

靶向烧伤创面的荧光显像工具： 低 pH 插入肽的应用研究

朱树先¹ 曹淑² 姚建忠² 周芮冬¹ 杨月月² 陈凯³ 何昆¹

¹昆明医科大学研究生院,昆明 650500; ²解放军联勤保障部队第九二〇医院泌尿外科,昆明 650000; ³大理大学临床医学院,大理 671003

通信作者:姚建忠, Email: 1994128310@qq.com

【摘要】 目的 利用低 pH 插入肽(pHLIP)-变体 7(var7)-异硫氰酸荧光素(FITC)探索一种靶向烧伤创面的精确显像工具,以更好地进行烧伤清创。方法 建立大鼠烧伤模型($n=12$),尾静脉注射不同浓度(0.5、1.5 和 2.0 mg/ml)pHLIP-var7-FITC 进行活体荧光显像。通过荧光偶联物聚集至烧伤创面的集中位置,结合病理切片判断创面损伤坏死范围;并检测 pHLIP-var7-FITC 在心、肝、肾、脑等重要器官的残留及毒性。采用 Kruskal-Wallis 秩和检验、Bonferroni 校正法及单因素方差分析进行数据分析。结果 24 h 内,0.5 mg/ml 组、1.5 mg/ml 组、2.0 mg/ml 组烧伤创面单位面积荧光光子数分别为 1.49(1.31, 1.65)、2.46(1.88, 2.68)、2.77(1.94, 3.10) $\times 10^7$ p · s⁻¹ · cm⁻² · Sr⁻¹,其荧光光子数总体分布差异有统计学意义($H=73.55, P<0.001$),浓度较高组荧光强度较强,但 1.5 mg/ml 组与 2.0 mg/ml 组荧光光子数差异无统计学意义($P=0.263$, Bonferroni 校正法)。14 个时间节点(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、12、24 h)的荧光光子数总体均数差异无统计学意义($F=1.04, P=0.419$),组织切片中可见烧伤坏死的组织与荧光显像区域高度一致。心、肝、肾、脑切片未见明显荧光残留。结论 在浅 II 度烧伤组织中,24 h 内 pHLIP-var7-FITC 能精准靶向聚集在烧伤创面,呈现烧伤组织与正常组织的清晰界限,辅助临床外科手术清创判断损伤范围。

【关键词】 烧伤;光学成像;荧光;膜蛋白质类;荧光素-5-异硫氰酸盐;细胞,培养的;大鼠
基金项目:920 医院院内科科技计划资助项目(2019YGA07)

DOI:10.3760/cma.j.cn321828-20230216-00037

A fluorescence imaging tool targeting burn wounds: research on the application of pH low insertion peptide

Zhu Shuxian¹, Cao Xu², Yao Jianzhong², Zhou Ruidong¹, Yang Yueyue², Chen Kai³, He Kun¹

¹Graduate School of Kunming Medical University, Kunming 650500, China; ²Department of Urology, the 920th Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Kunming 650000, China; ³School of Clinical Medicine, Dali University, Dali 671003, China

Corresponding author: Yao Jianzhong, Email: 1994128310@qq.com

【Abstract】 Objective pH low insertion peptide (pHLIP)-variant 7 (var7)-fluorescein isothiocyanate (FITC) was used to explore an accurate imaging tool that targeted burn wounds to better perform burn debridement. **Methods** Twelve rat models of burn wound were established and pHLIP-var7-FITC with different concentrations (0.5, 1.5 and 2.0 mg/ml) were injected from the rat tail vein for *in vivo* fluorescence imaging. By determining the concentration of fluorescent conjugates to the burn wound, the scope of wound injury necrosis was judged by combining pathological sections, and its residue and toxicity in important organs such as heart, liver, kidneys, and brain were detected. The Kruskal-Wallis rank sum test, Bonferroni correction method and one-way analysis of variance were used for data analysis. **Results** Within 24 h, the fluorescence photons per unit area of the burn wound in the group of 0.5 mg/ml, 1.5 mg/ml and 2.0 mg/ml were 1.49(1.31, 1.65), 2.46(1.88, 2.68), 2.77 (1.94, 3.10) $\times 10^7$ p · s⁻¹ · cm⁻² · Sr⁻¹, with significant differences in the overall distribution of fluorescence photons ($H=73.55, P<0.001$). The fluorescence intensity was stronger in the group with higher concentration, but with no significant difference in the number of fluorescence photons between the group of 1.5 mg/ml and 2.0 mg/ml ($P=0.263$, Bonferroni correction method). At 14 time points (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 12, 24 h), there was no significant difference in the overall mean of fluorescence photons ($F=1.04, P=0.419$), and the tissue with burn necrosis seen in tissue sections was highly consistent with the fluorescence imaging region. There was no obvious fluorescence residue in the heart, liver, kidney and brain sections. **Conclusion** In superficial second-degree burn tissue, pHLIP-var7-FITC can accurately target and gather on the burn

