

文章编号: 1000-7032(XXXX)XX-0001-11

氧杂蒽基近红外一氧化碳荧光探针的构建及其 动物炎症与植物镉胁迫成像研究

翟鹤书¹, 朱世海³, 张依梦¹, 尚主业¹, 杨林林², 孟庆涛^{1*}

(1. 辽宁科技大学 化学工程学院, 辽宁 鞍山 114051;

2. 河南中医药大学法学院新乡司法鉴定科学证据重点实验室;

3. 辽宁科技大学 理学院, 辽宁 鞍山 114051)

摘要: 一氧化碳(CO)是介导炎症、植物代谢及重金属胁迫应答的内源气体信号分子,但其瞬时动态变化难以精准捕捉。针对现有CO荧光探针响应迟缓、高水相体系兼容性差等不足,本文构建了基于氧杂蒽母核的近红外荧光探针(JBX-CO)。探针以氯甲酸烯丙酯为识别位点,依靠Pd⁰介导Tsuij-Trost脱保护反应实现CO特异性荧光开启。该探针响应速度优异:溶液检测45 s,小鼠活体成像仅需5 min,发射波长646 nm,检出限低至0.203 μ M;检测体系含水比例达97%,有效降低了有机溶剂对动植物活体样本的刺激,适配高含水植物组织与早期急性炎症模型。得益于高刚性共轭结构,探针本底荧光微弱、信噪比与时空分辨率优异,可实时捕捉CO瞬时释放信号。该探针可实现花生萌发过程CO示踪、小白菜幼苗内源CO可视化及脂多糖(LPS)诱导小鼠炎症模型CO原位检测。本研究可为揭示CO瞬时生理调控机制提供高性能光学检测工具。

关键词: 近红外荧光; 一氧化碳; 超快响应; 氧杂蒽骨架; 生物活体成像

中图分类号: O482.31

文献标识码: A

DOI: 10.37188/CJL.20260209

CSTR: 32170.14.CJL.20260209

Construction of a xanthene-based near-infrared carbon monoxide fluorescent probe and its imaging research on animal inflammation and plant cadmium stress

ZHAI He-shu¹, ZHU Shi-hai³, ZHANG Yi-meng¹, SHANG Zhu-ye¹,
YANG Lin-lin², MENG Qing-tao^{1*}

(1. School of Chemical Engineering, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051 China;

2. Xinxiang Key Laboratory of Forensic Science Evidence, School of Forensic Medicine, Henan Medical University;

3. School of Science, University of Science and Technology Liaoning, Anshan 114051 China)

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

Abstract: Carbon monoxide (CO) is an indispensable endogenous gaseous signaling molecule in organisms that modulates inflammatory responses, plant metabolism and responses to heavy metal stress. The accurate capture of its transient dynamic fluctuations remains a major obstacle, which restricts the research on CO biological functions. However, the existing CO fluorescent probes suffer from slow response speed and poor compatibility with high-aqueous media. In this work, we constructed a near-infrared fluorescent probe (JBX-CO) based on the xanthene derivative. JBX-CO exploits a Pd(0)-mediated Tsuij-Trost allylic cleavage reaction to elicit a robust turn-on fluorescence emission centered at 646 nm. JBX-CO completes response to CO within 45 s in aqueous solution and 5 min in mice. The limit of detection towards CO was calculated to be 0.203 μ M. JBX-CO can be used in the solution system containing 97% water, which makes it compatible with high-water-content plant tissues as well as early-stage

收稿日期: XXXX-XX-XX; 修订日期: XXXX-XX-XX

基金项目: “辽宁科技大学高能光电交叉学科团队”基金,国家自然科学基金-青年科学基金项目(22506074)

acute inflammation models. **JBX-CO** possesses weak background fluorescence, outstanding signal-to-noise ratio and excellent spatiotemporal resolution due to the near-infrared emission performance. *In vivo* fluorescence imaging results demonstrated that **JBX-CO** can trace endogenous CO during peanut germination and visualize endogenous CO in *Brassica rapa* subsp. *chinensis*. In addition, the *in situ* detection of endogenous CO in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory mouse models has also been successfully verified. This work provides a high-performance optical tool for revealing the transient physiological regulatory mechanisms of CO.

Keywords: near-infrared fluorescence; carbon monoxide; ultrafast response; xanthene skeleton; *in vivo* bioimaging

1 引 言

一氧化碳(CO)因极易与血红蛋白结合引发组织缺氧,长期被视为“沉默杀手”^[1]。但近年研究证实,CO在生物体系中具有双重功能。动植物均可通过血红素氧合酶(HOs)降解血红素产生内源性CO,作为气体信号分子参与应激调控^[2]。在哺乳动物中,CO可自由穿透细胞膜,激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC),提升cGMP含量介导血管舒张;还可调控离子通道、抑制细胞色素P450及线粒体呼吸链^[3]。血红素加氧酶-1(HO-1)/CO通路是重要的应激响应模块,在氧化应激下被激活,通过胆绿素/胆红素抗氧化循环与CO信号通路协同发挥细胞保护效应,该机制在炎症病理中尤为突出。细菌性肺炎时,病原体代谢导致肺泡CO浓度显著升高,表明CO可作为区分细菌性与病毒性肺炎的潜在标志物^[4]。

在植物中,CO信号通路兼具进化保守性与功能特异性,参与种子萌发、根系发育,并通过调控活性氧/活性氮平衡介导重金属、干旱、盐胁迫等逆境应答^[5]。植物特有的刚性细胞壁、大液泡及叶绿体增加了CO储存、转运与信号传导的复杂性,给活体原位检测带来挑战。解析CO的病理生理功能亟需高精度、高特异性的原位实时检测技术。

传统CO检测方法包括气相色谱法^[6]、电化学分析法^[7]及比色法^[8]等,普遍存在有创检测、无法实现活体实时监测等缺陷。荧光成像技术凭借高灵敏度、高时空分辨率、无创性及实时可视化优势,已成为内源CO检测的核心技术^[9]。目前CO荧光探针主要基于三种机制^[10-12]:过渡金属配合物的配体交换反应、零价钯催化的Tsuji-Trost脱保护反应(烯丙基碳酸酯为识别基团)及硝基还原为氨基的荧光点亮反应。

本文以氧杂蒽骨架为核心荧光团构建**JBX-**

CO探针,该骨架具备刚性平面结构与优异光学性能,可有效限制分子内旋转与振动,减少非辐射能量损耗,获得高荧光量子产率与光稳定性^[13,30-31]。本团队前期开发的氧杂蒽类探针DBX-CO虽具备基础检测性能,但无法实现近红外发射,且响应速率不足^[15]。本研究引入刚性久洛尼定强给电子基团和四氢萘酮环羰基强吸电子构建新型氧杂蒽衍生物,以增强推-拉电子效应和增大共轭体系,促使荧光探针的光谱显著红移^[14]。识别基团选用氯甲酸烯丙酯,

