

文章编号: 1000-7032(2026)09-1737-09

一氧化碳荧光探针构建及其动物细菌性肺炎和植物抗镉污染成像研究

翟鹤书, 伍玉林, 尚主业, 张依梦, 孟庆涛*

(辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051)

摘要: 一氧化碳(CO)是一种工业活动中产生的有毒气体,近期被发现可作为关键的信号分子参与细菌感染等病理生理过程及植物非生物胁迫响应。为实现复杂生物体系中CO的动态监测,本研究构建了一种基于罗丹明骨架的新型红光发射荧光探针(Rh-CO),通过将烯丙基甲酸酯识别单元连接至罗丹明荧光团而成。在PdCl₂与CO存在下,探针发生Tsuji-Trost介导的烯丙基甲酸酯裂解反应,荧光信号于635 nm处显著增强并在26 min内达到响应平衡。Rh-CO具有红光发射、高选择性识别CO、检测限低至1.94 μmol/L及低细胞毒性等优良特性,适用于活体成像研究。实验进一步证实了该探针在脂多糖(LPS)诱导的小鼠肺炎模型中可视化内源性CO生成、探究CO的抗炎作用以及监测Cd²⁺胁迫下植物体内CO波动的应用潜力。该研究为探究CO在动物、植物系统中的生物学功能提供了一种多功能分子工具。

关键词: 红光发射荧光探针; 一氧化碳; 荧光成像; 细菌性肺炎; 植物非生物胁迫

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.3724/CJL.20260111

CSTR: 32170.14.CJL.20260111

Construction of a Fluorescent Probe for Carbon Monoxide and Its Application in Imaging Bacterial Pneumonia and Cadmium-induced Stress in Plants

ZHAI Heshu, WU Yulin, SHANG Zhuye, ZHANG Yimeng, MENG Qingtao*

(School of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051, China)

* Corresponding Author, E-mail: qtmeng@ustl.edu.cn

Abstract: Carbon monoxide (CO), a toxic gas generated during industrial operations, has recently been recognized as a critical signaling molecule in pathophysiological processes such as bacterial infection, as well as in abiotic stress responses in plants. To enable dynamic tracking of CO in complex biological matrices, we report a new red-emitting fluorescent probe (Rh-CO) engineered by tethering an allyl formate recognition unit to a rhodamine scaffold. In the presence of PdCl₂ and CO, the probe undergoes a Tsuji-Trost-mediated cleavage of the allyl formate moiety and displays a turn-on fluorescence enhancement at 635 nm that reaches a response plateau within 26 min. Rh-CO exhibits favorable properties including red emission, excellent selectivity for CO, a detection limit of 1.94 μmol/L, and low cytotoxicity, making it well-suited for *in vivo* imaging applications. The utility of Rh-CO was further demonstrated by visualizing endogenous CO generation in a lipopolysaccharide-induced murine pneumonia model, evaluating the anti-inflammatory action of CO, and monitoring CO fluctuations in plants under Cd²⁺ stress. These findings collectively introduce a versatile molecular tool for investigating CO functions across animal and plant systems.

Keywords: red-emitting fluorescent probe; carbon monoxide; fluorescence imaging; bacterial pneumonia; plant abiotic stress

收稿日期: 2026-04-01; 修订日期: 2026-04-15

基金项目: 国家自然科学基金-青年科学基金项目(22506074); 辽宁省自然科学基金项目(2024LNYKJ27)

Supported by National Natural Science Foundation of China (22506074); Natural Science Foundation of Liaoning Province (2024LNYKJ27)

1 引 言

一氧化碳(CO)是关键的气体信号分子之一,在生物体内通过血红素加氧酶(HO-1和HO-2)介导的血红素分解代谢途径内源性产生^[1]。内源性生成的CO在多种生物学功能中发挥重要作用,如调控炎症反应、细胞凋亡和增殖过程。然而,CO代谢紊乱与多种疾病密切相关,包括肺部疾病、炎症反应、抗凋亡异常、败血症以及阿尔茨海默病等^[2]。越来越多的证据表明,氧化应激的病理状态可导致CO水平升高。例如,细菌代谢过程中会产生CO,因此细菌性肺炎患者肺泡中的CO浓度显著升高^[3]。植物体内内源性CO的主要来源也是血红素加氧酶(HO),该酶催化血红素降解生成游离铁、胆绿素IX α 和CO^[4]。在植物中,CO参与调控植物生长发育以及对非生物胁迫(如重金属毒害)的响应过程^[5]。自20世纪50年代末发现陆生植物能够产生CO以来,后续研究揭示了CO在种子萌发、根系发育、气孔运动以及对缺铁和镉毒性响应等关键生理过程中的重要作用^[6]。通常情况下,植物体内镉的积累会通过重金属胁迫响应诱导内源性CO的产生^[7]。同时,内源性CO可通过调节谷胱甘肽代谢途径减轻镉诱导的氧化损伤。鉴于CO兼具生理调节因子和潜在胁迫因子的双重角色,开发能够选择性、灵敏地检测动植物样品中CO的响应型探针,对于生物医学研究、植物科学以及环境监测等领域具有重要意义。

在过去的几十年中,研究者已发展出多种传统技术用于CO的检测,如电化学分析^[8-9]、显色检测^[10-11]、气相色谱^[12]和拉曼光谱^[13]等。考虑到CO的高反应活性,亟需发展能够原位检测真实生物样品

中CO的方法,以评估其在生物和植物系统中的功能^[14-18]。基于响应型探针的荧光传感或成像技术,因其具有快速响应、灵敏度高、操作简便和非侵入性等优势而受到广泛关注^[19-24]。近年来,基于以下机理已成功开发出多种CO特异性荧光探针:(1) Pd⁰介导的 Tsuji-Trost 反应;(2) 过渡金属物种(如 Pd、Ru 等)介导的反应;(3) 硝基还原为氨基的反应;(4) 螺内酰胺开环水解过程。基于上述传感机制,研究者已成功开发出多种用于活体系统(如活细胞、斑马鱼和裸鼠)中CO检测的荧光探针^[14,17-18]。然而,可用于炎症模型中CO检测并监测CO介导的炎症治疗响应的荧光探针仍鲜有报道。特别是,用于监测植物响应非生物胁迫(尤其是重金属毒害胁迫)过程中CO变化的探针仍然十分有限^[25]。