wound within 24 h, showing a clear boundary between burn tissue and normal tissue, which can assist clinical surgical debridement to determine the extent of injury.

【Key words】 Burns; Optical imaging; Fluorescence; Membrane proteins; Fluorescein-5-isothiocyanate; Cells, cultured; Rats

Fund program: 920 Hospital In-hospital Science and Technology Program (2019YGA07)

DOI: 10.3760/cma.j.cn321828-20230216-00037

爆炸烧伤引起的迟发性软组织损伤难以立即清创,而较小器官的清创更是难题^[1]。有研究发现,Ⅱ度烧伤创面在非感染情况下,pH 值介于 5~9 之间^[2]。这种急性损伤后伤口呈酸性的原因之一是由于损伤后细胞代谢适应导致的伤口酸化^[3]。当细胞外环境呈酸性时,低 pH 插入肽(pH low insertion peptide, pHILIP)可以 α -螺旋结构自发插入细胞膜而不造成细胞损伤^[4-5],其已被用作显像剂和治疗剂的载体靶向酸性组织来达到诊断和治疗目的^[6]。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)是一种有机小分子荧光染料,具有良好的稳定性^[7],常在外科手术中被用来引导手术切除病灶^[8]。本研究建立大鼠浅Ⅱ度烧伤模型,选择快速靶向酸性组织却在其他部位快速清除的 pHILIP-变体 7(variant 7, var7)^[9-10],组合成荧光偶联物 pHILIP-var7-FITC 进行靶向烧伤创面的显像,并分析其在烧伤创面中的显像效果。

材料与方 法

一、材料

1. 主要试剂与仪器。荧光偶联物 pHILIP-var7-FITC 购自合肥国肽生物科技有限公司,序列:Fitc-Acp-ACEEQNPWARYLEWLFPTETLLEL, FITC 激发波长为 460~550 nm,最大发射光波长为 520~530 nm,呈现明亮的黄绿色荧光。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8;美国英克公司 Invigentech IV08-500T);质量分数 10%水合氯醛(青岛宇龙海藻有限公司);脱毛膏[利洁时家化(中国)有限公司,薇婷];培养箱(CI-191C;美国精骐有限公司);倒置显微镜(DP74;日本奥林巴斯有限公司);超净工作台(HCB-1300V;青岛海尔股份有限公司);流式细胞仪(Novocyte 2060R;杭州艾森生物有限公司);pH 计(SX811;上海三信仪表厂);组织脱水机(KH-TK;湖北孝感阔海医疗科技有限公司);石蜡包埋机(Leica EG1160;德国徕卡仪器有限公司);石蜡切片机(Leica RM2135;德国徕卡仪器有限公司);小动物活体成像系统(IVIS Lumina Series III;美国 PerkinElmer 公司)由昆明理工大学实验室提供。

2. 细胞株与实验动物。小鼠骨骼肌细胞购自武

汉普诺赛生命科技有限公司,小鼠骨骼肌细胞专用培养基(普诺赛 CP-M084)。雄性 SD 大鼠 12 只,7~8 周龄,体质量 200~250 g,无特殊病原体级,购自昆明医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(滇)K2020-0004,饲养及实验于屏障环境中。本研究经解放军联勤保障部队第九二〇医院伦理委员会批准[批件号:伦审 2019-083(科)-01]。

二、方法

1. CCK-8 细胞活力检测。96 孔板中,每孔平铺 5 000 个小鼠骨骼肌细胞,并加入不同 pH 值(5.6、5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.2、7.4)的培养液 100 μ l。于所有孔加入 CCK-8 溶液 10 μ l,在 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱内温育 2 h。细胞温育完成后,分别于相同 pH 值不同时间(1、6、12、24 h)、及相同时间不同 pH 值(5.6~7.4)进行细胞活力检测,用酶标仪在 450 nm 波长处检测每孔的吸光度(absorbance, A)值。细胞活力% = $(A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