基于零价钯催化的Tsuji-Trost脱保护反应实现CO特异性荧光开启响应。久洛尼定三元并环结构立体锁定氮原子乙基侧链,抑制分子内旋转,降低本底荧光,实现高信噪比检测。探针与CO反应后通过构象预组织ICT效应得到快速恢复,溶液中45秒完成超快响应,活体成像仅需5分钟,发射波长达到近红外646 nm,荧光量子产率为0.417。凭借超快响应与超高时空分辨率,**JBX-CO**可精准捕捉急性炎症早期及植物非生物胁迫初期的CO瞬时爆发信号,在动物炎症模型与植物生长体系中具备优异应用潜力。

2 实 验

2.1 主要仪器与试剂

仪器:PR124ZH型分析天平(美国OHAUS公司);DZF-6020型真空干燥箱、DKF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器、SHZ-D(Ⅲ)型循环水式真空泵、DLSB-5100型低温冷却液体循环泵(巩义予华仪器有限责任公司);RE-52系列旋转蒸发器(上海亚来生化仪器厂);AVANCE 400 MHz型核磁共振波谱仪(瑞士Bruker公司);UV3600 plus型紫外-可见分光光度计(日本Shimadzu公司);F7100型荧光光谱仪(日本Hitachi公司);6530 Q-TOF LC/MS型质谱仪(美国Agilent公司);Leica单光子激光共聚焦显微镜(德国Leica Microsys-

tems 公司);SPECTRAL Ami小动物活体成像系统(美国 SPECTRAL Instruments Imaging 公司);WIGGENS WCI-180型CO₂恒温培养箱(北京桑翌实验仪器研究所);SW-CJ-2FD型超净工作台(上海笃特科学仪器有限公司);TD5型离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);Multiskan FC型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

试剂:4-二乙氨基苯甲醛(99%)、6-羟基-1-四氢萘酮(98%)、8-羟基久洛尼定-9-甲醛(99%)、碳酸铯(99%)、氯甲酸烯丙酯均购自上海麦克林生化科技有限公司;冰乙酸、高氯酸(70%)、浓硫酸、乙腈、石油醚、甲醇、乙酸乙酯、无水二氯甲烷、三乙胺均购自国药集团化学试剂有限公司。实验所用无水硫酸钠、饱和碳酸氢钠溶液、饱和食盐水均为实验室自制常规试剂。所有商用试剂与溶剂均为分析纯级别,实验过程中若无特殊说明,所有试剂使用前均未经过进一步纯化处理,实验用水均为去离子水。

2.2 探针JBX-CO的合成

JBX-OH的合成^[30-31]:将8-羟基久洛尼定-9-甲醛(0.261g, 1.2 mmol)溶于浓硫酸(5 mL)中,冷却至0℃,在剧烈搅拌下加入6-羟基-1-四氢萘酮(0.162g, 1.0 mmol),得到混合物,然后在氮气保护下加热至90℃,搅拌6 h。将混合物冷却至室温,小心倾入100 mL冰水中,搅拌使酸稀释并析出固体。用二氯甲烷(3×50 mL)萃取,合并有机相,依次用饱和碳酸氢钠溶液(50 mL)和饱和食盐水(50 mL)洗涤,无水硫酸钠干燥。过滤后减压旋蒸除去溶剂,粗产物通过硅胶柱层析纯化(洗脱剂:石油醚/乙酸乙酯=3:1, v/v),得到深紫色固体,产率84.8%。

JBX-CO的合成:将JBX-OH(0.5 mmol)溶于0℃预冷的无水二氯甲烷中,缓慢滴加三乙胺(90 μL)。体系在0℃条件下搅拌30 min后,向混合液中缓慢加入氯甲酸烯丙酯(0.65 mmol),随后转移至室温条件下搅拌反应过夜。反应结束后,减压蒸馏除去溶剂,所得残余物用二氯甲烷充分溶解,去离子水洗涤三次。分离出有机相,经无水硫酸钠干燥处理后,减压旋蒸脱除二氯甲烷溶剂。粗产物通过硅胶柱层析进行纯化(洗脱剂:纯二氯甲烷),最终得到紫黑色固体产物,产率80%^[16]。¹H NMR (400 MHz, Chloroform - *d*) δ 8.31 (s, 1H), 8.01 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.33 -

7.27 (m, 1H), 7.21 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.07 - 5.97 (m, 1H), 5.46 (dq, *J* = 17.1, 1.5 Hz, 1H), 5.37 (dd, *J* = 10.5, 1.3 Hz, 1H), 4.78 (dt, *J* = 5.9, 1.4 Hz, 2H), 3.65 (q, *J* = 6.0 Hz, 4H), 3.08 (t, *J* = 3.1 Hz, 6H), 2.94 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.14 (q, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.06 (q, *J* = 6.1 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform - *d*) δ 159.05, 154.58, 153.52, 153.19, 152.62, 146.36, 142.70, 130.72, 129.49, 127.99, 126.40, 124.60, 121.50, 120.72, 120.51, 120.07, 119.84, 104.87, 69.66, 51.51, 51.00, 27.64, 27.13, 24.83, 20.21, 19.47, 19.20. HR - MS (*m/z*, positive mode) for [JBX-CO+H]⁺, Calcd:428.1857, found: 428.1855。(方案S1,图S1-S3)。

2.3 溶液配制及光谱分析

配制JBX-CO探针母液:精确称取0.0107 g JBX-CO探针固体,以二甲基亚砜(DMSO)充分溶解后转移至50 mL容量瓶中定容,配制成浓度为5×10⁻⁴ mol/L的探针浓溶液,避光低温保存备用。将PdCl₂溶于DMSO溶液中配制成5×10⁻⁴ mol/L浓溶液备用。配制JBX-CO测试工作液:取1 mL JBX-CO探针浓溶液,加入2 mL氯化钯(PdCl₂)储备液,再加入稀释后的PBS缓冲溶液定容至100 mL,最终配制成含5 μM JBX-CO、10 μM PdCl₂的测试体系(20 mM PBS, pH=7.4, DMSO:PBS=3:97, v/v)。实验选用与探针激发、发射波长匹配的滤片。荧光成像条件:激发滤光片600 nm,发射滤光片650 nm。共聚焦成像条件:激发波长为561 nm,发射波长收集范围为620 - 680 nm,比例尺50 μm。所有实验每组进行三次平行实验,荧光强度值以平均值±标准差表示。

2.4 探针JBX-CO在花生种子中CO成像研究

花生种子置于900 μM CdCl₂溶液中,25℃胁迫处理0 - 8天,构建镉胁迫萌发模型。样本冲洗后与JBX-CO测试液孵育5 min,洗净成像,以未胁迫未孵育种子为空白对照。

