

荧光分子探针在急性肾损伤中的研究进展 ※

王湘宁 刘淑艳 *

(河北北方学院医学检验学院, 河北张家口 075000)

摘要: 急性肾损伤 (AKI) 作为临床常见的危重症, 其不仅发病率高, 还与不良临床预后和死亡率显著相关。目前临床诊断主要依赖血清肌酐和尿素氮等传统生物标志物, 然而这些指标在肾损伤早期敏感性不足, 其升高往往滞后于实际的组织损伤, 导致临床诊断延迟, 使患者错过最佳干预时机。近年来, 荧光分子探针凭借其高灵敏度、优异的时空分辨能力及实时、无创成像特性, 为AKI的早期诊断与病理机制研究提供了新的技术途径。文章系统综述了该领域的最新进展, 重点探讨了针对AKI关键病理过程 (如氧化应激、酶活性异常及细胞死亡等) 所设计的探针策略, 并分析了近红外成像、光声成像及多模态成像技术与探针系统的融合应用。在此基础上, 进一步剖析了当前研究面临的关键科学问题, 展望了其临床转化前景, 以期为新一代AKI诊断工具的开发提供理论支撑与方法学借鉴。

关键词: 荧光分子探针; 急性肾损伤; 早期诊断

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是一种复杂的临床综合征, 引起肾功能下降的各种病因及病理生理功能均是其潜在诱因。在临床特点上, 其表现为肾功能的急性、快速衰退, 这一过程通常在数小时或数天内完成。AKI的诊断主要依赖于血清肌酐和尿素氮水平的升高及尿量的减少但指标的敏感性和特异性不足, 通常在肾脏已发生显著结构性损伤后才出现变化, 限制了早期干预的效果。因此, 开发能够在分子和细胞水平上实时、动态监测AKI早期病理过程的新技术, 成为改善患者预后的关键。

荧光分子探针作为一种强大的分子成像工具, 为攻克这一难题提供了新的机遇。这些探针经过精心设计, 能够特异性地识别并响应AKI病理微环境中的关键生物标志物, 通过荧光信号的“开启” (turn-on)、“关闭” (turn-off) 或比率变化, 实现可视化监测疾病进程。其核心优势为: 非侵入性与实时性, 能够通过活体成像技术, 无创地、动态地观察肾脏内部的分子事件; 高灵敏度与特异性, 可以检测到微量的生物标志物变化, 实现AKI的早期预警; 分子水平信息, 能够揭示特定分子 (如活性氧、酶) 在AKI发生发展中的作用, 深化对病理机制的理解。

1 AKI相关生物标志物与荧光分子探针的设计策略

AKI的发病机制复杂, 涉及氧化应激、炎症反应、细胞凋亡、线粒体功能障碍等多个环节。研究人员围绕这些关键病理事件, 开发了多种响应性的荧光分子探针。

1.1 氧化应激标志物探针

氧化应激是AKI最核心的始动环节之一, 活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 的过度产生是其典型特征。针对不同ROS分子的特异性探针是当前的研究热点。

1.1.1 超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 探针

$O_2^{\cdot-}$ 是线粒体氧化应激的核心起点与关键信使, 不仅是后续过氧化氢、羟基自由基乃至次氯酸等更具破坏性ROS生成的源头, 其本身也能直接引发线粒体膜电位崩溃、促炎因子释放和细胞凋亡信号通路激活。研究人员开发了线粒体靶向的荧光分子探针Naph- $O_2^{\cdot-}$ 和NIR- $O_2^{\cdot-}$, 其荧光团羟基的保护削弱了它们的 π 偶联, 当特异性识别 $O_2^{\cdot-}$ 后, 探针被激活, 未笼化的荧光团将恢复其荧光。此特性被成功用于顺铂诱导的AKI模型, 直观显示了肾脏的氧化损伤情况^[1]。其中, Naph- $O_2^{\cdot-}$ 利用双光子激发特性, 有效克服了生物组织散射, 实现了对活体肾脏深层区域的高分辨率成像; 而NIR- $O_2^{\cdot-}$ 凭借其近红外发射窗口, 则具备了更深的组织穿透能力和更低的自发荧光背景, 为预测药物的肾毒性以及筛选抗AKI药物的疗效提供了有力工具。