本文设计合成了一种基于罗丹明骨架的红光发射一氧化碳荧光探针 **Rh-CO**。该探针以烯丙基甲酸酯基团作为CO特异性识别位点,通过将其连接至罗丹明荧光团构建而成。选用罗丹明作为荧光母核,是因为其具有优异的脂溶性、较强的组织穿透能力、较高的摩尔消光系数、良好的光稳定性及适宜的pH适用范围^[26-30]。烯丙基甲酸酯基团因其对Pd⁰的特异性捕获能力而被广泛用作CO识别单元。在PdCl₂存在下,CO可将Pd²⁺还原为Pd⁰,进而通过Pd⁰介导的 Tsuji-Trost 反应诱导烯丙基甲酸酯基团从 **Rh-CO** 分子上选择性裂解,实现对CO的特异性检测。由于光诱导电子转移(PET)过程,吸电子的烯丙基甲酸酯基团连接至供电子的罗丹明骨架后,**Rh-CO**的荧光处于猝灭状态^[31]。当体系中存在CO时,烯丙基甲酸酯基团被裂解,PET过程受阻,使得**Rh-CO**在635 nm处的红光荧光显著增强(图1(a))。研究表明,**Rh-**

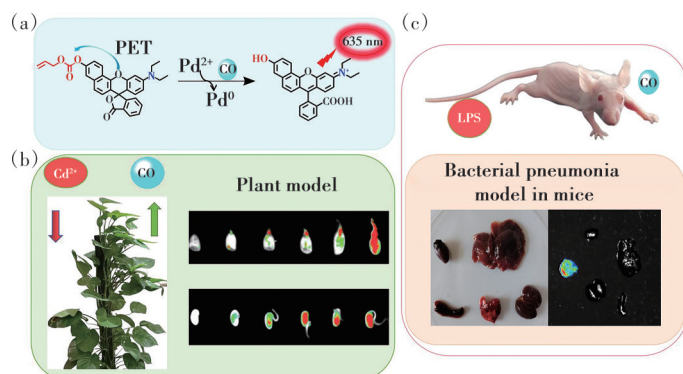


图1 (a)探针 **Rh-CO** 对CO的响应机制;(b)**Rh-CO** 监测植物模型在重金属污染环境中释放CO;(c)**Rh-CO** 监测动物肺炎模型中体内释放CO

Fig.1 (a)Proposed reaction mechanism of probe **Rh-CO** with CO. (b)Monitoring CO release in plant models under heavy metal-contaminated environments using **Rh-CO**. (c)Monitoring *in vivo* CO release in an animal pneumonia model using **Rh-CO**

CO在动物和植物系统中具有良好的适用性。该探针不仅成功应用于定量监测细菌性肺炎治疗过程中的CO浓度变化,还能实现对活体植物中重金属(Cd^{2+})胁迫诱导CO产生的实时成像监测(图1(b)、(c))。尤为重要的是,该探针突破了现有CO荧光探针仅适用于单一生物体系的局限,首次实现了一氧化碳在动物炎症模型与植物重金属胁迫模型中的跨物种、跨界系统成像,为在同一分子工具下比较研究CO在动植物系统中的信号传导功能机制提供了全新可能。

2 实 验

2.1 主要仪器与试剂

仪器:AVANCE 400 MHz型核磁共振波谱仪(瑞士Bruker公司);6530 Q-TOF LC/MS型液相色谱-质谱联用仪(美国Agilent公司);Shimadzu UV-3600 Plus型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);F-7100型荧光分光光度计(日本Hitachi公司);PB-10型pH计(德国Sartorius公司);LSM 880型共聚焦显微镜(德国Carl Zeiss公司)。生物成像实验使用Ami小动物活体成像系统(美国Spectral Instruments Imaging公司)。试剂:1,6-二羟基萘(纯度99%)购自上海毕得医药科技有限公司(中国上海);4-二乙氨基酮酸(纯度99%)和脂多糖购自上海麦克林生化科技有限公司(中国上海);三氟乙酸(纯度98%)和氯甲酸烯丙酯(纯度98%)购自北京百灵威科技有限公司(中国北京);乙酸乙酯、甲醇、浓硫酸、高氯酸、二氯甲烷和乙腈均购自国药集团化学试剂有限公司(中国上海)。所有商业溶剂和试剂均为分析纯级别,使用前未经进一步纯化,除非另有说明。所有实验操作均使用去离子水。

2.2 探针Rh-CO的合成

将1,6-二羟基萘(160 mg, 1.0 mmol)与4-二乙氨基酮酸(313 mg, 1.0 mmol)溶解于10 mL三氟乙酸中,加热搅拌反应16 h。待反应完成后,减压蒸馏除去三氟乙酸,残余物加入8 mL乙酸乙酯,继续搅拌15 min,析出红色固体。经真空抽滤后干燥,得化合物Rh-OH,产率83%。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.10 (s, 1H), 8.45 (d, $J=9.0$ Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.76 (dd, $J=14.8, 7.4$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.27 (d, $J=6.9$ Hz, 2H), 7.16 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.61~6.50 (m, 4H), 3.41 (d, $J=6.3$ Hz, 4H), 1.13 (t, $J=6.9$ Hz, 6H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 157.68,

153.35, 152.36, 147.31, 136.30, 136.02, 130.50, 129.09, 125.02, 124.58, 124.53, 124.20, 122.24, 119.36, 117.65, 109.74, 109.45, 104.98, 97.66, 84.50, 44.25, 12.86。

将Rh-OH (1 mmol)、氯甲酸烯丙酯(2 mmol)和碳酸铯(2 mmol)溶于乙腈(15 mL)中,加热回流8 h。反应完成后,冷却混合物,过滤除去沉淀。滤液减压浓缩,所得粗产物通过硅胶柱层析纯化(二氯甲烷/甲醇),得到目标产物白色固体Rh-CO,产率78%。ESI: m/z $[\text{Rh-CO}+\text{H}]^+=522.1939$,计算值521.1838。 ^1H NMR (400 MHz, $\text{Chloroform}-d$) δ 8.64 (d, $J=9.1$ Hz, 1H), 8.09~8.01 (m, 1H), 7.67~7.57 (m, 3H), 7.47 (dd, $J=9.1, 2.4$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J=6.7, 1.6$ Hz, 1H), 6.79 (d, $J=8.7$ Hz, 1H), 6.43 (dd, $J=8.9, 2.6$ Hz, 1H), 6.03 (ddt, $J=16.5, 10.4, 5.8$ Hz, 1H), 5.46 (dq, $J=17.2, 1.5$ Hz, 1H), 5.36 (dq, $J=10.4, 1.2$ Hz, 1H), 4.78 (dt, $J=5.8, 1.4$ Hz, 2H), 3.41 (q, $J=7.1$ Hz, 4H), 1.21 (t, $J=7.1$ Hz, 6H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{Chloroform}-d$) δ 153.66, 153.34, 152.40, 150.25, 149.61, 147.46, 134.92, 131.05, 129.57, 128.95, 125.30, 124.92, 124.35, 124.07, 122.62, 122.06, 120.77, 119.69, 118.00, 112.95, 108.98, 104.97, 97.69, 84.24, 69.34, 44.52, 29.72, 12.58(补充文件方案S1,图S1~S5)。