2.5 JBX-CO在小白菜幼苗中的CO成像研究

15日龄幼苗根系分别置于0 - 900 μM CdCl₂溶液胁迫1天,冲洗后与JBX-CO测试液孵育12 h,洗净采集荧光图像与表型,无镉胁迫幼苗为空白对照。

2.6 JBX-CO的细胞实验研究

细胞毒性:人脐静脉内皮细胞 HUVEC 细胞

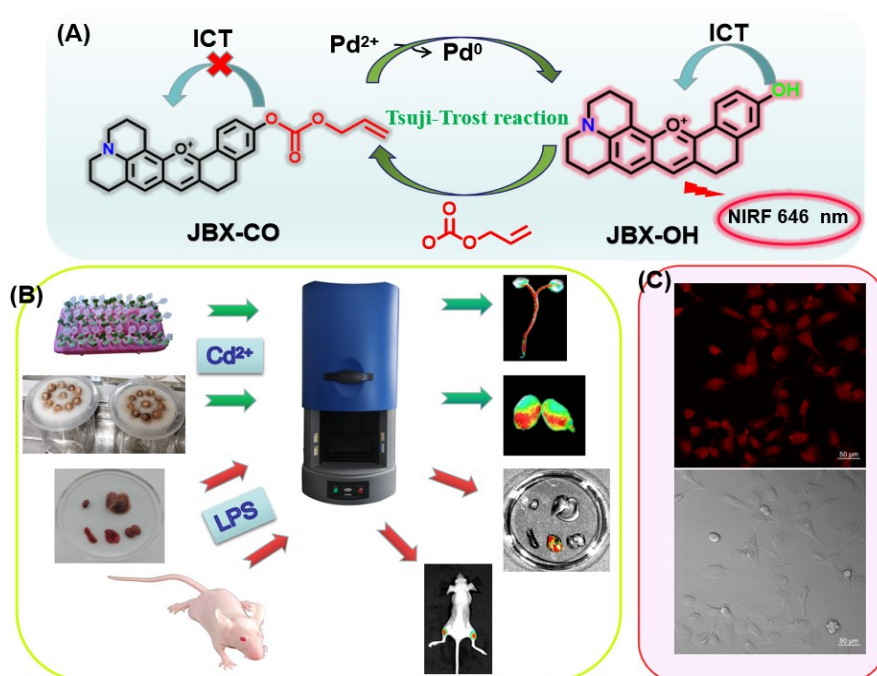


图1 (A)探针JBX-CO对CO的响应机制;(B)JBX-CO监测植物模型在重金属污染环境及动物炎症反应中释放CO;(C)JBX-CO在细胞中监测CO。

Fig. 1 (A) Response mechanism of JBX-CO probe toward CO; (B) JBX-CO for monitoring CO release in plant models under heavy metal stress and animal inflammatory responses; (C) Intracellular CO monitoring by JBX-CO probe

接种96孔板,贴壁后加入不同浓度JBX-CO与PdCl₂混合液(1:2,探针终浓度0-40 μM),37℃、5% CO₂培养24 h,加MTS试剂孵育2 h,检测490 nm吸光度,计算相对存活率。共聚焦成像:HUVEC细胞分组处理:对照组(5 μM JBX-CO, 2 min);基础组(JBX-CO工作液, 2 min);外源性CO组(40 μM 三羰基氯(甘氨酸)合钌(II) CORM-3预处理30 min,再孵育探针2 min);内源性CO组(0.1 mg/mL LPS刺激6 h,再孵育探针2 min)。激发波长561 nm,发射收集620-680 nm。

2.7 JBX-CO在动物活体中的CO成像研究

外源性CO时间依赖性:5周龄雌性裸鼠双侧后腿皮下注射50 μL JBX-CO测试液,右腿注射40 μM CORM-3,左腿注射PBS,于0-350 s采集荧光图像,扣除背景统计相对荧光强度。外源性CO浓度依赖性:裸鼠腹腔注射0-50 μM CORM-3,再注射50 μL JBX-CO测试液,设空白对照与10 μM PdCl₂对照,孵育后采集腹部荧光图像。炎症模型:后腿局部注射LPS(2 mg/mL, 50 μL)构建局部炎症模型,造模后3、6、12、24 h原位注射JBX-CO测试液,孵育5 min成像,设空白与单纯探针对照。造模24 h后右腿注射地塞米松(DEX: 0.5 mM, 30 μL),左腿注射PBS,治疗后0、24、48 h

及1周原位孵育探针5 min成像。细菌性肺炎模型:鼻腔滴注LPS(0.1 mg/mL, 100 μL)构建模型,造模5、10、15天解剖取心、肝、脾、肺、肾,JBX-CO孵育5 min成像,设空白组、PdCl₂对照组与探针组。15天模型小鼠DEX连续干预后取器官成像检测。

3 结果与讨论

3.1 JBX-CO对CO的识别机制研究

高分辨质谱(HRMS)为探针JBX-CO的响应机理提供了直接证据。纯探针的HRMS谱图(图S3)中出现质子化分子离子峰([JBX-CO+H]⁺, 实测m/z 428.1855,理论值428.1857),确认了探针结构。引入CO反应后,谱图(图S4)在m/z 344.1645处出现新强峰,对应产物质子化分子离子峰([JBX-OH+H]⁺, 实测m/z 344.1645,理论值344.1646),证实产物为JBX-OH。该传感机制进一步经紫外-可见吸收光谱和荧光光谱佐证:反应后体系在605 nm处出现特征吸收峰、646 nm处出现荧光发射峰,与JBX-OH光谱特征一致(图S5),从而证明探针与CO反应生成JBX-OH,为所提机理提供了坚实证据。

3.2 探针JBX-CO对CO的光谱响应

本实验采用优化后的标准测试体系(5 μM JBX-CO + 10 μM PdCl₂, 20 mM PBS, pH 7.4, 含3% DMSO)探究探针的光学传感性能。紫外-可见吸收滴定结果表明,JBX-CO在566 nm处具有特征主吸收峰,随着外源CO供体CORM-3浓度梯度增加(0–40 μM),体系在605 nm处逐渐出现新生吸收峰并持续升高,光谱整体显著红移,当CORM-3浓度达到40 μM 时吸收变化趋于饱和,且605 nm处吸光度随CO浓度呈现梯度递增规律(图2A)。荧光滴定测试结果与紫外光谱规律一致,JBX-CO在646 nm处本底荧光微弱,伴随CORM-3浓度升高荧光信号持续增强,40 μM CORM-3可使探针荧光增强约12.9倍并达到响应饱和(图2D)。为验证探针特异性,系统考察了多种生物及环境共存干扰物质对检测体系的影响,

包括常见阴离子、重金属离子、生物硫醇、活性氧及炎症相关分子等30余种分析物,紫外吸收与荧光光谱结果均表明,仅CO可诱导探针产生显著的光谱及荧光信号变化,其余干扰物均无法引发明显响应(图2B,E)。且共存干扰体系下的竞争实验进一步证明,共存底物不会抑制或干扰CO诱导的荧光开启信号,证实探针具备优异的抗干扰能力与识别专一性(图2C)。pH适应性实验表明,JBX-CO在弱酸性至中性环境中本底荧光稳定,pH为5探针识别有响应,pH为6的时候荧光变化开始趋向明显,大于6之后荧光识别后变化显著,在生理适配的中性至弱碱性区间(pH 7–10)可实现最优的CO荧光响应,其中生理pH区间内探针本底荧光极低,荧光响应倍数最为优异(图S6A)。动力学测试显示,JBX-CO与CO反应可在45 s内快速达到荧光平台期,遵循准一级动力学