1.1.2 次氯酸 (HClO) 探针

HClO是髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 催化产生的一种强氧化剂, 而MPO本身是中性粒细胞活化的关键标志物。在生理情况下, MPO催化产生HClO等反应性物质和多种自由基, 抵抗病原菌的入侵, 而当机体处于炎症时, 就会导致氧化应激和氧化性的组织损伤。在抗中性粒细胞胞浆抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibody, ANCA) 相关性血管炎 (antibody-associated

※ 项目名称: 河北北方学院省属高校基本科研业务费研究项目 (JYT2021009)。

* 通讯作者: 刘淑艳

vasculitis, AAV) 所致的AKI中, 致病性MPO-ANCA通过激活中性粒细胞, 促使MPO释放并催化产生大量HClO。为深入研究MPO/HClO轴在AKI中的作用, 双模态近红外探针FDOCl-22被设计用于高选择性检测HClO。在顺铂诱导的AKI小鼠模型中, FDOCl-22通过与HClO发生特异性去甲基化反应而被激活, 其近红外荧光和光声信号显著增强, 揭示了MPO/HClO在肾损伤中的关键致病机制^[2], 为AKI的早期诊断提供了新型分子工具。

1.1.3 过氧亚硝酸盐 (ONOO⁻) 探针

ONOO⁻是由一氧化氮(NO)与O₂⁻快速反应生成的强效氧化剂。在炎症状态下, 诱导型一氧化氮合酶显著上调, 驱动肾内ONOO⁻大量生成。后者通过硝化应激、脂质过氧化及谷胱甘肽耗竭等多种机制, 协同诱发铁死亡, 从而在AKI的进展中发挥关键作用。为研究ONOO⁻在AKI中的作用, 研究人员开发了多种荧光分子探针。近红外荧光/光声双模态探针SiRho-HD能灵敏地响应ONOO⁻: 在加入ONOO⁻后, 719 nm处的峰值吸光度显著降低, 并已成功用于成像顺铂诱导的AKI小鼠模型中肾脏ONOO⁻水平的波动, 为研究氮氧化应激提供了新视角^[3]。此外, 新型双响应荧光分子探针TDPF基于分子内电荷转移(intramolecular charge transfer, ICT)机制被构建, 具备线粒体靶向能力, 可同步检测细胞黏度与ONOO⁻水平的变化。利用该探针, 研究首次揭示了AKI中铁死亡的动态过程, 为阐明AKI机制提供了重要工具^[4]。

1.2 酶活性与细胞损伤标志物探针

肾小管上皮细胞损伤和功能障碍是AKI的主要病理特征, 相关的酶活性变化和细胞凋亡便成为重要的监测靶点。

1.2.1 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(N-acetyl-β-D-glucosaminidase, NAG) 探针

NAG是一种130~140 kDa的溶酶体酶, 主要分布在近端小管上皮细胞的溶酶体中。当肾小管细胞受损或溶酶体破裂时, NAG会被释放到尿液或血液中, 并且ROS的上调会特异性触发溶酶体损伤的途径, 进而诱导近端肾小管细胞释放NAG。为了同时监测氧化应激和细胞损伤, 研究人员开发了一种名为ADR的双响应探针。该探针巧妙地结合了近红外荧光和化学发光两个信号通道, 能够分别特异性响应NAG的活性升高及O₂⁻的积累。在活体小鼠肾脏中, ADR可依次检测到O₂⁻与NAG的早期上调, 且该变化发生于肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)显著下降及组织损伤出现之前^[5]。该成像策略克服了传统体外生物标志物检测存在的灵敏度不足与时间滞后问题, 相较于临床常规方法可更早提示肾损伤发生。