2.3 溶液配制及光谱分析

探针粉末置于 -20°C 避光干燥条件下密封保存;工作液现配现用,短期储存于 4°C 避光环境。

配制Rh-CO浓溶液:称取0.02605 g探针固体溶于50 mL DMSO中,配成 1×10^{-3} mol/L的浓溶液。称取0.0177 g PdCl_2 溶于50 mL的DMSO中,配成 2×10^{-3} mol/L的浓溶液。测试时各取0.5 mL上述溶液加入100 mL容量瓶中,加入9 mL DMSO,再用PBS(20 mmol/L, pH 7.4)缓冲溶液稀释定容。配成探针测试溶液体系(Rh-CO 5 $\mu\text{mol/L}$ + PdCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v)

2.4 探针Rh-CO在植物样本中的研究

选择花生与豆芽作为植物模型,主要因其生长周期短、培育简便、结构均一,且易于进行活体荧光成像观察,是评估探针在植物体系中响应性能的理想模式材料。外源性CO成像:将花生种子

和豆芽先浸泡在 **Rh-CO** 测试液(**Rh-CO** 5 $\mu\text{mol/L}$ + PdCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v)中,随后转移至含梯度浓度一氧化碳释放分子(Carbon monoxide-releasing molecule-3, CORM-3) 0, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$ 的溶液中,室温下继续孵育 30 min。用蒸馏水冲洗两次后,采集荧光图像。镉胁迫下内源性 CO 成像:为评估胁迫诱导的 CO 产生,将花生和豆芽暴露于 Cd^{2+} 溶液中(0, 1, 2, 3, 4, 5 天)。所有样本用蒸馏水彻底冲洗,室温下与 **Rh-CO** 测试液孵育 30 min,再次冲洗后成像。

2.5 探针 **Rh-CO** 在细胞成像中的研究

RAW 264.7 巨噬细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。成像实验按以下方式处理细胞:对照组:细胞与 **Rh-CO** 测试液(**Rh-CO** 5 $\mu\text{mol/L}$ + PdCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v),孵育 15 min;外源性 CO 组:细胞先与 CORM-3(300 $\mu\text{mol/L}$)孵育 30 min,再与 **Rh-CO** 测试液孵育 15 min;内源性 CO 组:细胞先用 LPS(0.1 mg/mL)刺激 6 h,再与 **Rh-CO** 测试液孵育 15 min。荧光图像采集时激发波长为 538 nm,发射波长收集范围为 600~680 nm。线粒体共定位实验中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理后的细胞依次用 **Rh-CO** 和 MitoTrac-ker[®]Green FM 染料各染色 15 min 后成像。

2.6 探针 **Rh-CO** 在动物样本成像中的研究

活体外源性 CO 成像^[32-33]:裸鼠腹腔注射 **Rh-CO** 测试液(**Rh-CO** 5 $\mu\text{mol/L}$ + PdCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v) 50 μL ,随后在同一部位注射 CORM-3(300 $\mu\text{mol/L}$, 50 μL),每 10 min 记录一次荧光信号,持续 60 min。

细菌性肺炎模型:将小鼠分为三组。(1)空白组:每日鼻腔滴注 PBS(0.1 mL),连续 14 天。(2)肺炎组:每日鼻腔滴注 LPS(0.1 mg/mL, 0.1 mL),连续 14 天。(3)治疗组:肺炎模型小鼠腹腔注射地塞米松(DEX, 0.5 mmol/L, 30 μL),每 24 h 注射一次,共两次。异氟烷麻醉后处死小鼠,取出器官样本,与 **Rh-CO** 测试液(**Rh-CO** 5 $\mu\text{mol/L}$ + PdCl_2 10 $\mu\text{mol/L}$, 20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v)孵育 60 min 后成像。

3 结果与讨论

3.1 探针 **Rh-CO** 对 CO 的识别机制研究

罗丹明荧光染料具有亮度高、光稳定性好及

细胞通透性优异等特点,被广泛应用于生物成像研究。基于此,本工作以罗丹明骨架为荧光团将其与烯丙基甲酸酯基团相连,之间发生电子迁移,导致探针荧光被有效猝灭。因此,在无 CO 时, **Rh-CO** 处于“关闭”状态;当 Pd^{2+} 存在下与 CO 反应时,探针发生 Tsuji-Trost 脱烯丙基反应,甲酸酯基团断裂,阻断光致电子转移过程,使罗丹明的近红外荧光得以恢复,在 635 nm 处产生显著的红光信号。质谱分析结果证实了这一转化机制:反应前 **Rh-CO** 的分子离子峰位于 m/z 522.193 9 ($[\text{Rh-CO}+\text{H}]^+$, 理论值 521.183 8),与 CO/ PdCl_2 反应后该峰消失,同时出现脱烯丙基产物 **Rh-OH** 的特征峰 m/z 438.170 6 ($[\text{Rh-OH}+\text{H}]^+$, 理论值 438.170 0)(图 S5~S6)。反应体系的吸收光谱及发射光谱与 **Rh-OH** 标准品完全吻合,进一步验证了上述机理。