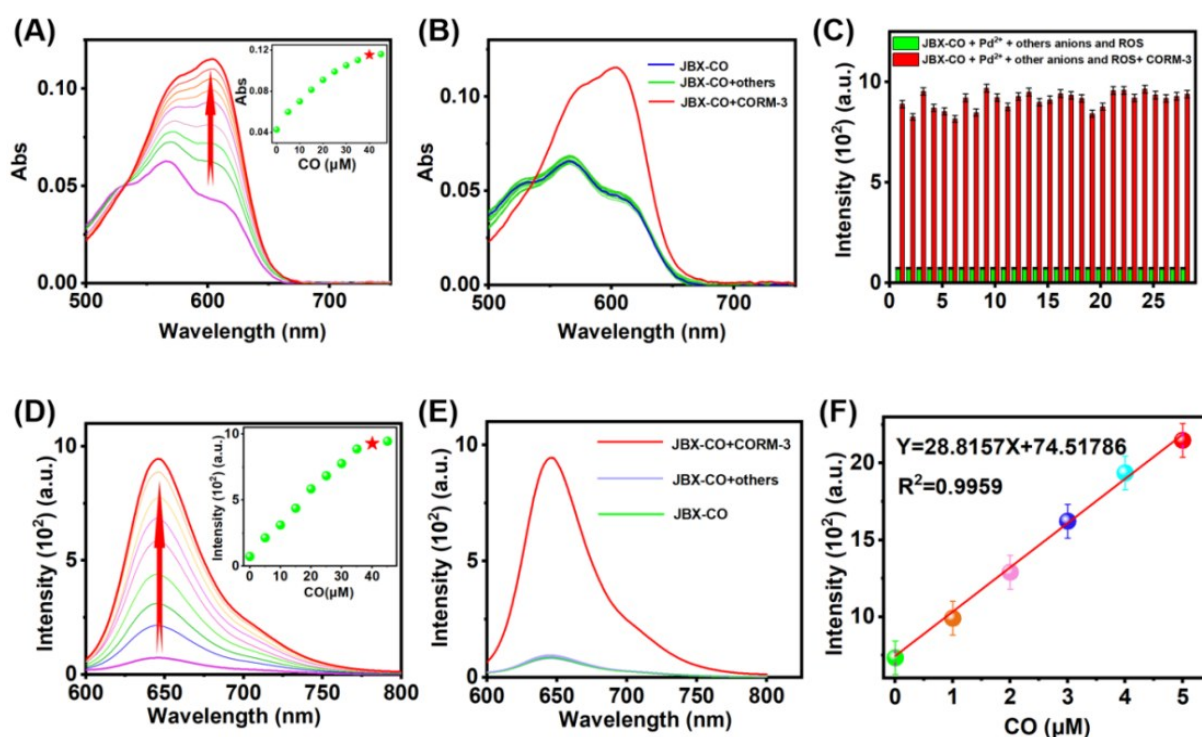


图2 (A) JBX-CO对梯度浓度CORM-3(0–40 μM)的紫外吸收滴定光谱,插图为605 nm处吸光度变化;(B) JBX-CO对多种共存分析物的紫外吸收选择性;(C)不同干扰物共存下JBX-CO识别CO的荧光竞争响应;(D) JBX-CO对梯度浓度CORM-3(0–40 μM)的荧光发射滴定光谱,插图为646 nm处荧光强度变化;(E) JBX-CO对多种共存分析物的荧光发射选择性;(F) JBX-CO荧光强度与CO浓度的线性拟合及检测限分析。实验条件:20 mM PBS(pH 7.4, DMSO:PBS=3:97, v/v)。Fig. 2 (A) UV-vis absorption titration spectra of JBX-CO toward gradient CORM-3 (0–40 μM). Inset: absorbance at 605 nm vs. concentration; (B) UV-vis absorption selectivity of JBX-CO toward various analytes; (C) Fluorescence competition response of JBX-CO toward CO with coexisting interferents; (D) Fluorescence emission titration spectra of JBX-CO toward gradient CORM-3 (0–40 μM). Inset: fluorescence intensity at 646 nm vs. concentration; (E) Fluorescence emission selectivity of JBX-CO toward various analytes; (F) Linear calibration curve and detection limit of JBX-CO. Experimental conditions: 20 mM PBS (pH 7.4, DMSO:PBS = 3:97, v/v), λ_{ex} = 605 nm, λ_{em} = 646 nm.

规律,速率常数为 0.072 s^{-1} ,半衰期仅 9.63 s ,可有效捕捉生物体系中 CO 的瞬时释放信号(图 S6B)。同时,JBX-CO 在 PBS 缓冲体系中可稳定储存 36 h 以上,光学稳定性良好(图 S6C)定量分析结果显示,探针荧光强度与 CO 浓度在 $0 - 5\text{ }\mu\text{M}$ 范围内呈现良好的线性关系($R^2=0.9959$),连续测定 15 份空白探针溶液荧光信号,计算空白信号标准偏差 σ ,结合拟合曲线斜率 $k=28.8157$,依据检出限公式 $\text{LOD}=3\sigma/k$ 计算,得到探针对 CO 检出限低至 $0.203\text{ }\mu\text{M}$ (图 2F)。综上,JBX-CO 凭借响应速度快、特异性强、抗干扰能力优异、稳定性好、检测灵敏度高的优势,完全满足复杂生物体系中内源性、外源性 CO 的精准定量与动态实时监测需求。

3.3 植物模型中 CO 的测定

本研究进一步将该探针应用于小白菜幼苗内源性 CO 的动态监测,以镉离子(Cd^{2+})为胁迫因子,探究重金属胁迫诱导的内源 CO 生成规律。如图 3A 所示,空白对照组(a)幼苗几乎无荧光信号;将小白菜幼苗根系分别置于不同浓度 CdCl_2 ($0 - 900\text{ }\mu\text{M}$)胁迫处理 1 天,再与 JBX-CO 测试液于 25°C 孵育 12 h 后,荧光信号呈现明显的浓度依赖性。在低浓度 Cd^{2+} ($100 - 300\text{ }\mu\text{M}$)处理下,幼苗根部及叶片仅出现微弱荧光;当 Cd^{2+} 浓度升至 $400 - 600\text{ }\mu\text{M}$ 时,叶片组织开始出现较明显的点状荧光,根尖区域荧光亦有所增强;当浓度达 $700 - 900\text{ }\mu\text{M}$ 时,叶片荧光信号显著增强,且主要集中在叶肉细胞和叶脉周围,而根部和胚轴的荧光相对较弱。

图 3B 自然光明场显示,各镉处理组幼苗叶片实验周期内无明显萎蔫、坏死,说明该镉浓度梯度在 1 天胁迫周期内未造成肉眼可见的幼苗损伤,常规观测手段无法判定镉胁迫发生,荧光探针可实现早期、可视化胁迫检测,具备显著优势。图 3C 的平均荧光强度定量分析证实,荧光强度与 Cd^{2+} 浓度呈正相关。图 3D 为小白菜在镉溶液中的诱导照片,记录了幼苗根尖浸没于不同浓度 CdCl_2 溶液中的实际状态。综合以上结果, Cd^{2+} 胁迫可显著诱导小白菜幼苗内源性 CO 的大量生成,且 CO 优先在叶片组织中合成与积累,这与外源性 CO 主要分布于根系的特征形成鲜明对比,提示内源 CO 作为叶片响应重金属胁迫的信号分子或代谢产物发挥重要作用。我们进一步研究花生早期受镉胁迫的 CO 荧光成像。如图 4,处理前 2 天,荧光主要集中在子叶。这是因为子叶是花生种子储存养分的地方,镉离子最先在这里积累,从而诱导 CO 生成。到第 4 到第 6 天,荧光慢慢向胚芽和下胚轴扩散,这暗示 CO 可能作为信号分子,把镉胁迫的信息传递到其他部位。处理到第 8 天左右,胚根也出现了明显的荧光,说明胚根既是镉直接伤害的目标,也可能开始自己合成 CO。从生理功能上看,萌发初期镉诱导产生的 CO 有助于清除活性氧,起到抗氧化信号的作用,随着胁迫时间延长,CO 浓度越来越高,同时它从子叶往胚根和胚芽移动的路径,正好与种子萌发时营养物质运输的方向以及极性生长的趋势一致。上述 CO 在花生种子不同组织