1.2.2 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP) 探针

ALP在肾脏近端小管刷状缘高度表达, 肾损伤后会释放到尿液和血液中。在脓毒症相关的AKI中, 其水平显著升高, 通过检测ALP能更早地反映肾小管细胞的结构

性损伤, 其水平变化与肾损伤程度密切相关。为灵敏检测ALP, 研究者开发了荧光/光声双模态分子探针CS-ALP, 该探针基于ICT机制设计, 具有ROS稳定性高、检测限低及响应迅速等优势。其连接在染料羟基上的单磷酸盐作为ALP酶切位点, 在ALP作用下, 探针的单磷酸酯基团逐渐水解, 引起其在685 nm处的吸收峰持续增强, 适用于光声成像; 同时, 716 nm处的荧光发射峰也随之升高, 实现“开启型”近红外荧光成像。在顺铂诱导的AKI模型中, 小鼠尿液、血液中ALP水平被成功检测, 且健康对照与AKI组的荧光/光声信号差异显著, 为评价AKI的严重程度和干预措施的效果提供了直接证据^[6]。

1.2.3 Caspase-3 探针

Caspase-3是细胞凋亡级联反应的执行酶, 能够切割多种底物导致细胞核碎片化和膜破裂。在缺血-再灌注、药物(顺铂、庆大霉素)或炎症诱导的AKI模型中, 免疫组化或Western blot均显示Caspase-3蛋白或其活化片段(cleaved Caspase-3)水平显著上调, 是评价肾细胞损伤的敏感指标。基于Caspase-3在细胞凋亡中的核心作用, 近红外荧光探针1-DPA₂被开发用于动态监测肾损伤。该探针通过其携带的G-DEVD-G肽段被Caspase-3特异性切割, 从而实现荧光激活。在顺铂诱导的AKI模型中, 研究人员观察到AKI小鼠肾脏中Caspase-3的活性随时间的增加逐渐增强, 并且能够监测到AKI小鼠在接受N-乙酰-L-半胱氨酸治疗后的肾功能恢复情况^[7], 是理解细胞凋亡和评估肾小管功能的有效工具。

1.3 肾功能与清除率评估探针

除了对病理标志物进行监测外, 直接评估肾脏的滤过与排泄功能在AKI的诊断中具有关键意义。近年来, 一系列可经肾脏特异性清除的荧光分子探针相继被开发, 通过实时示踪其在体内的清除动态, 为AKI的早期诊断与肾功能动态评估开辟了非侵入性的新方法。

2 荧光分子探针与多模态成像技术的融合应用

为突破单一成像模态的技术局限, 研究者正致力于将荧光分子探针与多模态成像技术进行整合, 构建优势互补的多模态成像策略, 以充分发挥其在生物医学研究中的潜力。

2.1 近红外荧光成像(NIR-I/NIR-II imaging)

光学成像技术在生物医学领域的深入发展, 推动了近红外二区(NIR-II, 1000~1700 nm)荧光成像的广泛应用。相较于传统可见光及近红外一区(NIR-I, 700~900 nm)成像, NIR-II荧光成像能有效降低生物组织的光吸收与散射, 并显著抑制自发荧光干扰, 从而在活体深部组织中实现更高的空间分辨率和信噪比。近年来, 基于NIR-II荧光分子探针优异的生物相容性、快速代谢特性和良好的组织穿透能力, 展现出更大的应用潜力。

2.2 光声成像 (photoacoustic imaging, PA)

PA作为融合光学激发与超声探测的新型生物医学成像技术,兼具光学成像的高对比度与超声成像的深组织穿透能力,能够提供比单纯荧光成像更精确的解剖学定位信息和更高的信噪比。近年来,将荧光分子探针与PA相结合构建双模态探针,已成为提升AKI诊断准确性的重要研究方向。例如,CSALP以NIRF+PA双模态,实现浅层与深层同步可视化,代表了目前最成熟的近红外荧光/光声双模态探针。此外,SiRho-HD等探针也表现出优异的光声响应特性,能够在深层组织中实现更高信噪比的成像效果。这类双模态探针不仅保留了荧光成像的高灵敏度特性,更借助PA提升了空间分辨率与解剖定位能力,有效克服了传统光学成像在肾脏区域应用时穿透深度不足的限制。

2.3 化学发光成像 (chemiluminescence imaging)

