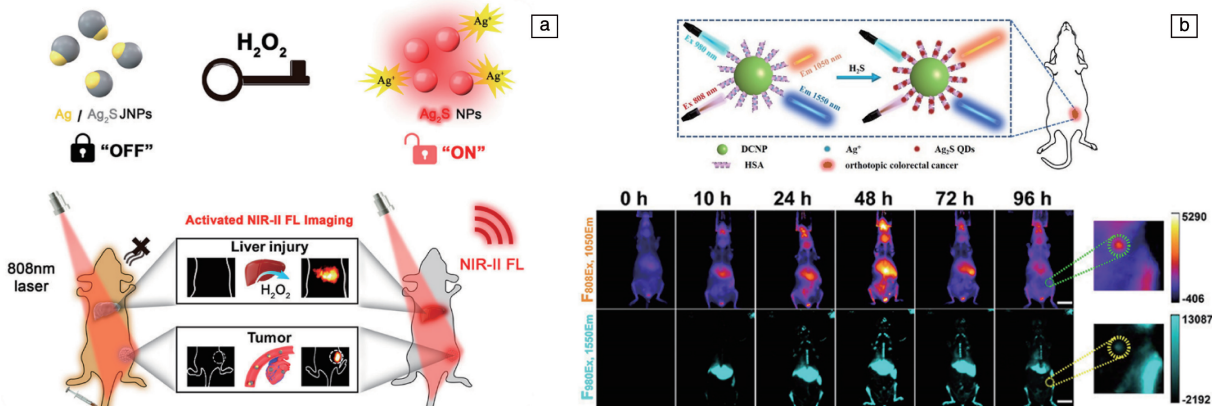


图 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 响应的 Ag/Ag<sub>2</sub>S 荧光探针及其成像部位(a)<sup>[82]</sup>; H<sub>2</sub>S 响应的 Ag<sub>2</sub>S 原位 QDs 探针和结肠癌原位 NIR 荧光成像(b)<sup>[84]</sup>

Fig. 10 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-responsive Ag/Ag<sub>2</sub>S fluorescence probe and its imaging site (a)<sup>[82]</sup>; H<sub>2</sub>S-responsive Ag<sub>2</sub>S *in-situ* QDs probe and *in-situ* NIR fluorescence imaging of orthotopic colon cancer (b)<sup>[84]</sup>

精细设计的 Ag 纳米探针在 H<sub>2</sub>S 环境下自发转化为 Ag<sub>2</sub>S QDs 探针, 通过 NIR 荧光强度对比可以实现低检测限 (0.22 mmol/L) 的 H<sub>2</sub>S 定量测定和特异性成像 (图 10b)。自发转化涉及 QDs 合成调控, 需要慎重考虑生物合成过程中的毒理研究, 基于生物质温和合成的 CQDs 有望拓宽这一成像策略的前景<sup>[85-87]</sup>。

## 4 结 语

本文从合成方法、材料特性和荧光成像设计等方面介绍了无重金属近红外量子点 (near-infrared quantum dots, NIR QDs) 的最新进展。这些材料都具备 NIR 发射特性, 普遍表现出低生物毒性和良好的生物相容性, 结合适当的表面修饰即可构建具有靶向、免疫逃逸、环境响应和联合治疗等多功能的 NIR 荧光探针, 实现高质量特异性荧光成像的快速、重复获取。

临床转化时, 无重金属 NIR QDs 探针依然面临着一些挑战: ① 生物毒性: 虽然摒弃了 Cd 和 Pb 等重金属元素, 但是仍需采用合适的包壳技术以防止核心离子浸出<sup>[88]</sup>。在基础细胞毒性之上, 还需进行表面配体、核心分解和组织积累毒性的全面考虑。② 合成方法优化: QDs 核心的合成技术决定了材料的 NIR 发光基础, 表面修饰会导致材料量子产率下降和发射波长蓝移。目前水热法已经显示出了从合成到表面修饰的整合能力, 进一步通过优化核壳设计提高量子产率, 结合微波法改进热能分布等优化手段有望实现 QDs 一体化合成。③ 探针设计: 对于仅用于诊断成像的 QDs, 开发可针对不同肿瘤或病变部位的通用材料设计规范是显像剂商业化的前提。而对于兼具诊疗功能的多模态多功能系统, 需要同时考虑光热治疗和/或光动力疗法带来的新的生物相容性问题。原位生成或自转化探针表现出了小尺寸和简易合成的优势, 其设计路线的拓展亟需原位合成技术的持续进步与创新。