3.2 探针 **Rh-CO** 对 CO 的光谱响应

为确定最佳工作条件,首先通过光谱滴定优化 PdCl_2 浓度。当 PdCl_2 与探针的量比为 2:1 时,荧光增强达到平台期,继续增加浓度未见进一步提高(图 2(a))。因此,后续实验采用 **Rh-CO** (5 $\mu\text{mol/L}$) 与 PdCl_2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 的 1:2 量比作为优化体系,在 PBS 缓冲液(20 mmol/L, pH 7.4, 含 10% DMSO)中进行。通过逐步添加 CORM-3,详细表征了体系对 CO 的响应。向 **Rh-CO** 体系中逐步加入 CORM-3 (0~0.3 mmol/L)时,513 nm 和 546 nm 处的原始吸收峰逐渐增强。当 CORM-3 添加至 0.3 mmol/L 后,光谱变化趋于稳定。溶液颜色由无色变为粉色,可实现 CO 的肉眼可视化检测(图 2(b))。**Rh-CO** 探针初始时无荧光,随着 CORM-3 浓度的增加,635 nm 处发射峰逐渐增强,当 CORM-3 浓度为 60 当量时,荧光达到最大值并趋于稳定,呈现亮红色荧光(图 2(c))。通过对多种生物相关物种(包括活性氧、金属离子、阴离子及硫醇类物质)的响应,分析物(0.3 mmol/L)(包括 H_2O_2 , Hg^{2+} , GSH, ClO^- , Cu^{2+} , NO_3^- , CO_3^{2-} , Cys, Hcy, Zn^{2+} , HSO_4^- , SO_4^{2-} , Pb^{2+} , Cl^- , SO_3^{2-} , Br^- , SCN^- , PO_4^{3-} , $\text{S}_2\text{O}_7^{2-}$, NO_2^- , HSO_3^- , Cd^{2+} , F^- , Cr^{3+} , HCO_3^- , Co^{2+} , Ni^{2+} , $\text{P}_2\text{O}_4^{4-}$, I^- , H_2S)评估了 **Rh-CO** 体系的选择性。紫外-可见吸收光谱显示,仅 CO 引发显著的光谱变化,其他测试分析物均未引起明显变化(图 2(d))。加入 CO 后溶液颜色由无色变为粉色(图 S8(a))。测量结果与此一致,仅在 CO 存在下观察到 635 nm 处显著的荧光增强(图 2(e)),而其他物种引起的荧光变化可忽略不计

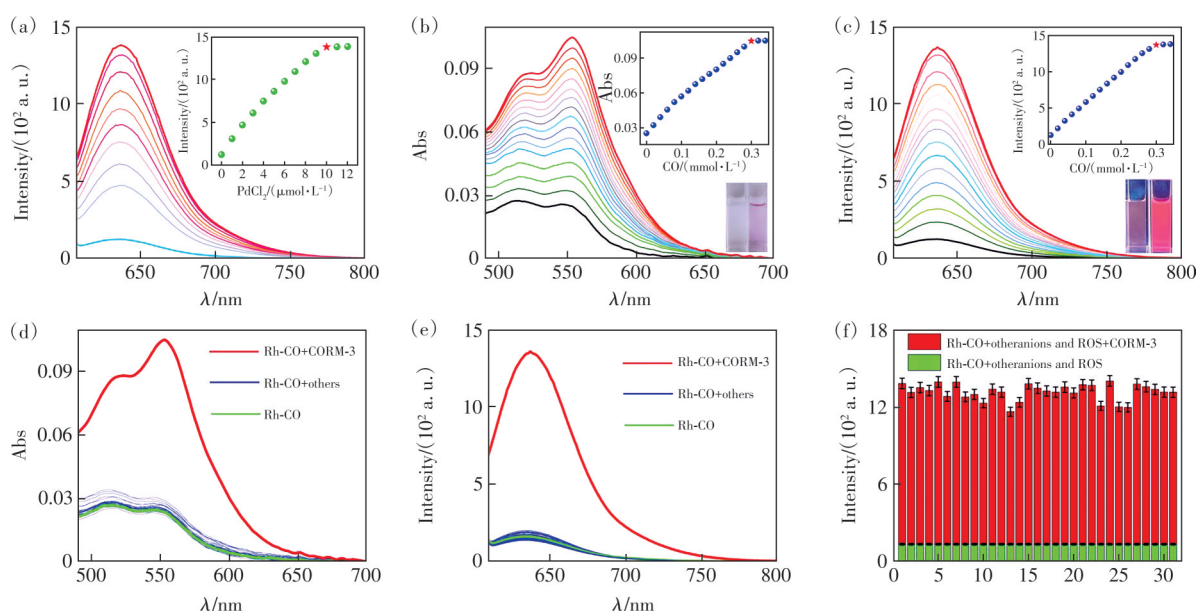


图2 (a)不同浓度 PdCl_2 (0~12 $\mu\text{mol/L}$) 存在下, **Rh-CO** (5 $\mu\text{mol/L}$) 对 **CORM-3** (0.3 mmol/L) 响应的荧光光谱, 插图: 635 nm 处荧光强度随 PdCl_2 浓度的变化; (b) 紫外吸收滴定光谱, 插图: **Rh-CO** 在 546 nm 处对 CO 浓度 (0~0.34 mmol/L) 的紫外变化关系和自然光下溶液颜色变化; (c) 荧光发射滴定光谱, 插图: **Rh-CO** 在 635 nm 处对 CO 浓度 (0~0.34 mmol/L) 的荧光变化关系和 365 nm 紫外灯照下溶液荧光变化; (d) 紫外吸收选择光谱; (e) 荧光发射选择光谱; (f) 荧光竞争光谱。实验条件: PBS 缓冲液 (20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v)

Fig.2 (a) Fluorescence spectra of **Rh-CO** (5 $\mu\text{mol/L}$) in response to **CORM-3** (300 $\mu\text{mol/L}$) in the presence of varying concentrations of PdCl_2 (0–12 $\mu\text{mol/L}$). Inset: fluorescence intensity at 635 nm as a function of PdCl_2 concentration. (b) UV-Vis absorption titration spectra. Inset: UV variation of **Rh-CO** at 546 nm with CO concentration (0–0.34 mmol/L) and color change of the solution under natural light. (c) Fluorescence emission titration spectra. Inset: Fluorescence variation of **Rh-CO** at 635 nm with CO concentration (0–0.34 mmol/L) and fluorescence change of the solution under 365 nm UV lamp irradiation. (d) Absorption selectivity spectra. (e) Fluorescence emission selectivity spectra. (f) Fluorescence competition spectra. Experimental conditions: PBS buffer (20 mmol/L, pH=7.4, DMSO:PBS=1:9, v/v)