化学发光成像通过内部化学反应产生信号,无需外部激发光源,从根本上消除了组织自发荧光干扰,在深层组织中仍能保持极高信噪比;而近红外荧光成像则凭借其优异的组织穿透能力和高时空分辨率,支持实时动态监测。ADR探针创新性地整合了这两种成像模式,其化学发光通道检测 $O_2^{\cdot-}$,即 $O_2^{\cdot-}$ 攻击ADR的磺酸酯基团,形成一种不稳定的酚酸二氧烷中间体,该中间体是一种活性化学发光底物,会自发分解并发出光子。同时,近红外荧光通道特异性响应溶酶体损伤标志物NAG:当ADR裂解NAG的糖苷键时,形成了具有强电子供体的酚酸基团,其CyOH部分使荧光增强。在造影剂诱导的AKI模型中,化学发光信号凭借无背景干扰优势,可比临床方法提前16 h发现肾脏损伤,而近红外荧光信号则提供损伤过程的动态信息。这种双模态成像策略不仅显著提高了诊断可靠性,也为深入解析AKI机制提供了重要技术手段。

3 性能评估与当前研究的局限性

尽管荧光分子探针在AKI的早期诊断与研究中展现出显著潜力,但其临床转化仍面临三大关键科学与技术挑战。首先,靶向性与特异性不足,现有探针多依赖被动富集,对特定肾单位或细胞类型的主动靶向能力有限;并且在复杂体内环境中,探针易对不同活性氧物种产生交叉响应,影响检测准确性。其次,成像性能仍需优化,传统可见光与NIR-I探针成像深度浅,难以覆盖全肾;NIR-II与PA虽有所改善,但仍受限于探测灵敏度。最后,生物安全性与临床前评估体系不完善,探针的全身毒性、代谢途径及长期滞留风险缺乏系统研究。当前研究多停留在小动物模型阶段,缺乏大动物实验及符合临床标准的药代动力学与毒理学数据,严重阻碍了其向临床应用推进。

因此,必须在靶向设计、成像性能及系统化安全评价等方面取得突破,才能实现该技术从基础研究到临床实践的成功转化。

4 小结与展望

荧光分子探针作为一种前沿的分子影像工具,已显示出巨大的应用价值。通过靶向氧化应激、酶活性等关键生物标志物和结合近红外、光声等多模态成像技术,能够实现对AKI病理过程的实时、无创和高灵敏度监测。

未来该领域发展将聚焦三方向:一是向更长波长(NIR-II区)迈进,开发有机小分子NIR-II荧光分子探针,以实现肾脏更深层、更高分辨率的活体成像;二是开发“诊疗一体化”探针,设计集诊断与治疗功能于一体的“Theranostic”探针,在识别病灶时响应性释放药物或进行光动力/光热治疗,实现精准干预;三是加强量化与标准化研究,注重探针性能的全面定量表征和动物实验方案标准化,为临床转化提供可靠数据支持。

参考文献

- [1] LV Y, CHENG D, SU D, et al. Visualization of oxidative injury in the mouse kidney using selective superoxide anion fluorescent probes[J]. Chemical Science, 2018, 9 (39) : 7606-7613.
- [2] LIU L, JIANG L, YUAN W, et al. Dual-modality detection of early-stage drug-induced acute kidney injury by an activatable probe[J]. ACS Sensors, 2020, 5 (08) : 2457-2466.
- [3] ZHANG X, LIU H, ZHANG H, et al. A dual-emission fluorescent probe for simultaneous discrimination of GSH and Cys over Hcy in living cells[J]. Chemical Communications, 2020, 56 (56) : 8103-8106.
- [4] LI C C, MENG Y L, NIU J T, et al. A dual-responsive fluorescent probe for detecting ONOO⁻ and viscosity fluctuations in vivo during ferroptosis-mediated acute kidney injury[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2025, 421: 138786.
- [5] HUANG J, LYU Y, LI J, et al. A renal-clearable duplex optical reporter for real-time imaging of contrast-induced acute kidney injury[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2019, 58 (49) : 17796-17804.
- [6] CHEN X, YUWEN Z, ZHAO Y, et al. In situ detection of alkaline phosphatase in a cisplatin-induced acute kidney injury model with a fluorescent/photoacoustic bimodal molecular probe[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2022, 10: 1068533.
- [7] WENG J, WANG Y, ZHANG Y, et al. An activatable near-infrared fluorescence probe for in vivo imaging of acute kidney injury by targeting phosphatidylserine and caspase-3[J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143 (43) : 18294-18304.