2. 体外 pHILIP-var7-FITC 靶向细胞外酸性微环境的小鼠骨骼肌细胞荧光显像。常温(25~26 $^{\circ}$ C)下,将盐酸与培养基原始 pH 值(7.8)按不同体积比混合来模拟不同梯度 pH 值,用质量分数 0.25%胰酶消化收集小鼠骨骼肌细胞,去上清后,取 1 ml 完全培养基重悬细胞,计数后按照每孔 3×10^4 个细胞将其接种在 12 孔板中,每组接种重复 3 次。当细胞融合度至 80%左右时,分别将不同浓度(0.01、0.05、0.10 mg/ml)pHILIP-var7-FITC 荧光偶联物加入不同 pH 值的培养基,并分别在 1、6、12、24 h 及上述 3 个浓度、10 组 pH 值(5.6~7.4)下用荧光显微镜观察细胞并拍摄。通过 Image-Pro Plus 软件在拍摄照片上进行半定量荧光强度分析。

3. 大鼠烧伤创面及各器官切片的荧光显像。取 12 只 SD 大鼠,提前 1 d 用脱毛膏对其背部皮肤脱毛,面积约为 3 cm \times 4 cm,参考徐锋等^[11]的烧伤方法,启动秒表计时,达浅Ⅱ度烧伤后立即用湿纱布覆盖灭火。烧伤后按随机数字表法分为 4 组(每组 3 只),于尾静脉分别注射体积分数 0.9%的生理盐水(对照组),0.5 mg/ml、1.5 mg/ml 和 2.0 mg/ml 的 pHILIP-var7-FITC 溶液,200 μ l/只,注射后 14 个时间节点

(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、12、24 h)通过小动物活体成像系统对大鼠烧伤创面进行荧光显像,并勾画 ROI,采集其光子数,观察荧光强弱。24 h 后处死大鼠,对大鼠烧伤皮肤取材行 HE 染色,抽取血液行肝肾功能检测,并对心、肝、肾、脑、皮肤行离体组织切片并荧光显像。

4. 统计学处理。采用 IBM SPSS 25.0 软件进行数据分析,符合正态分布的定量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不符合正态分布的定量资料用 $M(Q_1, Q_3)$ 表示。多组比较采用单因素方差分析和 Kruskal-Wallis 秩和检验,组间两两比较采用 Bonferroni 校正法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同 pH 值、时间下小鼠骨骼肌细胞活力测定。在 10 个 pH 组(5.6~7.4)分别控制 pH 值为相同变量的培养基中:1、6、12、24 h 小鼠骨骼肌细胞 CCK-8 细胞活力(%)分别为 73.17 ± 25.25 、 107.09 ± 17.72 、 127.66 ± 49.98 、 95.65 ± 9.40 ,不同时间的细胞活力总体均数差异有统计学意义($F = 19.29, P = 0.001$),12 h 细胞活力最高;在控制上述 4 个时间点为相同变量比较不同 pH 值的条件下,小鼠骨骼肌细胞组与 pH 值(5.6~7.4)组细胞活力(%)分别为 95.14 ± 19.87 、 121.69 ± 52.45 、 112.26 ± 44.36 、 100.01 ± 36.99 、 117.86 ± 43.88 、 107.94 ± 34.98 、 103.35 ± 27.52 、 91.60 ± 23.43 、 88.08 ± 21.32 、 91.76 ± 28.59 、 80.16 ± 29.60 ,其总体均数差异无统计学意义($F = 1.72, P = 0.084$),但酸性组细胞活力较 pH 值 7.4 组高(均 $P < 0.05$, Bonferroni 校正法),可见细胞活力在酸性环境下较近中性环境下高。