(图 S8(b))。竞争实验进一步证实了其高特异性, 即其他干扰物存在下 CO 诱导的荧光开启响应不受影响 (图 2(f))。综上, **Rh-CO** 对 CO 具有优异的选择性。 **Rh-CO** 在 pH 6~8 范围内荧光发射稳定 (图 S7(a))。探针在 PBS 缓冲液中可稳定存在 36 h 以上 (图 S7(c))。当加入 **CORM-3** (0.3 mmol/L) 后, **Rh-CO** 体系在 635 nm 处荧光迅速增强, 并在 26 min 内达到平台期 (图 S7(b))。在 **CORM-3** 过量的准一级反应条件下, 拟合荧光动力学曲线得到表观速率常数 $K_{\text{obs}}=0.174 \text{ min}^{-1}$, 半衰期 $t_{1/2}=4.0 \text{ min}$ 。在 0~40 $\mu\text{mol/L}$ **CORM-3** 浓度范围内, 荧光强度与浓度呈良好线性关系 ($R^2=0.994 \ 91$), 检出限为 1.94 $\mu\text{mol/L}$ 。检出限按 $\text{LOD}=3\sigma/k$ 计算, 其中 σ 为空白缓冲液平行测定 10 次的荧光强度标准偏差, k 为标准曲线的斜率 (图 S7(d))。上述结果表明, **Rh-CO** 具有响应快速、选择性高、检测限低等优点, 其优良的光物理性质使其能够满足生物体系中 CO 实时动态监测的需求。

3.3 植物模型中 CO 的测定

研究利用花生、豆芽两种模式系统评估 **Rh-CO** 在活体植物中可视化 CO 动态的能力。在豆芽、花生外源性 CO 实验中, 随着 **CORM-3** 的浓度增大, 荧光强度显著增强, 这表明 **Rh-CO** 具备足够的组织穿透力, 可用于植物幼苗的深层组织成像 (图 3(a)、(c))。随后, 我们模拟花生、豆芽种子具有重金属镉环境的生长条件, 随着种子在镉环境的生长时间的增加, 我们用探针对种子进行检测, 发现种子在镉环境中生存时间越长, 荧光越显著, 这表明探针 **Rh-CO** 具备检测植物受到重金属镉胁迫导致体内产生 CO 的应用能力 (图 3(b)、(d))。

3.4 细胞模型中 CO 的测定

通过 MTT 法评估了 **Rh-CO** 对 A549 细胞的毒性。采用浓度为 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 的探针孵育 24 h 后, 细胞在 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下存活率为 92%, 在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下超过 89%, 即使在 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下也大于 80% (图 S9), 证实其具有低细胞毒性, 适用于生

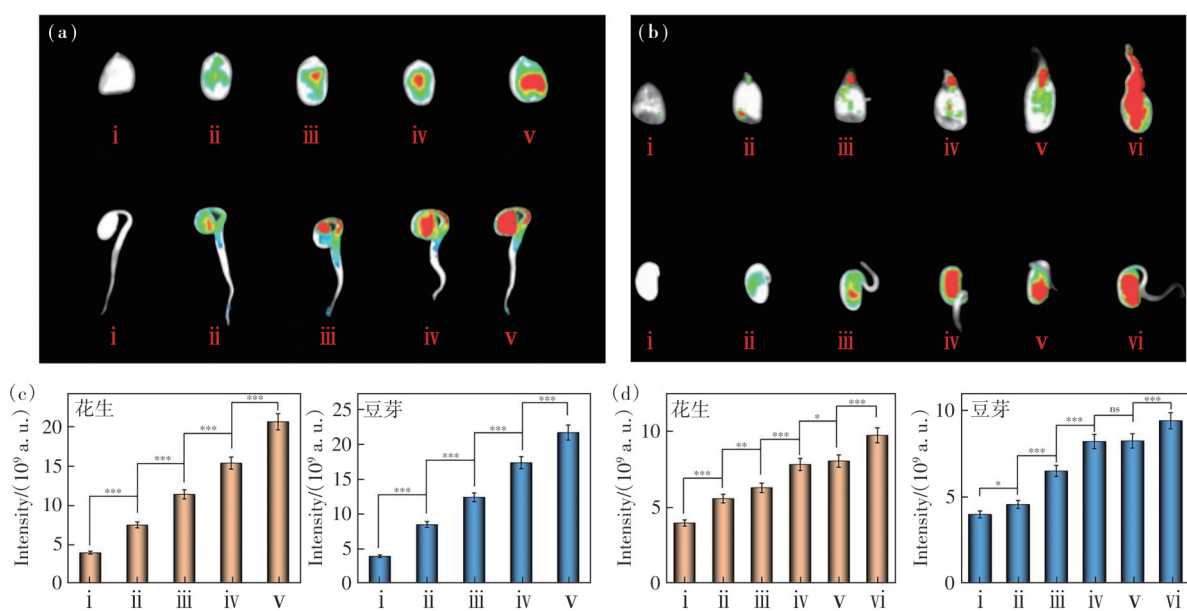


图3 (a)外源性花生、豆芽CO的荧光成像:(i)对照组(Rh-CO处理)的花生和豆芽荧光成像,(ii)~(v)探针预处理12 h后,再与不同浓度的CORM-3在25 °C下继续孵育30 min:(ii)50,(iii)100,(iv)200,(v)300 μmol/L的花生和豆芽荧光成像。(b)内源性花生、豆芽CO的荧光成像:(i)对照组(Rh-CO处理)的花生和豆芽荧光成像;花生和豆芽经CdCl₂处理(ii)1,(iii)2,(iv)3,(v)4,(vi)5天,然后在25 °C下探针孵育30 min的花生和豆芽荧光成像。(c)图(a)的定量分析。(d)图(b)的定量分析。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及事后检验进行统计学显著性评估。*P<0.05;**P<0.01;***P<0.001;ns,无显著性差异

Fig.3 (a) Fluorescence imaging of exogenous CO in peanuts and bean sprouts. (i) Control group (treated with Rh-CO) of peanuts and bean sprouts. (ii)~(v) Samples pretreated with the probe for 12 h and then incubated with different concentrations of CORM-3 at 25 °C for 30 min: (ii) 50, (iii) 100, (iv) 200, (v) 300 μmol/L, in peanuts and bean sprouts. (b) Fluorescence imaging of endogenous CO in peanuts and bean sprouts. (i) Control group (treated with Rh-CO) of peanuts and bean sprouts; peanut and bean sprout samples treated with CdCl₂ for (ii) 1, (iii) 2, (iv) 3, (v) 4, (vi) 5 d, followed by incubation with the probe at 25 °C for 30 min. (c) Quantitative analysis of mean fluorescence intensity shown in (a). (d) Quantitative analysis of mean fluorescence intensity shown in (b). Statistical significance was assessed using one-way ANOVA followed by post-hoc tests. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; ns, not significant