随着合成方法的改进, NIR QDs 的尺寸分散性将得到改善, 发射峰实现红移, 同时量子产率得到提升。核壳设计和表面修饰方法的改进将提高 QDs 核心的化学稳定性, 解决潜在的毒性问题, 并适当延长纳米颗粒在生物体中的滞留时间。以囊泡单核吞噬系统逃逸方法取代聚合物囊泡, 并和环境刺激响应策略结合, 将促进 NIR QDs 探针的特异性结合与长效滞留, 拓展 NIR QDs 探针的成像应用场景。在解决了这些核心问题之后, 优化的无重金属 NIR QDs 有望取代 Cd, Pb 和 Hg 等重金属基 QDs 材料, 为疾病诊疗提供生物安全性优异的纳米诊疗探针, 推动精准医疗的革新进展。

## 参考文献 References

[1] SU H, WANG Z, LIU G. *Cancer Theranostics*[M]. Pittsburgh: Aca-

demic Press, 2014: 55-67.

- [2] GE X L, HUANG B, ZHANG Z L, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2019, 7(38): 5782-5788.
- [3] LI C, LI W, LIU H, *et al.* *Angewandte Chemie International Edition* [J], 2020, 59(1): 247-252.
- [4] AWASTHI P, AN X, XIANG J, *et al.* *Nanoscale*[J], 2020, 12(9): 5678-5684.
- [5] MIEOG J S D, ACHTERBERG F B, ZLITNI A, *et al.* *Nature Reviews Clinical Oncology*[J], 2022, 19(1): 9-22.
- [6] JACQUES S L. *Physics in Medicine & Biology*[J], 2013, 58(11): 37.
- [7] LIU T M, CONDE J, LIPÍŃSKI T, *et al.* *NPG Asia Materials*[J], 2016, 8(8): 295.
- [8] SMITH A M, MANCINI M C, NIE S. *Nature Nanotechnology*[J], 2009, 4(11): 710-711.
- [9] KOBAYASHI H, OGAWA M, ALFORD R, *et al.* *Chemical Reviews* [J], 2010, 110(5): 2620-2640.
- [10] KENRY, DUAN Y, LIU B. *Advanced Materials* [J], 2018, 30(47): 1802394.
- [11] FENG Z, TANG T, WU T, *et al.* *Light: Science & Applications*[J], 2021, 10(1): 197.
- [12] SAEBOE A M, NIKIFOROV A Y, TOUFANIAN R, *et al.* *Nano Letters*[J], 2021, 21(7): 3271-3279.
- [13] ZHAO Y, SONG M, YANG X, *et al.* *Chemical Engineering Journal* [J], 2020, 399: 125777.
- [14] YU G T, LUO M Y, LI H, *et al.* *ACS Nano*[J], 2019, 13(11): 12830-12839.
- [15] PONS T, BOUCCARA S, LORLETTE V, *et al.* *ACS Nano*[J], 2019, 13(3): 3125-3131.
- [16] JIA G, PANG Y, NING J, *et al.* *Advanced Materials*[J], 2019, 31(25): 1900781.
- [17] LIU L, BAI B, YANG X, *et al.* *Chemical Reviews*[J], 2023, 123(7): 3625-3692.
- [18] LI S, JANG J H, CHUNG W, *et al.* *ACS Nano*[J], 2023, 17(20): 20013-20023.
- [19] YANG H, LI R, ZHANG Y, *et al.* *Journal of the American Chemical Society*[J], 2021, 143(6): 2601-2607.
- [20] ALLOCCA M, MATTERA L, BAUDUIN A, *et al.* *Environmental Science & Technology*[J], 2019, 53(7): 3938-3947.
- [21] ÓRDENES A N, ANZIANI O G, MONRÁS J P, *et al.* *Microorganisms* [J], 2020, 8(5): 631.
- [22] ZHANG Y, YANG H, AN X, *et al.* *Small* [J], 2020, 16(14): 2001003.
- [23] SUN Y P, ZHOU B, LIN Y, *et al.* *Journal of the American Chemical Society*[J], 2006, 128(24): 7756-7757.
- [24] XIE R, BATTAGLIA D, PENG X. *Journal of the American Chemical Society*[J], 2007, 129(50): 15432-15433.
- [25] YADAV R, KWON Y, RIVAUX C, *et al.* *Journal of the American Chemical Society*[J], 2023, 145(10): 5970-5981.