2. 不同 pH 组、时间、pHLIP-var7-FITC 浓度下小鼠骨骼肌细胞荧光强度检测。在控制时间(1、6、12、24 h)及浓度(0.01、0.05、0.10 mg/ml)为相同变量的条件下,不同 pH 值(5.6~7.4)组细胞荧光强度分别为 2.00(1.82, 2.13)、2.03(1.96, 2.13)、1.99(1.86, 2.07)、2.00(1.94, 2.08)、2.00(1.93, 2.05)、2.02(1.95, 2.12)、1.95(1.88, 2.05)、1.96(1.87, 2.00)、1.97(1.89, 2.00)、1.86(1.10, 1.95),不同 pH 值下荧光强度总体分布差异有统计学意义($H = 94.37, P < 0.001$),pH = (5.6~7.0)组荧光强度强于 pH = 7.4 组(均 $P < 0.05$, Bonferroni 校正法),pH = (5.8, 6.6)组荧光强度强于 pH = (7.0, 7.2)组(均 $P < 0.05$, Bonferroni 校正法),其余组内比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$, Bonferroni 校正法)。在相同

培养基 pH 值及相同偶联物浓度下,1、6、12、24 h 细胞荧光强度分别为 1.97(1.89, 2.03)、1.98(1.86, 2.08)、2.00(1.94, 2.09)、1.97(1.84, 2.02),不同时间下荧光强度总体分布差异有统计学意义($H = 20.53, P < 0.001$),12 h 组荧光强度强于 1、24 h 组(均 $P < 0.05$, Bonferroni 校正法)。相同时间及相同培养基 pH 值下,0.01、0.05、0.10 mg/ml 组荧光强度分别为 2.00(1.91, 2.07)、1.99(1.91, 2.05)、1.95(1.82, 2.02),不同浓度荧光强度差异有统计学意义($H = 18.19, P < 0.001$),0.01、0.05 mg/ml 组荧光强度强于 0.10 mg/ml 组(均 $P < 0.05$, Bonferroni 校正法),提示 0.10 mg/ml 组不能增强荧光效果。

3. 大鼠烧伤创面荧光强度及显像结果。烧伤后注射 pHLIP-var7-FITC 溶液 24 h 内,0.5 mg/ml 组、1.5 mg/ml 组、2.0 mg/ml 组烧伤创面单位面积荧光光子数分别为 1.49(1.31, 1.65)、2.46(1.88, 2.68)、2.77(1.94, 3.10) $\times 10^7 \text{ p} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Sr}^{-1}$,其荧光光子数总体分布差异有统计学意义($H = 73.55, P < 0.001$),浓度较高组荧光强度较强,但 1.5 mg/ml 组与 2.0 mg/ml 组荧光光子数差异无统计学意义($P = 0.263$, Bonferroni 校正法)。14 个时间节点(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、12、24 h)荧光光子数总体均数差异无统计学意义($F = 1.04, P = 0.419$),24 h 内创面荧光强度无明显变化,烧伤创面均呈现较强荧光强度与对比度(图 1),烧伤创面与健康组织可见明显分界。24 h 后心、肝、肾、脑、皮肤切片荧光显像中未发现 pHLIP-var7-FITC 明显残留(图 2),也未见明显肝肾功能损伤。

讨 论

爆炸伤中的外渗区包括可逆损伤的组织,以水肿和出血为特征,没有肉眼可见的损伤证据,让手术区域的切除范围变得困难。尤其是泌尿生殖系统损伤的治疗,器官体积较小,在高压损伤中早期无法明确判断其坏死组织,这些高压损伤在体表修复和皮肤覆盖后表现出延迟性坏死,一期清创不佳可能导致多次手术。目前尚无一种较好的显像技术能从代谢层面分析细胞组织的存活情况。在无创光学成像中,通过荧光探针、生物标志物或自体荧光进行荧光显像^[12],可引导切除肿瘤及其他病损组织,也被用于前哨淋巴结活组织检查、血管造影和解剖成像,甚至用来观察术口的感染及恢复情况^[13-16]。