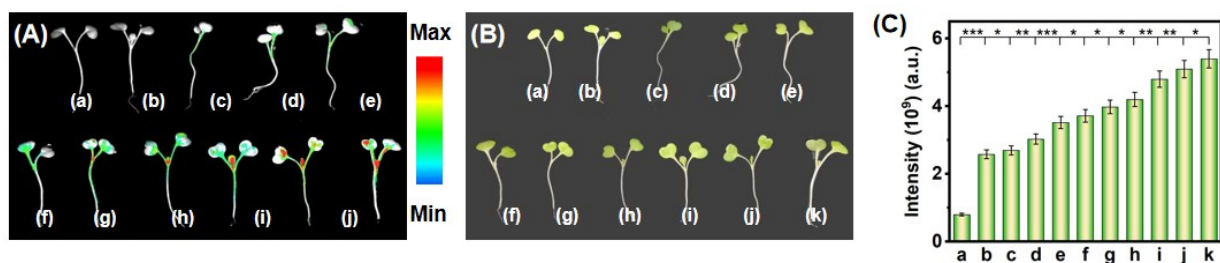


图 3(A) 镉离子胁迫下小白菜幼苗内源 CO 荧光成像:(a)空白对照组;(b-j)将小白菜幼苗根系置于 $0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900\text{ }\mu\text{M}$ CdCl_2 分别胁迫处理 1 天,再加入 JBX-CO 测试液于 25°C 条件下孵育 12 h;(B)为(A)对应的自然光明场图像;(C)对应(A)荧光图像的平均荧光强度定量分析。采用单因素方差分析(ANOVA)进行多重比较统计检验。

Fig 3 (A) Fluorescence imaging of endogenous CO in *Brassica rapa* subsp. *chinensis* under cadmium ion stress: (a) control group; (b-j) *Brassica rapa* subsp. *chinensis* roots were exposed to $0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900\text{ }\mu\text{M}$ CdCl_2 for 1 day, respectively, and then incubated with JBX-CO test solution at 25°C for 12 h. (B) Corresponding bright-field images under natural light for (A). (C) Quantitative analysis of the mean fluorescence intensity corresponding to the fluorescence images in (A). One-way ANOVA was used for multiple comparison statistical tests. Data analyzed by one-way ANOVA with multiple comparisons

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. $\lambda_{\text{ex}} = 600\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650\text{ nm}$

间的差异化迁移分布存在明确内在机理:镉胁迫诱导种子血红素氧合酶(HO)激活并催化内源CO生成;CO为脂溶性小分子,能够自由穿透细胞膜并经由胞间连丝沿浓度梯度在子叶、胚轴、胚根间

扩散。后续借助HO-1抑制剂ZnPP、CO清除剂血红素(Hb)开展对照实验(结果见图S10),进一步证实植物检测到的荧光信号源自镉胁迫下HO-1通路生成的内源CO^[15]。

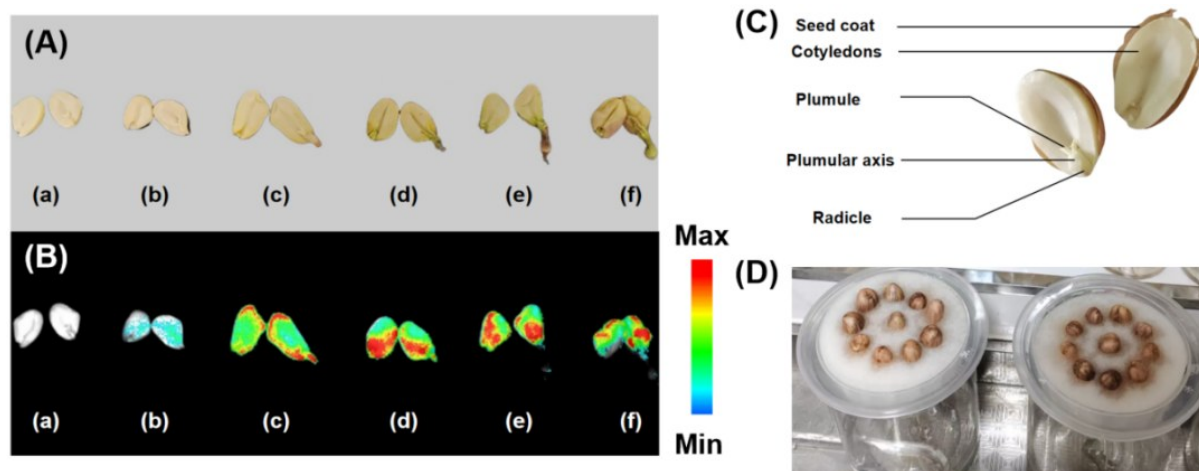


图4(A) 不同天数下花生种子早期萌发过程中内源性CO的荧光成像。(a)空白对照组样品。花生种子用900 μM CdCl_2 分别处理(b)0天、(c)2天、(d)4天、(e)6天和(f)8天,然后在培养箱中于25 $^\circ\text{C}$ 下继续与JBX-CO测试液孵育5 min;(B)与(A)对应的花生种子自然光明场图像;(C)花生种子结构示意图。(D)为花生受镉胁迫培养图。

Fig 4 (A) Fluorescence imaging of endogenous CO in peanut seeds during early germination at different days. (a) Blank sample as control group. Peanut seeds were treated with 900 μM CdCl_2 for (b) 0 days, (c) 2 days, (d) 4 days, (e) 6 days and (f) 8 days, respectively, and then incubated with JBX-CO test solution for 5 min at 25 $^\circ\text{C}$ in an incubator. (B) Bright-field images of peanut seeds under natural light corresponding to (A). (C) Schematic diagram of peanut seed structure. (D) Photographs of peanut seeds under cadmium stress. $\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$