- [26] XIE R, PENG X. *Journal of the American Chemical Society* [J], 2009, 131(30): 10645–10651.
- [27] DU Y, XU B, FU T, *et al.* *Journal of the American Chemical Society* [J], 2010, 132(5): 1470–1471.
- [28] ORTEGA R A, SHEN Y, ZABALA G I, *et al.* *ACS Applied Materials & Interfaces* [J], 2020, 12(11): 12500–12509.
- [29] DENG Z, JIANG M, LI Y, *et al.* *iScience* [J], 2019, 17: 217–224.
- [30] LIU Z Y, LIU A A, FU H, *et al.* *Journal of the American Chemical Society* [J], 2021, 143(32): 12867–12877.
- [31] XIA C, MEELDIJK J D, GERRITSEN H C, *et al.* *Chemistry of Materials* [J], 2017, 29(11): 4940–4951.
- [32] KUBICEK S J Z, MAKAROV N S, STROMBERG Z R, *et al.* *ACS Applied Bio Materials* [J], 2020, 3(12): 8567–8574.
- [33] LANGEVIN M A, RITCEY A M, ALLEN C N. *ACS Nano* [J], 2014, 8(4): 3476–3482.
- [34] DELICES A, MOODELLY D, HUROT C, *et al.* *ACS Applied Materials & Interfaces* [J], 2020, 12(39): 44026–44038.
- [35] LI D, LIANG C, USHAKOVA E V, *et al.* *Small* [J], 2019, 15(50): 1905050.
- [36] LIU J, GENG Y, LI D, *et al.* *Advanced Materials* [J], 2020, 32(17): 1906641.
- [37] LI D, JING P, SUN L, *et al.* *Advanced Materials* [J], 2018, 30(13): 1705913.
- [38] LI S, SU W, WU H, *et al.* *Nature Biomedical Engineering* [J], 2020, 4(7): 704–716.
- [39] CHEN B, LI D, WANG F. *Small* [J], 2020, 16(32): 2002454.
- [40] SUN S, LIU H, GAO Y, *et al.* *Journal of Materials Chemistry* [J], 2012, 22(36): 19207–19212.
- [41] CHIBLI H, CARLINI L, PARK S, *et al.* *Nanoscale* [J], 2011, 3(6): 2552–2559.
- [42] LI L, CHEN Y, XU G, *et al.* *International Journal of Nanomedicine* [J], 2020, 15: 1951–1965.
- [43] LI Y, PU C, PENG X. *Nano Research* [J], 2017, 10: 941–958.
- [44] GARY D C, TERBAN M W, BILLINGE S J L, *et al.* *Chemistry of Materials* [J], 2015, 27(4): 1432–1441.
- [45] SONG W S, LEE H S, LEE J C, *et al.* *Journal of Nanoparticle Research* [J], 2013, 15: 1–10.
- [46] CLICK S M, ROSENTHAL S J. *Chemistry of Materials* [J], 2023, 35(3): 822–836.
- [47] LAUFERSKY G, BRADLEY S, FRÉCAUT E, *et al.* *Nanoscale* [J], 2018, 10(18): 8752–8762.
- [48] BUFFARD A, DREYFUSS S, NADAL B, *et al.* *Chemistry of Materials* [J], 2016, 28(16): 5925–5934.
- [49] CHOI Y, HAHM D, BAE W K, *et al.* *Nature Communications* [J], 2023, 14(1): 43.
- [50] HU H L, HAO H, REN X, *et al.* *Inorganic Chemistry* [J], 2023, 62(6): 2877–2886.
- [51] CALVIN J J, SWABECK J K, SEDLAK A B, *et al.* *Journal of the American Chemical Society* [J], 2020, 142(44): 18897–18906.
- [52] TESSIER M D, DUPONT D, de NOLF K, *et al.* *Chemistry of Materials* [J], 2015, 27(13): 4893–4898.
- [53] AYDEMIR D, HASHEMKHANI M, ACAR H Y, *et al.* *Molecular Biology Reports* [J], 2020, 47: 4117–4129.
- [54] ZHANG Y, HONG G, ZHANG Y, *et al.* *ACS Nano* [J], 2012, 6(5): 3695–3702.
- [55] HONG G, ROBINSON J T, ZHANG Y, *et al.* *Angewandte Chemie International Edition* [J], 2012, 51(39): 9818–9821.
- [56] ZHANG Y, LIU Y, LI C, *et al.* *The Journal of Physical Chemistry C* [J], 2014, 118(9): 4918–4923.
- [57] KERSHAW S V, SUSHA A S, ROGACH A L. *Chemical Society Reviews* [J], 2013, 42(7): 3033–3087.
- [58] ALADESUYI O A, LEBEPE T C, MALULEKE R, *et al.* *Nanotechnology Reviews* [J], 2022, 11(1): 2304–2319.
- [59] LIM L J, ZHAO X, TAN Z K. *Advanced Materials* [J], 2023, 35(28): 2301887.
- [60] KAYS J C, SAEBOE A M, TOUFANIAN R, *et al.* *Nano Letters* [J], 2020, 20(3): 1980–1991.
- [61] TANG X, HO W B A, XUE J M. *The Journal of Physical Chemistry C* [J], 2012, 116(17): 9769–9773.
- [62] SOARES J X, WEGNER K D, RIBEIRO D S M, *et al.* *Nano Research* [J], 2020, 13: 2438–2450.
- [63] PANG W, JIANG P, DING S, *et al.* *Advanced Healthcare Materials* [J], 2020, 9(16): 2000607.
- [64] LI Y, BAI G, ZENG S, *et al.* *ACS Applied Materials & Interfaces* [J], 2019, 11(5): 4737–4744.
- [65] WANG J, ZHU Y, HE N, *et al.* *Sensors and Actuators B: Chemical* [J], 2020, 305: 127427.
- [66] TUMMERS W S, MILLER S E, TERAPHONGPHOM N T, *et al.* *Annals of Surgical Oncology* [J], 2018, 25: 1880–1888.
- [67] ZHU C N, CHEN G, TIAN Z Q, *et al.* *Small* [J], 2017, 13(3): 1602309.
- [68] KITAGAWA T, KOSUGE H, UCHIDA M, *et al.* *Molecular Imaging and Biology* [J], 2012, 14: 315–324.
- [69] DENG T, PENG Y, ZHANG R, *et al.* *ACS Applied Materials & Interfaces* [J], 2017, 9(13): 11405–11414.
- [70] WEN Q, ZHANG Y, LI C, *et al.* *Angewandte Chemie International Edition* [J], 2019, 58(32): 11117–11122.
- [71] TANG R, XUE J, XU B, *et al.* *ACS Nano* [J], 2015, 9(1): 220–230.
- [72] LI Y, ZHANG P, TANG W, *et al.* *ACS Nano* [J], 2022, 16(5): 8076–8094.
- [73] ZHANG J J, LIN Y, ZHOU H, *et al.* *Advanced Healthcare Materials* [J], 2019, 8(14): 1900341.
- [74] CHENG G, LI W, HA L, *et al.* *Journal of the American Chemical Society* [J], 2018, 140(23): 7282–7291.
- [75] KARTON L N, SEGAL E, OMER L, *et al.* *Journal of the American Chemical Society* [J], 2011, 133(28): 10960–10965.
- [76] CHANG B, CHEN J, BAO J, *et al.* *Advanced Drug Delivery Reviews*