本研究中,CCK-8 实验发现偏酸性环境下细胞活力较中性环境下高,这与偏酸性环境下其荧光强

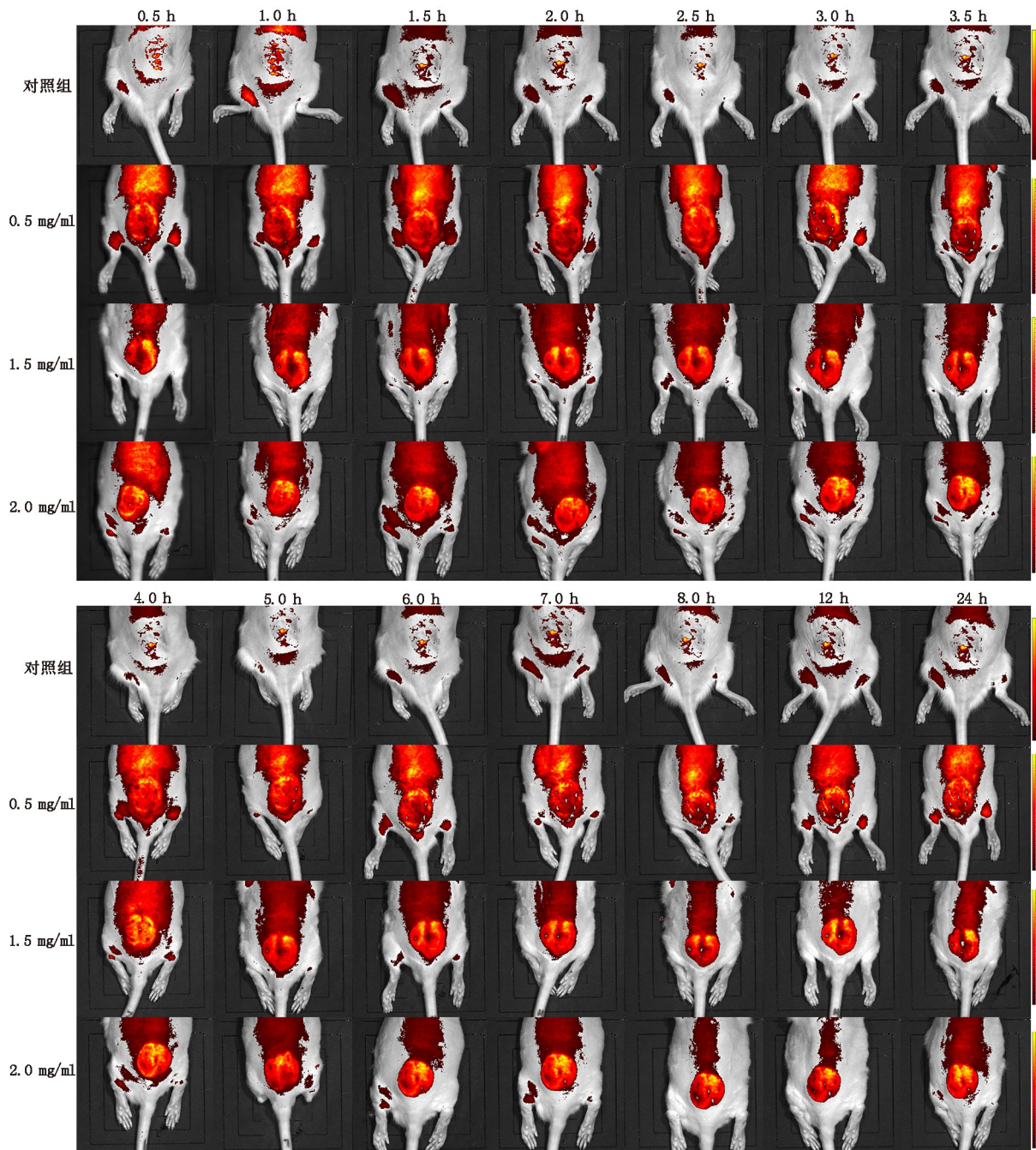


图1 烧伤模型大鼠注射不同浓度低 pH 插入肽(pHLIP)-变体 7(var7)-异硫氰酸荧光素(FITC)后不同时间节点(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、12、24 h)的创面荧光显像图。与对照组相比,从 0.5 h 开始,pHLIP-var7-FITC 明显聚集于烧伤创面,其与周围皮肤及毛发的荧光光子数对比度增加,一直持续至 24 h。浓度较高组荧光强度较强,但 1.5 mg/ml 组与 2.0 mg/ml 组荧光强度差异无统计学意义($P=0.263$)。对照组平均单位面积荧光光子数为 $0.098 \times 10^7 \text{ p} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{Sr}^{-1}$,经计算最佳显像浓度为 2.0 mg/ml,最佳显像时间为 5.0 h,此时靶本底值比最高为 25 倍