3.4 JBX-CO在细胞中CO的测定

为探究JBX-CO的生物相容性与活细胞CO原位检测性能,选取对化学刺激敏感、可模拟血管生理微环境的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)开展细胞实验^[17-19]。采用MTS法评价探针生物相容性,将HUVEC细胞暴露于不同浓度、比例为1:2的JBX-CO与 PdCl_2 混合体系中培养24 h。结果显示,实验工作浓度(5 μM JBX-CO + 10 μM PdCl_2)下细胞存活率可达93%以上;10 μM 、20 μM 探针浓度下细胞存活率分别高于90%、85%;即使最高浓度40 μM 条件下,细胞存活率仍维持在79%以上(图S7)。证明JBX-CO对血管内皮细胞毒性极低,生物相容性良好,适用于活细胞荧光检测。进一步以HUVEC构建炎症细胞模型,探究探针的胞内CO成像能力。炎症刺激可诱导HUVEC高表达HO-1并生成内源性CO,能够真实模拟血管炎症微环境的CO动态变化。细胞成像实验结果表明,单纯探针孵育组荧光背景极低,有效降低了检测干扰。JBX-CO测试液(5 μM JBX-CO + 10 μM PdCl_2)有效排除了 PdCl_2 对实验结果

的干扰。经CORM-3(40 μM)处理引入外源性CO后,细胞荧光显著增强;以0.1 mg/mL LPS刺激细胞6 h诱导内源性CO生成后,细胞荧光同样明显上调,说明JBX-CO可灵敏识别活细胞内外源性与炎症诱导的内源性CO(图5)。综上,JBX-CO具有低细胞毒性、低本底荧光、高CO识别灵敏度的优势,可有效监测血管内皮炎症过程的CO信号波动,为活体炎症模型成像及抗炎效果评价提供了可靠的细胞实验支撑。

3.5 JBX-CO活体动物成像及炎症模型应用研究

为探究JBX-CO的活体成像应用潜力,本研究以裸鼠为模型开展系列体内成像实验^[20-22]。所有活体成像数据均扣除空白组背景,以相对荧光强度统一分析,且各组成像参数保持一致。探针安全性验证结果表明,注射JBX-CO后裸鼠体重增长正常、行为无异常,生物相容性良好,适用于活体成像检测。首先开展活体外源性CO成像实验。腹腔成像结果显示,裸鼠注射JBX-CO后,腹部荧光信号随CORM-3浓度(0-50 μM)升高梯度

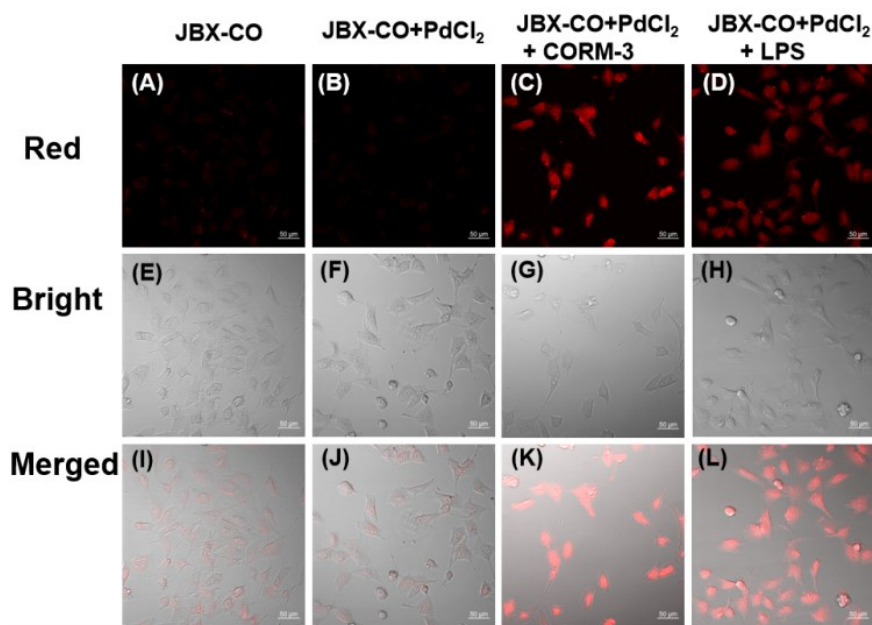


图5 HUVEC细胞中外源及内源CO的荧光成像图。(A)仅用JBX-CO($5\text{ }\mu\text{M}$)孵育2 min的细胞;(B)JBX-CO测试液($5\text{ }\mu\text{M}$ JBX-CO+ $10\text{ }\mu\text{M}$ PdCl₂)孵育2 min的细胞;(C)外源性CO成像:细胞先用CORM-3($40\text{ }\mu\text{M}$)预处理30 min,再用JBX-CO测试液孵育2 min;(D)内源性CO成像:细胞先用脂多糖(LPS, 0.1 mg/mL)刺激6 h,再与JBX-CO测试液孵育2 min;(E-H)对应的明场图像;(I-L)荧光图像与明场图像的叠加图。

Fig 5 Fluorescence imaging of exogenous and endogenous CO in HUVEC cells. (A) Cells incubated with JBX-CO ($5\text{ }\mu\text{M}$) alone for 2 min; (B) Cells incubated with JBX-CO assay solution for 2 min; (C) Visualization of exogenous CO: cells pre-treated with CORM-3 ($40\text{ }\mu\text{M}$) for 30 min, then incubated with JBX-CO assay solution for 2 min; (D) Visualization of endogenous CO: cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS, 0.1 mg/mL) for 6 h, then incubated with JBX-CO assay solution for 2 min; (E-H) Corresponding bright-field images; (I-L) Overlay of fluorescence and bright-field images. Scale bar: $50\text{ }\mu\text{m}$. Excitation wavelength: 561 nm ; Emission collection range: $620 - 680\text{ nm}$.

增强, $40\text{ }\mu\text{M}$ 时荧光响应趋于饱和,呈现良好的浓度依赖性,可实现活体水平外源性CO定量检测(图S8)。腿部时序成像实验表明,局部注射CORM-3的实验组荧光随孵育时间($0-350\text{ s}$)持续增强,而PBS对照组无明显荧光变化,证实JBX-CO活体响应快速、性能稳定(图S9)。

随后依托LPS诱导的裸鼠局部炎症模型^[23-25],利用JBX-CO监测炎症进程中内源性CO的动态变化。单侧后腿LPS造模后,分别于3、6、12、24 h原位孵育探针成像,结果显示炎症部位荧光随炎症进展逐步升高,提示炎症可诱导机体持续产生内源性CO,可通过探针荧光信号直观反映炎症发展趋势。为验证探针可用于评价抗炎治疗效果,本研究引入地塞米松(DEX)开展干预实验^[23,26-27]。双侧后腿LPS预处理24 h构建稳定炎症模型,右腿给予DEX局部注射抗炎治疗、左腿PBS对照。结果表明,DEX治疗侧荧光强度随治疗时间($0、12、24、48\text{ h}$)逐步衰减,一周后荧光信号与左腿一致。与炎症缓解趋势一致,未给药对照侧始终维

持高荧光水平,组间差异显著,证明探针可通过监测内源性CO变化反馈抗炎治疗效果(图6)。

进一步构建LPS诱导的小鼠细菌性肺炎模型,探究探针在脏器炎症中的成像能力^[28-29]。分别造模5、10、15天模拟不同严重程度肺部炎症,离体脏器成像结果显示,相较于心、肝、脾、肾,肺组织荧光信号显著增强,且荧光强度随炎症时长延长逐步升高,呈现明显的组织特异性与时间依赖性,可有效追踪肺部炎症损伤进程。上述脏器信号差异源于鼻腔滴注给药方式:LPS直接刺激肺部,局部HO-1优先激活、大量产CO;其余脏器无直接刺激,HO-1表达水平低,荧光信号弱,探针表现出肺部特异性成像效果。对15天重症肺炎小鼠进行DEX抗炎治疗后,肺组织荧光信号显著回落,趋近于正常水平,与炎症症状改善一致(图7)。离体成像反映的是取样瞬间的CO信号,无法动态追踪其在活体各脏器间的转运,后续将开发更长发射波长的荧光探针,实现活体深层脏器炎症原位成像。