物应用。在RAW 264.7巨噬细胞中,仅用探针测试液孵育的细胞显示微弱荧光。当负载探针的细胞加入CORM-3(0.3 mmol/L)暴露于外源性CO时,观察到红色发射显著增强。为检测内源性产生的CO,巨噬细胞在孵育探针前用脂多糖(LPS)刺激,该处理导致强烈的细胞内荧光。使用Mito-Tracker®Green FM进行的共定位研究表明,Rh-CO的红色信号与线粒体绿色标记物广泛重叠,皮尔逊系数为0.9。这表明,Rh-CO特异性定位于线粒体,并可监测炎症细胞内源性CO的产生,为研究炎症过程中CO介导的信号传导提供了工具(图4(a)、(b))。

3.5 动物模型中CO的测定

受Rh-CO在体外一氧化碳检测中卓越性能的启发,研究人员进一步以活体裸鼠为动物模型,通过荧光成像探索了其在体内CO检测中的应用。在

空白小鼠和只注射探针测试液小鼠腹腔未观察到明显信号。然而,在腹腔皮下注射CORM-3随后给予探针测试液后,小鼠腹腔的荧光信号随时间逐渐增强,并在60 min后达到最大值(图5(a)、(c))。

接着,我们评估了该探针在裸鼠细菌性肺炎模型中实时监测CO波动及评估治疗效果的能力。我们选用未处理裸鼠作为对照组,实验组通过每日鼻腔滴注LPS(0.1 mg/mL,0.1 mL),持续14天,建立裸鼠细菌性肺炎模型,肺炎小鼠肺部区域出现明亮荧光并持续增强。相比之下,心脏、肝脏、脾脏和肾脏器官中仅检测到微弱荧光,表明内源性CO主要在肺组织中产生。然而,在肺炎治疗小鼠模型中,用地塞米松(DEX)治疗康复的细菌性肺炎小鼠的器官用探针测试液孵育后,观察到肺炎小鼠肺组织中的荧光信号显著减弱,表明抗炎治疗成功抑制了体内CO的产生水平。探

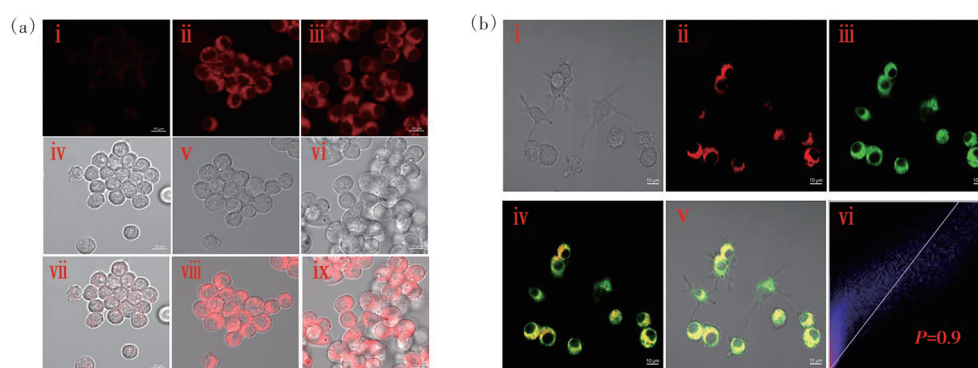


图4 (a)RAW 264.7细胞中外源性和内源性CO的荧光成像:(i)Rh-CO孵育15 min;(ii)CORM-3预处理30 min,然后用探针处理15 min;(iii)LPS预刺激6 h,然后用探针处理15 min;(iv)~(v)对应于(i)~(iii)的明场图像;(vii)~(ix)荧光图像与明场图像的叠加。(b)RAW 264.7细胞中进行内源性CO与MitoTracker@Green FM的共定位荧光成像:(i)明场图像;(ii)LPS刺激6 h,然后用探针处理15 min;(iii)MitoTracker@Green FM孵育15 min;(iv)为(ii)和(iii)的合并荧光图像;(v)为(ii)和(iii)的合并明场图像;(vi)强度散点图。比例尺=10 μ m

Fig.4 (a)Fluorescence imaging of exogenous and endogenous CO in RAW 264.7 cells. (i) Incubation with Rh-CO for 15 min. (ii) Pretreatment with CORM-3 for 30 min, followed by probe treatment for 15 min. (iii) Prestimulation with LPS for 6 h, followed by probe treatment for 15 min. (iv)~(v) Bright-field images corresponding to (i)~(iii). (vii)~(ix) Merged fluorescence and bright-field images. (b) Co-localization fluorescence imaging of endogenous CO and MitoTracker@Green FM in RAW 264.7 cells. (i) Bright-field image. (ii) Stimulation with LPS for 6 h, followed by probe treatment for 15 min. (iii) Incubation with MitoTracker@Green FM for 15 min. (iv) Merged fluorescence image of (ii) and (iii). (v) Merged bright-field image of (ii) and (iii). (vi) Intensity scatter plot. Scale bar=10 μ m