度较强的结果相一致,表明 pHILIP-var7-FITC 对酸性微环境下细胞的靶向能力和吸附能力较强,且活力与荧光强度成正比。尽管不同 pH 值下荧光强度有所区别,但多数存活的细胞内都有荧光偶联物存在,故在荧光显像中能分辨健康和失活细胞,从而准确判断细胞状态,同时也表明了 pHILIP 在不同 pH 环境下的靶向性强弱。在时间与 pH 值对细胞活力

的影响中,时间对细胞活力影响最大,故可依据临床需要在预期活力最佳的时间点提前进行偶联物注射,为今后的临床应用提供了一定的参考。

本研究中,烧伤后注射 pHILIP-var7-FITC 溶液后 0.5~24 h,大鼠烧伤创面都有较好的显像效果,与周围正常组织界限清晰,病理可见明显显像区域表面细胞水肿及坏死,其最佳显像时间为 5.0 h,最佳

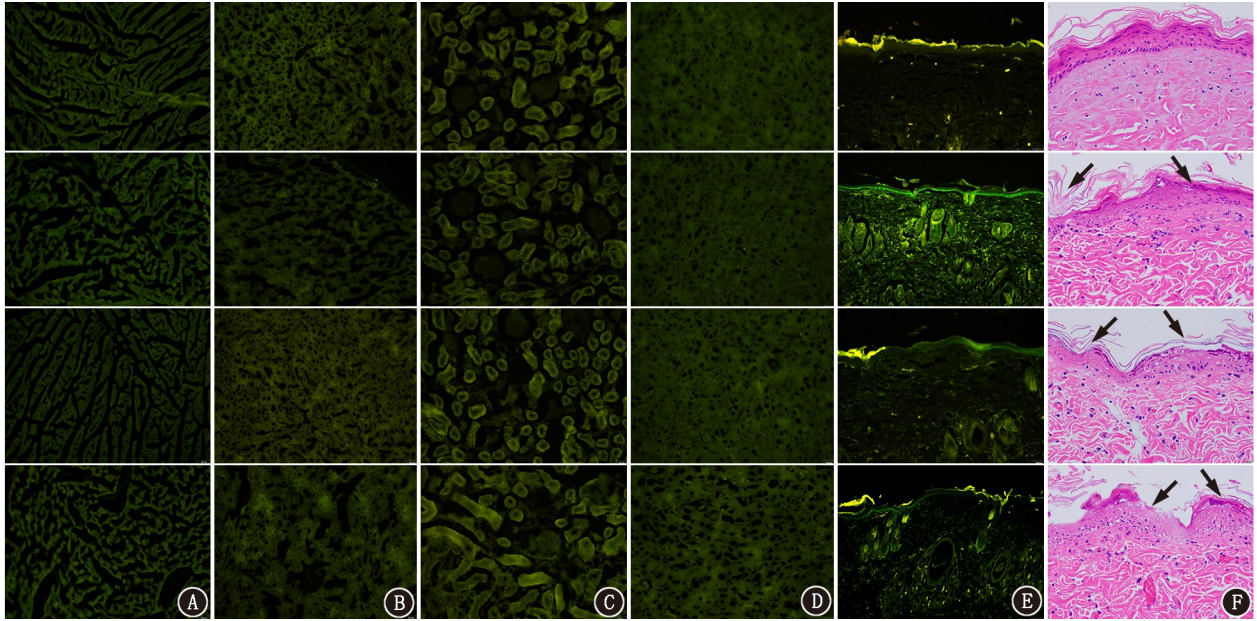


图2 烧伤模型大鼠注射不同浓度低 pH 插入肽(pHLIP)-变体 7(var7)-异硫氰酸荧光素(FITC)后 24 h 心、肝、肾、脑、皮肤切片的荧光显像图及皮肤病理图(从上到下分别为对照组、0.5 mg/ml 组、1.5 mg/ml 组、2.0 mg/ml 组)。A~D.心(A)、肝(B)、肾(C)、脑(D)未发现明显荧光残留($\times 40$);E.皮肤荧光显像($\times 10$)中,3 组浓度下烧伤创面存活组织荧光大量分布,对照组皮肤边缘及以下组织未见亮绿色荧光,且为不规则自发荧光;0.5 mg/ml 组纵向切片上可见下方荧光组织荧光均匀,组织结构排列整齐,上方坏死组织见少量荧光,未见规律荧光;F.皮肤病理图(HE $\times 40$)示烧伤创面与正常组织交界;2.0 mg/ml 组左侧箭头区域可见皮肤表皮细胞正常结构消失,细胞水肿严重,组织结构不规则,为烧伤区域,右侧箭头区域可见细胞形态规则,排列整齐