- [J], 2023, 192: 114637.
- [77] LING S, YANG X, LI C, *et al.* *Angewandte Chemie International Edition*[J], 2020, 59(18): 7219–7223.
- [78] LIU T, ZHANG X, LIU D, *et al.* *Advanced Optical Materials*[J], 2021, 9(12): 2100233.
- [79] ZHAN Y, LING S, HUANG H, *et al.* *Angewandte Chemie International Edition*[J], 2021, 60(5): 2637–2642.
- [80] LIU S, YAN A, GUO W, *et al.* *ACS Nano*[J], 2020, 14(4): 4244–4254.
- [81] 邢洁, 姚俊列, 马雪华, 等. *中国材料进展*[J], 2022, 41(9): 689–696.  
XING J, YAO J L, MA X H, *et al.* *Materials China*[J], 2022, 41(9): 689–696.
- [82] ZHANG X, WANG W, SU L, *et al.* *Nano Letters*[J], 2021, 21(6): 2625–2633.
- [83] CHU Y, XI J, SUN Y, *et al.* *International Journal of Biological Macromolecules*[J], 2023, 257: 128601.
- [84] WANG C, NIU M, WANG W, *et al.* *Analytical Chemistry*[J], 2021, 93(27): 9356–9363.
- [85] GAO H, SAPELKIN A V, TITIRICI M M, *et al.* *ACS Nano*[J], 2016, 10(10): 9608–9615.
- [86] 孙文瑾, 李瑞珍, 刘伟峰, 等. *中国材料进展*[J], 2023, 42(3): 228–237.  
SUN W J, LI R Z, LIU W F, *et al.* *Materials China*[J], 2023, 42(3): 228–237.
- [87] LI L, ZHANG R, LU C, *et al.* *Journal of Materials Chemistry B*[J], 2017, 5(35): 7328–7334.
- [88] BRUNETTI V, CHIBLI H, FIAMMENGIO R, *et al.* *Nanoscale*[J], 2013, 5(1): 307–317.