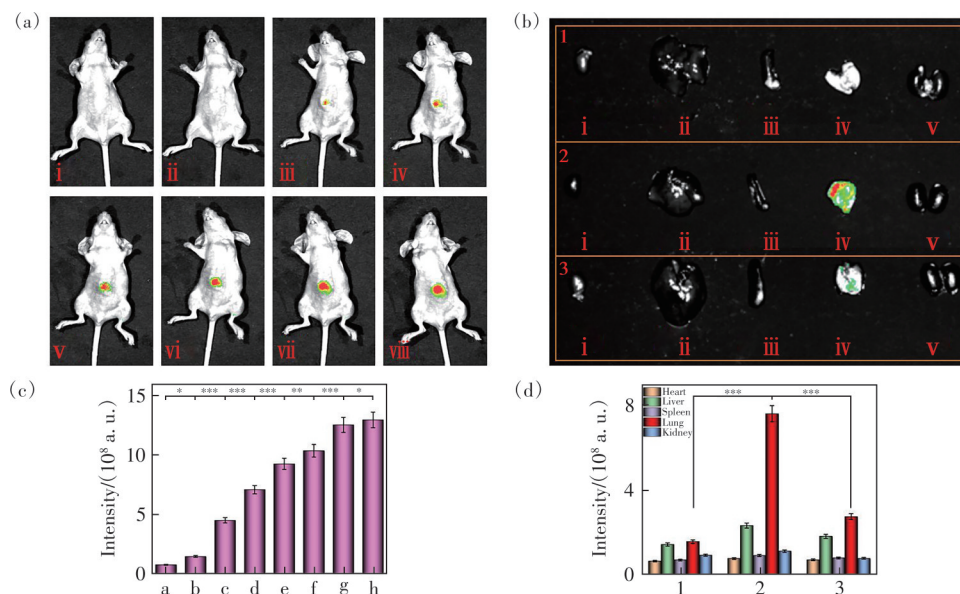


图5 (a)小鼠体内外源性CO的荧光成像:(i)对照组;(ii)小鼠腹腔注射Rh-CO溶液,原位注射CORM-3(300 μ mol/L),然后在(iii)10 min、(iv)20 min、(v)30 min、(vi)40 min、(vii)50 min和(viii)60 min时记录成像图像。(b)小鼠肺炎模型荧光成像:(1)对照组:正常裸鼠五脏,(2)肺炎小鼠五脏,(3)治疗后小鼠五脏:(i)心脏,(ii)肝脏,(iii)脾脏,(iv)肺,(v)肾脏。(c)~(d)(a)~(b)的柱状图。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及事后检验进行统计学显著性评估,*** $P<0.001$

Fig.5 (a)Fluorescence imaging of exogenous CO in mice. (i) Control group. (ii) Mouse injected intraperitoneally with Rh-CO solution, after *in situ* injection of CORM-3 (300 μ mol/L), images were recorded at (iii) 10 min, (iv) 20 min, (v) 30 min, (vi) 40 min, (vii) 50 min and (viii) 60 min. (b) Fluorescence imaging of the mouse pneumonia model. (1) Control group: visceral organs of normal nude mouse. (2) Visceral organs of pneumonic mouse. (3) Visceral organs of mouse after treatment. (i) Heart, (ii) liver, (iii) spleen, (iv) lung, (v) kidney. (c)~(d) Quantitative analysis of mean fluorescence intensities in (a)~(b). Statistical significance was assessed using one-way ANOVA followed by post-hoc tests. *** $P<0.001$

针实现实时检测 CO 水平变化来可视监测炎症动态和治疗反应的潜力,为理解细菌性肺炎的疾病进展和治疗过程提供了宝贵信息(图 5(b)、(d))。

4 总 结

本文开发了一种新型红光 CO 荧光探针(**Rh-CO**),其识别机制基于经典 Tsuji-Trost 反应,核心创新与突破在于实现了跨动物、植物双体系的通用荧光成像。该探针作为一种多功能分子工具,可同时追踪动物细菌性肺炎炎症反应与植物镉胁迫响应中的内源性 CO 动态,首次构建了适用于动植物系统的跨物种 CO 检测与成像平台,为系统阐明 CO 在不同生命体生理病理过程中的保守性功能与差异化作用提供了关键技术支撑。通过活巨噬细胞和细菌性肺炎小鼠模型中外源性和内

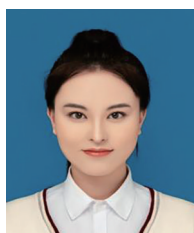
源性 CO 成像,**Rh-CO** 的实用性得到了验证。值得注意的是,**Rh-CO** 成功应用于定量检测植物样品在种子萌发、植物发育以及 Cd²⁺诱导的非生物胁迫响应过程中的 CO 水平。该研究表明,镉胁迫触发植物体内的氧化还原稳态调控以减轻镉毒性并促进生长,其中 CO 发挥着关键作用。上述结果证明了该探针在动物和植物系统中检测外源性和内源性 CO 的有效性。这些创新有望建立一个从模式植物到哺乳动物疾病系统的通用 CO 检测平台,为阐明 CO 在生理和病理过程中的双重作用提供强有力的技术支持。

本文补充文件和专家审稿意见及作者回复内容的下载地址:<http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.3724/CJL.20260111>

参 考 文 献:

- [1] KITAGISHI H, MINEGISHI S, YUMURA A, *et al.* Feedback response to selective depletion of endogenous carbon monoxide in the blood [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, 138(16): 5417-5425.
- [2] VERMA A, HIRSCH D J, GLATT C E, *et al.* Carbon monoxide: a putative neural messenger [J]. *Science*, 1993, 259(5093): 381-384.
- [3] LIU J, QI J, CHEN W, *et al.* Multi-branch fusion auxiliary learning for the detection of pneumonia from chest X-ray images [J]. *Comput. Biol. Med.*, 2022, 147: 105732.
- [4] ZILLI C G, SANTA-CRUZ D M, BALESTRASSE K B. Heme oxygenase-independent endogenous production of carbon monoxide by soybean plants subjected to salt stress [J]. *Environ. Exp. Bot.*, 2014, 102: 11-16.
- [5] CHAUHAN S, CHATTERJEE D, PEER L A, *et al.* Carbon monoxide promotes flowering in *Lemna gibba* via a nitric oxide-dependent oxidative stress pathway [J]. *Planta*, 2025, 262(2): 47.
- [6] HE H Y, HE L F. The role of carbon monoxide signaling in the responses of plants to abiotic stresses [J]. *Nitric Oxide*, 2014, 42: 40-43.
- [7] FENG L, WEI L J, LIU Y Y, *et al.* Carbon monoxide/heme oxygenase system in plant: roles in abiotic stress response and crosstalk with other signals molecules [J]. *Nitric Oxide*, 2023, 138-139: 51-63.
- [8] BAY H W, BLURTON K F, SEDLAK J M, *et al.* Electrochemical technique for the measurement of carbon monoxide [J]. *Anal. Chem.*, 1974, 46(12): 1837-1839.
- [9] ZHAO Q C, LI J, SUN S L. Development of carbon monoxide sensor based on composite electrochemical elements [J]. *Sens. Mater.*, 2024, 36(9): 3731-3742.
- [10] JEONG D H, JUNG D G, JUNG D. Solvent-dependent electrospinning performance of nanofiber-based colorimetric CO gas sensors [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2026, 450: 139220.
- [11] ESTEBAN J, ROS-LIS J V, MARTÍNEZ-MÁÑEZ R, *et al.* Sensitive and selective chromogenic sensing of carbon monoxide by using binuclear rhodium complexes [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49(29): 4934-4937.
- [12] GUILLOT J G, WEBER J P, SAVOIE J Y. Quantitative determination of carbon monoxide in blood by head-space gas chromatography [J]. *J. Anal. Toxicol.*, 1981, 5(6): 264-266.
- [13] WANG P Y, CHEN W G, WANG J X, *et al.* Hazardous gas detection by cavity-enhanced Raman spectroscopy for environmental safety monitoring [J]. *Anal. Chem.*, 2021, 93(46): 15474-15481.
- [14] LIU Y, WANG P P, SHI X L, *et al.* Evaluation of carbon monoxide fluctuation in ferroptosis-mediated osteoarthritis by a metal-free near-infrared fluorescent probe [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2026, 449: 139127.
- [15] ZHANG Y X, ZHOU C L, SUN Y, *et al.* A ratiometric fluorescent probe for the specific detection of carbon monoxide released from CORM-3 and induced by heme in living cells [J]. *Anal. Chim. Acta*, 2025, 1374: 344528.