显像浓度为 2.0 mg/ml,若手术时间不能严格在 5 h 进行,因其在 24 h 内对 II 度烧伤创面具有良好的靶向能力,也能有较长的手术实施时间。本文仅研究了 II 度烧伤,若 I 度、III 度烧伤创面均为酸性环境,则在有血供到达的区域,亦应有较好的显像和精确切除效果。在较高的浓度下,坏死组织与正常组织的边界越清晰,可以根据显像需要选择合适的浓度。皮肤切片荧光显像可见存活组织内偶联物荧光均匀,而在坏死失去血供的组织内,荧光物质稀缺,该部分组织即为可切除的坏死区域;同时健康组织内有均匀的荧光分布,这也为损伤范围的判断提供了更好的支持。但本研究仅限于皮肤烧伤创面的判断,针对更深层次的组织损伤判断尚不足。注射 pHHLIP-var7-FITC 后 24 h,心、肝、肾、脑等重要器官切片暂未发现大量荧光偶联物存在,这可能与偶联物 24 h 时仍大量聚集在烧伤创面有重要关系。肝肾毒性测定中,未见明显差异,这种轻微的影响可能在后期的代谢中很快消失。

pHLIP 之前被用于靶向肿瘤细胞、肺部感染、炎性反应性关节炎和缺血性心肌等疾病的定位诊断,甚至用于判断肿瘤切缘的阳性率以及进行荧光引导手术切除肿瘤组织^[17]及携带药物^[18];Ye 等^[14]提出的便携式荧光显像设备已成功用于判断胆道手术中

造成的损伤。但目前鲜有 pHHLIP 用于靶向烧伤创面的显像研究。本研究中,笔者结合创面烧伤后呈现酸性的特点,成功将 pHHLIP-var7-FITC 靶向至烧伤创面,为阴茎等体积较小或其他烧伤后需要尽可能保留更多组织的器官进行术中实时显像清创提供了思路,同时针对需要辨别坏死与损伤组织的创面,也有良好的应用前景。本研究仅进行了大鼠背部烧伤创面的研究,因大鼠泌尿生殖系统器官过小,未能进行该部位损伤的精确显像研究。但在离体人体泌尿生殖系统肿瘤显像中,其具有良好的肿瘤显像效果^[19]。如能将其应用于泌尿生殖系统创伤的创面清创中,其长达 24 h 的显像时间将带来相当大的手术显像空间,为病损组织的切除提供了新的诊疗思路与方法,将能更好地保留健康组织及改善预后。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 朱树先:研究实施、论文撰写;曹淑、姚建忠:研究指导、论文修改、经费支持;周芮冬、杨月月:统计学分析、论文修改;陈凯、何昆:论文修改

参 考 文 献

- [1] 朱树先,姚建忠,曹淑,等.骨盆泌尿生殖系统创伤诊治与展望[J].西南国防医药, 2021, 31(6): 552-555. DOI:10.3969/j.issn.1004-0188.2021.06.029.
Zhu SX, Yao JZ, Cao X, et al. Diagnosis, treatment and prospects of pelvic genitourinary warfare trauma [J]. Med J Natl Defend