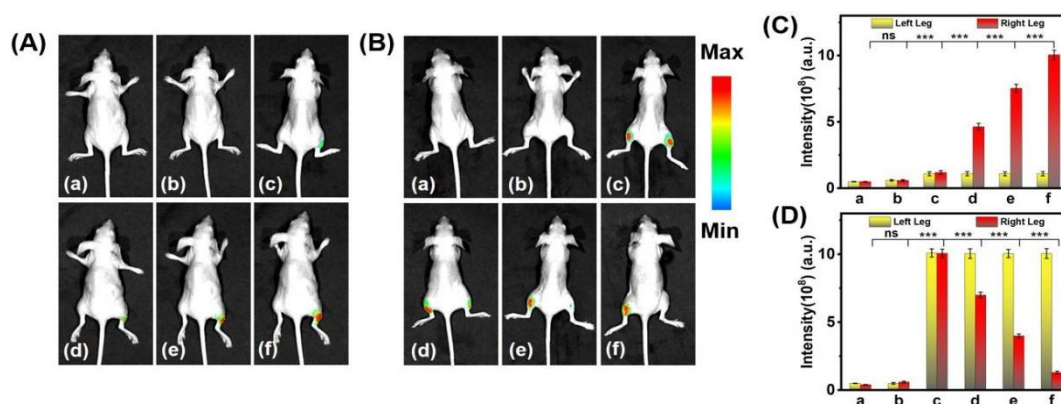


图6 **JBX-CO** 监测 LPS 诱导小鼠腿部炎症及 DEX 抗炎治疗过程中的 CO 动态成像。(A) 炎症时序成像: (a) 空白对照、(b) 单纯探针对照, 右腿注射 LPS (2 mg/mL, 50 μ L) 构建局部炎症模型, (c) 3、(d) 6、(e) 12、(f) 24 h 原位注射 **JBX-CO** 测试液孵育 5 min; (B) 抗炎治疗时序成像: (a) 空白对照、(b) 单纯探针对照, 双侧后腿 LPS 预处理 24 h, 右腿注射 DEX (0.5 mM, 30 μ L)、左腿 PBS 对照, (c) 0、(d) 24、(e) 48 h、(f) 1 周探针孵育成像; (C、D) 分别为 A、B 的荧光强度定量分析。数据采用单因素方差分析。

Fig. 6 Dynamic CO imaging of LPS-induced leg inflammation and DEX anti-inflammatory therapy monitored by **JBX-CO**. (A) Time-series inflammation imaging: (a) blank control, (b) probe-only control. Local inflammation was induced by LPS (2 mg/mL, 50 μ L) in the right hind leg. Images were acquired after in situ incubation with **JBX-CO** for 5 min at (c) 3, (d) 6, (e) 12, and (f) 24 h post-modeling. (B) Time-series treatment imaging: (a) blank control, (b) probe-only control. Both hind legs were pretreated with LPS for 24 h. The right hind leg was treated with DEX (0.5 mM, 30 μ L), and the left with PBS. Imaging was performed at (c) 0, (d) 24, (e) 48 h, and (f) 1 week post-treatment. (C, D) Quantitative fluorescence intensity for (A) and (B). Data analyzed by one-way ANOVA. *** $P < 0.001$, ns: not significant. $\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$.

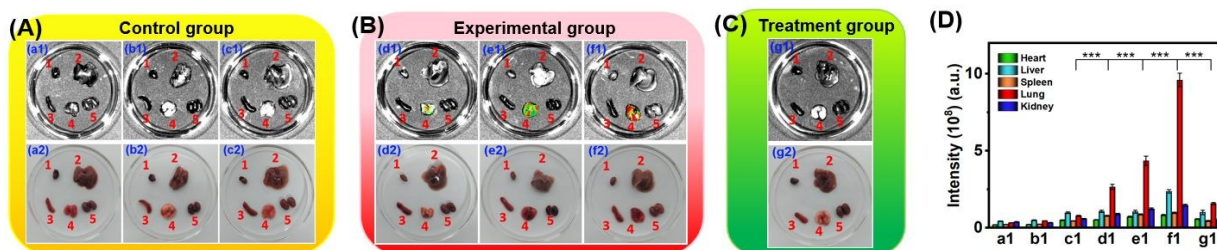


图7 细菌性肺炎模型中 CO 介导的炎症及治疗响应。(A) 空白、PdCl₂、单纯探针三组对照器官荧光成像; (B) LPS 诱导 5、10、15 天肺炎模型心、肝、脾、肺、肾荧光成像; (C) DEX 治疗后肺炎器官荧光成像。1 - 5 依次为心、肝、脾、肺、肾, a2 - g2 为对应明场图; (D) 各组器官荧光强度定量分析。数据采用单因素方差分析。

Fig. 7 CO-mediated inflammation and therapeutic response in bacterial pneumonia. (A) Ex vivo fluorescence imaging of control groups: (a1) blank, (b1) PdCl₂, and (c1) probe-only; (B) Fluorescence imaging of heart, liver, spleen, lung, and kidney from LPS-induced pneumonia at (d1) 5, (e1) 10, and (f1) 15 days; (C) (g1) Fluorescence imaging of organs after DEX treatment. 1 - 5: heart, liver, spleen, lung, and kidney; a2 - g2: corresponding bright-field images. (D) Quantitative fluorescence intensity analysis. One-way ANOVA, *** $P < 0.001$, $\lambda_{\text{ex}} = 600 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$.

4 总 结

本研究设计并构建了一种基于氧杂蒽骨架的新型近红外 CO 荧光探针 **JBX-CO**, 可精准可视化追踪动物炎症病理及植物镉胁迫生理过程中的内源性 CO 动态变化。该探针具备良好的跨物种适配性, 可穿透动物细胞膜与植物细胞壁, 搭建起“单一

探针、动植物双体系检测”的通用分析平台。依托零价钯催化的 Tsuji-Trost 脱保护机制, **JBX-CO** 特异性强、响应迅速、灵敏度高, 可在高含水体系实现低本底、高分辨率的荧光检测, 有效弥补了传统探针响应滞后、特异性弱、易损伤样本的不足。细胞与动物炎症模型实验证实, 该探针可精准捕捉 HO-1 通路介导的 CO 动态变化, 直观反映炎症程度与

抗炎治疗效果。同时,探针可有效追踪花生种子萌发、小白菜幼苗镉胁迫过程中CO的时空分布规律,证实CO参与植物重金属胁迫稳态调控。本研究突

破了传统检测无法活体原位监测的局限,为阐明CO在动物炎症、植物逆境生理中的调控机制,提供了可靠的可视化研究工具与技术支持。

参 考 文 献:

- [1] Verma A, Hirsch D J, Glatt C E, Ronnett G V, Snyder S H. Carbon monoxide: a putative neural messenger [J]. *Science*, 1993, 259: 381-384.
 - [2] Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications [J]. *Pharmacol. Rev.*, 2005, 57: 585-630.
 - [3] Motterlini R, Otterbein L E. The therapeutic potential of carbon monoxide [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2010, 9: 728-743.
 - [4] Li Y, Wang X, Yang J, Xie X, Li M, Niu J, Tong L, Tang B. Fluorescent probe based on azobenzene-cyclopalladium for the selective imaging of endogenous carbon monoxide under hypoxia conditions [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88: 11154-11159.
 - [5] 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.
 - [6] Coburn R F. The measurement of endogenous carbon monoxide production [J]. *J. Appl. Physiol.*, 2012, 112: 1949-1955.
 - [7] Park S S, Kim J, Lee Y. Improved electrochemical microsensor for the real-time simultaneous analysis of endogenous nitric oxide and carbon monoxide generation [J]. *Anal. Chem.*, 2012, 84: 1792-1796.
 - [8] Moragues M E, Esteban J, Ros-Lis J V, Martínez-Manez R, Martínez M D, Martínez M, Soto J, Sancenón F. Sensitive and selective chromogenic sensing of carbon monoxide via reversible axial CO coordination in binuclear rhodium complexes [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 15762-15772.
 - [9] Marín-Hernández C, Toscani A, Sancenón F, Wilton-Ely J D E T, Martínez-Máñez R. Chromo-fluorogenic probes for carbon monoxide detection [J]. *Chem. Commun.*, 2016, 52: 5902-5911.
 - [10] Tikum A F, Lim W, Fortibui M M, Lee S, Park S, Kim J. Palladium probe consisting of naphthalimide and ethylenediamine for selective turn-on sensing of carbon monoxide and cell imaging [J]. *Inorg. Chem.*, 2021, 60: 7108-7114.
 - [11] Zhu B, Xing X, Kim J, Rha H, Liu C, Zhang Q, Zeng L, Lan M, Kim J S. Endogenous CO imaging in bacterial pneumonia with a NIR fluorescent probe [J]. *Biomaterials*, 2024, 304: 122419.
 - [12] Dong W, Ma M, Li J, Gao D, Ma P, Song D. Ultra-large Stokes-shifted NIR fluorescent probes for the diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis via metal-free tracking of carbon monoxide [J]. *Sens. Actuators B Chem.*, 2025, 430: 137401.
 - [13] Xue L, Burgess K. Fluorescent amino- and thiopyronin dyes [J]. *Org. Lett.*, 2008, 10: 1779-1782.
 - [14] Hong J, Xia Q, Zhou E, Feng G. NIR fluorescent probe based on a modified rhodol dye with good water solubility and large Stokes shift for monitoring CO in living systems [J]. *Talanta*, 2020, 215: 120914.
 - [15] Zhai H, Shang Z, He M, Zhang Y, Zhang R, Meng Q. A xanthene-based red-emitting fluorescent probe for the detection and monitoring of carbon monoxide in bacterial pneumonia models and in plant samples [J]. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*, 2026, 360: 128051.
 - [16] Biswas B, Venkateswarulu M, Sinha S, Girdhar K, Ghosh S, Chatterjee S, Mondal P, Ghosh S. Long Range Emissive Water-soluble Fluorogenic Molecular Platform for Imaging Carbon Monoxide in Live Cells [J]. *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, 2(12): 5427-5433.
 - [17] Stucki D, Steinhausen J, Westhoff P, Krahl H, Brillhaus D, Massenber A, Weber A P M, Reichert A S, Brenneisen P, Stahl W. Endogenous carbon monoxide signaling modulates mitochondrial function and intracellular glucose utilization: impact of the heme oxygenase substrate hemin [J]. *Antioxidants*, 2020, 9: 652.
 - [18] 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)
- [19] 王晔, 朱鑫玥, 怀玉, 等. 基于香豆素的 Zn^{2+} 荧光探针构建及其应用 [J]. 发光学报, 2025, 46(1): 185-193.
WANG Y, ZHU X Y, HUAI Y, *et al.* Construction and application of Zn^{2+} fluorescent probe based on coumarin [J]. *Chin. J. Lumin.*, 2025, 46(1): 185-193. (in Chinese)
- [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] Gong S, Hong J, Zhou E, Feng G. A near-infrared fluorescent probe for imaging endogenous carbon monoxide in living systems with a large Stokes shift [J]. *Talanta*, 2019, 201: 40-45.
- [22] Feng S, Liu D, Feng W, Feng G. Allyl fluorescein ethers as promising fluorescent probes for carbon monoxide imaging in living cells [J]. *Anal. Chem.*, 2017, 89: 3754-3760.
- [23] Li W, Li R, Chen R, Ai S, Zhu H, Huang L, Lin W. 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: 7996-8004.
- [24] Mannaioni P F, Vannacci A, Masini E. Carbon monoxide: the bad and the good side of the coin, from neuronal death to anti-inflammatory activity [J]. *Inflamm. Res.*, 2005, 55: 261-273.
- [25] Ryter S W, Otterbein L E, Morse D, Choi A M K. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance [J]. *Mol. Cell. Biochem.*, 2002, 234: 249-263.
- [26] Szabo C. Gasotransmitters in cancer: from pathophysiology to experimental therapy [J]. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2016, 15: 185-203.
- [27] Jiang W L, Wang W X, Mao G J, Yan L, Du Y, Li Y, Li C Y. Construction of near-infrared and ratiometric fluorescent probe for monitoring carbon monoxide under oxidative stress in zebrafish [J]. *Anal. Chem.*, 2021, 93: 2510-2518.
- [28] Zhai H, Zhang Y, Tian D, Shang Z, Wu M, Zhang Z, Meng Q, Zhang R. A turn-on near-infrared fluorescent probe for monitoring carbon monoxide in bacterial pneumonia and cadmium ion induced abiotic stress responses in plants [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2025, 495: 139135.
- [29] Yang L, Zhou L, Yuan X, Li P, Liu T, Chen L, Ren J. Construction of robust fluorescent probe for CO detection and assessment of the efficacy of hyperbaric oxygen therapy acute CO poisoning [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2025, 484: 136759.
- [30] Wei W, Liu W, Zhang H, Li Z, Yu M. A novel near-infrared fluorescent probe for the detection of sulfur dioxide derivatives and its application in biological imaging [J]. *New J. Chem.*, 2022, 46(22): 10746-10751.
- [31] Cao C, Zhou J, Zhang X L, Zhang X, Li J S, Li H, Chen S T, Gong X Q, Wang S. A red-emitting ultrasensitive fluorescent probe for specific detection and biological visualization of cysteine in vitro and in vivo [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2024, 305: 123429.



翟鹤书(1988-),女,辽宁辽阳人,博士研究生,2023年入学辽宁科技大学化学工程与技术专业攻读博士学位,主要从事生物及医用新材料方面的应用基础研究。
E-mail: zhaihsh1008@163.com



孟庆涛(1981-),男,山东曲阜人,工学博士,教授,博士生导师。2011年毕业于大连理工大学,获工学博士学位。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