- [16] SHEN Z Y, YANG Y X, MENG Z Y, *et al.* A novel pyrimidine-based hydrophilic fluorescent probe for detection and imaging of endogenous carbon monoxide in living organisms [J]. *J. Mol. Struct.*, 2025, 1339: 142342.
- [17] XIAO Z Y, TU B L, HUA S H, *et al.* Near-infrared fluorogenic imaging of carbon monoxide in live cells using palladium-mediated carbonylation [J]. *Chem. Commun.*, 2024, 60(11): 1420-1423.
- [18] WANG C, ZHANG Y B, GOU Q, *et al.* A novel mitochondria-targeted near-infrared fluorescent probe for *in vivo* detection of carbon monoxide during acute inflammation in mice [J]. *Microchem. J.*, 2025, 208: 112509.
- [19] ZHANG Y Y, ZHAI H S, SHANG Z Y, *et al.* Near-infrared copper ions fluorescent probe for assessing Alzheimer's disease progression and its application in real samples by constructing a portable test kit [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2025, 444(Pt 2): 138442.
- [20] 周金涛, 朱天翔, 尚主业, 等. 咪唑基近红外亚硫酸氢根荧光探针及其在水样和生物成像中的应用 [J]. *发光学报*, 2024, 45(12): 2066-2073.
- ZHOU J T, ZHU T X, SHANG Z Y, *et al.* Carbazole-based near-infrared bisulfite fluorescent probe and its applications in water sample and bioimaging [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2024, 45(12): 2066-2073. (in Chinese)
- [21] ZHANG H Y, WU M M, SUMADI F A N, *et al.* Responsive theranostic nanoprobe for ratiometric photoacoustic monitoring of hypochlorous acid-mediated inflammation in cancer photothermal therapy [J]. *Adv. Funct. Mater.*, 2025, 35(13): 2414788.
- [22] 何静, 杨心怡, 尚主业, 等. 近红外次氯酸荧光探针的构建及其类风湿性关节炎成像研究 [J]. *发光学报*, 2025, 46(7): 1333-1342.
- HE J, YANG X Y, SHANG Z Y, *et al.* Construction of near-infrared hypochlorous acid fluorescent probe and its imaging in rheumatoid arthritis [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2025, 46(7): 1333-1342. (in Chinese)
- [23] SHANG Z Y, WU M M, MENG Q T, *et al.* A near-infrared fluorescent probe for rapid and on-site detection of sulfur dioxide derivative in biological, food and environmental systems [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2024, 465: 133165.
- [24] SHANG Z Y, TIAN S Y, WANG Y, *et al.* 1,8-naphthalimide-triphenylamine-based red-emitting fluorescence probes for the detection of hydrazine in real water samples and applications in bioimaging *in vivo* [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2024, 398: 134725.
- [25] CAO Y Y, XU Y X, FANG N, *et al.* *In situ* imaging of signaling molecule carbon monoxide in plants with a fluorescent probe [J]. *Plant Physiol.*, 2023, 193(2): 1597-1604.
- [26] XU Y J, TIAN X F, AI Q, *et al.* Recent progress of Si-rhodamine-based probes in intracellular imaging of metal ions and small molecules [J]. *Dyes Pigments*, 2026, 250: 113643.
- [27] 王茜, 李媛媛, 刘刚, 等. 烯丙基荧光素分子印迹荧光传感器检测罗丹明B [J]. *发光学报*, 2024, 45(5): 837-845.
- WANG X, LI Y Y, LIU G, *et al.* Allyl fluorescein molecularly imprinted fluorescence sensor for rhodamine B [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2024, 45(5): 837-845. (in Chinese)
- [28] DENG F, ZHANG E M, XU Z W, *et al.* From oxygen to sulfur: rhodamine hydrazide probes for peroxynitrite detection from the perspective of theoretical calculation [J]. *J. Fluoresc.*, 2026, 36(2): 1745-1754.
- [29] KURONUMA Y, WATANABE R, HIRUTA Y. The latest developments of near-infrared fluorescent probes from NIR-I to NIR-II for bioimaging [J]. *Anal. Sci.*, 2025, 41(6): 737-757.
- [30] KÖRBER M, ATTIA D, KOHLBAUER-MASSON E, *et al.* A "turn-on" chemodosimeter for detection of Cu²⁺ in living cells [J]. *Dalton Trans*, 2025, 54(48): 17880-17887.
- [31] JI L G, FU A X, LIU C X, *et al.* A novel lysosomal targeted near-infrared probe for ratio detection of carbon monoxide in cells and *in vivo* [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2024, 311: 123987.
- [32] LI W X, LI R, CHEN R, *et al.* Activatable fluorescent-photoacoustic integrated probes with deep tissue penetration for pathological diagnosis and therapeutic evaluation of acute inflammation in mice [J]. *Anal. Chem.*, 2022, 94(24): 7996-8004.
- [33] ZHU B T, XING X J, KIM J, *et al.* Endogenous CO imaging in bacterial pneumonia with a NIR fluorescent probe [J]. *Biomaterials*, 2024, 304: 122419.



翟鹤书(1988-),女,辽宁辽阳人,博士研究生,2014年于吉林师范大学获得硕士学位,主要从事生物及医用新材料方面的应用基础研究。

E-mail: zhaihs1008@163.com



孟庆涛(1981-),男,山东曲阜人,博士,教授,博士生导师,2011年于大连理工大学获得博士学位,主要从事有机智能检测与诊断材料领域的应用基础研究。

E-mail: qtmeng@ustl.edu.cn