- Forces Southwest China, 2021, 31(6): 552-555. DOI:10.3969/j.issn.1004-0188.2021.06.029.
- [2] Ono S, Imai R, Ida Y, et al. Increased wound pH as an indicator of local wound infection in second degree burns[J]. Burns, 2015, 41(4): 820-824. DOI:10.1016/j.burns.2014.10.023.
- [3] Morone D, Autilia F, Schorn T, et al. Evaluation of cell metabolic adaptation in wound and tumour by fluorescence lifetime imaging microscopy[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 6289. DOI:10.1038/s41598-020-63203-4.
- [4] Frazee N, Mertz B. Intramolecular interactions play key role in stabilization of pHLIP at acidic conditions[J]. J Comput Chem, 2021, 42(25): 1809-1816. DOI:10.1002/jcc.26719.
- [5] 胡林晗,孙莹,杨鹏,等.不同插入途径的3种肽研究进展[J].军事医学, 2022, 46(1): 74-77. DOI:10.7644/j.issn.1674-9960.2022.01.016.
- Hu LH, Sun Y, Yang P, et al. Three peptides with different insertion pathways: research progress[J]. Milit Med Sci, 2022, 46(1): 74-77. DOI:10.7644/j.issn.1674-9960.2022.01.016.
- [6] Dharmaratne NU, Kaplan AR, Glazer PM. Targeting the hypoxic and acidic tumor microenvironment with pH-sensitive peptides[J]. Cells, 2021, 10(3): 541. DOI:10.3390/cells10030541.
- [7] Chaganti LK, Venkatakrisnan N, Bose K. An efficient method for FITC labelling of proteins using tandem affinity purification[J]. Biosci Rep, 2018, 38(6): BSR20181764. DOI:10.1042/BSR20181764.
- [8] Zhou H, Gao Y, Liu Y, et al. Targeted fluorescent imaging of a novel FITC-labeled PSMA ligand in prostate cancer[J]. Amino Acids, 2022, 54(1): 147-155. DOI:10.1007/s00726-021-03102-8.
- [9] Weerakkody D, Moshnikova A, Thakur MS, et al. Family of pH (low) insertion peptides for tumor targeting[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(15): 5834-5839. DOI:10.1073/pnas.1303708110.
- [10] 黎翔,杨卫东,汪静.肿瘤酸性微环境与靶向 pH 分子影像[J].中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(5): 300-303. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.05.012.
- Li X, Yang WD, Wang J. Tumor acidic microenvironment and targeted pH molecular imaging[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 39(5): 300-303. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.05.012.
- [11] 褚锋,刘建国,唐帆,等.小鼠Ⅲ度烧伤模型的复制及皮肤病理形态改变的动态观察[J].中国实验动物学报, 2009, 17(3): 213-215. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2009.03.013.
- Chu F, Liu JG, Tang F, et al. Establishment of a mouse model of skin III-degree burns and the pathological dynamics[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2009, 17(3): 213-215. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2009.03.013.
- [12] Li S, Mohamedi AH, Senkowsky J, et al. Imaging in chronic wound diagnostics[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2020, 9(5): 245-263. DOI:10.1089/wound.2019.0967.
- [13] Takahashi T, Yamazaki K, Ota H, et al. Near-infrared fluorescence imaging in the identification of parathyroid glands in thyroidectomy[J]. Laryngoscope, 2021, 131(5): 1188-1193. DOI:10.1002/lary.29163.
- [14] Ye J, Liu G, Liu P, et al. Benchtop and animal validation of a portable fluorescence microscopic imaging system for potential use in cholecystectomy[J]. J Biomed Opt, 2018, 23(2): 1-4. DOI:10.1117/1.JBO.23.2.020504.
- [15] Blumenthal E, Jeffery S. Autofluorescence imaging for evaluating debridement in military and trauma wounds[J]. Mil Med, 2018, 183(suppl_1): 429-432. DOI:10.1093/milmed/usx145.
- [16] Chew B, Griffin M, Butler PE, et al. The use of MolecuLight i:X device in acute hand trauma[J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2020, 73(7): 1357-1404. DOI:10.1016/j.bjps.2020.03.004.
- [17] Crawford T, Moshnikova A, Roles S, et al. pHLIP ICG for delineation of tumors and blood flow during fluorescence-guided surgery[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 18356. DOI:10.1038/s41598-020-75443-5.
- [18] 张敏,苗莹,李婷,等.荧光标记的低 pH 插入肽靶向乳腺癌酸性微环境的显像研究[J].中华核医学与分子影像杂志, 2019, 39(8): 488-493. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.08.009.
- Zhang M, Miao Y, Li T, et al. Fluorescence-labeled pH-low insertion peptide imaging of the acid microenvironment of breast tumor[J]. Chin J Nucl Med Mol Imaging, 2019, 39(8): 488-493. DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-2848.2019.08.009.
- [19] Moshnikova A, Golijanin B, Amin A, et al. Targeting bladder urothelial carcinoma with pHLIP-ICG and inhibition of urothelial cancer cell proliferation by pHLIP-amanitin[J]. Front Urol, 2022, 2: 868919. DOI:10.3389/fruro.2022.868919.

(收稿日期:2023-02-16)