

以萘酰亚胺为基础的荧光探针PX-1检测 ONOO⁻的机制研究

李昕昱, 彭永进, 刘玉玲*

锦州医科大学智能医学学院, 辽宁 锦州

收稿日期: 2026年7月1日; 录用日期: 2026年7月22日; 发布日期: 2026年8月4日

摘要

过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)是生物体系内高活性活性氮自由基, 其在肝细胞过氧化物酶体内异常累积是四氯化碳诱导急性肝损伤早期标志性病理事件。靶向过氧化物酶体、可实现活体原位成像的双光子荧光探针是解析肝脏氧化应激通路的关键工具。唐波课题组前期已完成新型“关-开”型双光子荧光探针PX-1的合成、体外光谱性能、细胞成像与小鼠急性肝损伤活体成像完整实验表征, 证实PX-1可特异性识别过氧化物酶体内ONOO⁻并实现组织可视化。本文以量子化学计算为核心手段, 从分子轨道、电子激发、反应位点、激发态跃迁四个维度系统解析PX-1传感响应内在机理。借助Gaussian16与Multiwfn软件开展几何优化、态密度(DOS)、平均局域离子化能(ALIE)、S₀→S₁空穴-电子分布、原子贡献热图等系列理论计算。轨道能级分析表明, 未反应PX-1中1,4-苯二酚识别单元的HOMO轨道能级介于萘酰亚胺荧光团HOMO与LUMO之间, 满足光诱导电子转移(PeT)发生条件, 探针本底荧光被强效淬灭; 当PX-1与ONOO⁻发生氧化裂解反应生成PX-OH后, 富电子苯二酚片段脱除, PeT电子转移通路彻底阻断, 分子内电荷转移(ICT)效应成为激发态主导跃迁模式, 荧光信号大幅恢复。ALIE计算精准定位氧化反应发生于苯二酚羟基取代碳位点, 与实验氧化裂解规律完全匹配; 空穴-电子可视化与原子贡献定量分析直观区分PX-1与PX-OH两种分子截然不同的激发态电子转移特征, 完整阐明PeT淬灭与ICT增强协同调控荧光开关的双重响应机制。通过多肽截断模型对比计算证实, 短肽片段对荧光团与识别单元轨道能级、激发态跃迁特征干扰可忽略, 现有简化模型具备可靠代表性; 多组取代苯二酚衍生物定量计算建立识别基团HOMO能级差值-PeT淬灭效率线性关联指标, 可直接用于同类探针分子预筛选与性能预测。本理论研究从微观电子层面解释PX-1优异传感性能的分子本质, 同时建立普适性量化设计标准, 为后续萘酰亚胺类细胞器靶向ONOO⁻荧光探针分子结构优化、识别基团改造提供可量化、可预测的理论指导。

关键词

1,8-萘酰亚胺, 荧光探针, 过氧亚硝基阴离子, 量子化学计算, 响应机理

*通讯作者。

Mechanism Study of Naphthalimide-Based Fluorescent Probe PX-1 for Detecting Peroxynitrite

Xinyu Li, Yongjin Peng, Yuling Liu*

School of Intelligent Medicine, Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning

Received: July 1, 2026; accepted: July 22, 2026; published: August 4, 2026

Abstract

Peroxynitrite (ONOO^-) is a highly reactive nitrogen species in biological systems. Its abnormal accumulation in hepatic peroxisomes acts as an early pathological marker of carbon tetrachloride-induced acute liver injury. Two-photon fluorescent probes capable of peroxisome-targeted *in vivo* *in situ* imaging serve as crucial tools for deciphering hepatic oxidative stress pathways. The Tang Bo group has previously accomplished comprehensive experimental characterizations of a novel “turn-on” two-photon fluorescent probe PX-1, including synthetic preparation, *in vitro* spectroscopic performance, cellular imaging and *in vivo* imaging of acute liver injury in mice. Their results verified that PX-1 can specifically recognize peroxisomal ONOO^- and realize tissue visualization. In this work, quantum chemical calculations were adopted as the core method to systematically analyze the intrinsic sensing mechanism of PX-1 from four perspectives: molecular orbital, electronic excitation, reactive site and excited-state transition. A series of theoretical calculations, such as geometric optimization, density of states (DOS), average local ionization energy (ALIE), $S_0 \rightarrow S_1$ hole-electron distribution and atomic contribution heatmap, were performed via Gaussian16 and Multiwfn software. Orbital energy level analysis revealed that the HOMO energy level of the 1,4-benzenediol recognition unit in intact PX-1 lies between the HOMO and LUMO of the naphthalimide fluorophore, satisfying the energy matching requirement for photoinduced electron transfer (PeT) and leading to strong intrinsic fluorescence quenching of the probe. After oxidative cleavage between PX-1 and ONOO^- generates PX-OH, the electron-rich benzenediol moiety is eliminated, the PeT electron transfer channel is completely blocked, and intramolecular charge transfer (ICT) dominates excited-state transitions, resulting in drastic fluorescence recovery. ALIE calculations precisely locate the oxidation reaction at the hydroxyl-substituted carbon sites of benzenediol, which is fully consistent with the experimental oxidative cleavage rule. Visualized hole-electron distributions and quantitative atomic contribution analyses distinctly differentiate the disparate excited-state electron transfer behaviors of PX-1 and PX-OH, comprehensively elaborating the dual response mechanism synergistically regulated by PeT quenching and enhanced ICT. Comparative calculations of truncated peptide models verify that short peptide fragments exert negligible interference on the orbital energy levels of fluorophores and recognition units as well as excited-state transition characteristics, demonstrating the reliable representativeness of the simplified model adopted herein. Quantitative calculations on multiple substituted benzenediol derivatives establish a linear correlation index between the HOMO energy level difference of recognition groups and PeT quenching efficiency, which can be directly applied to pre-screening and performance prediction of analogous probe molecules. This theoretical study elucidates the molecular origin underlying the outstanding sensing performance of PX-1 at the microscopic electronic level, and meanwhile establishes universal quantitative design criteria. It provides quantifiable and predictable theoretical guidance for subsequent structural optimization and recognition group modification of naphthalimide-based organelle-targeted fluorescent probes toward ONOO^- .

Keywords

1,8-Naphthalimide, Fluorescent Probe, Peroxynitrite, Quantum Chemical Calculation, Response Mechanism

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1.1. ONOO⁻生理病理功能与肝损伤关联机制

肝脏是人体脂质代谢、外源毒物代谢的核心脏器，肝细胞内包含大量脂肪酸代谢相关亚细胞器，在四氯化碳、药物、酒精等外界刺激下极易启动脂质过氧化链式反应。脂质过氧化会持续破坏肝细胞生物膜结构，诱发细胞肿胀、坏死与局部炎症浸润，长期慢性氧化损伤可逐步发展为肝纤维化、肝硬化甚至肝细胞癌[1]-[3]。

过氧化物酶体是肝细胞内调控脂质氧化、清除内源活性小分子的关键细胞器，其内部微环境呈弱碱性(pH≈8.2)，区别于中性细胞质与酸性溶酶体。现有生化研究证实，在肝损伤病理状态下，过氧化物酶体产生活性氧(ROS)、活性氮(RNS)的总量显著超过线粒体，是肝细胞氧化应激的核心发生区域。过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)由细胞内一氧化氮(NO)与超氧阴离子自由基(O₂⁻)以扩散控制速率快速耦合生成，兼具强氧化性与硝化活性，可无差别氧化修饰膜磷脂、蛋白酶、核酸碱基，破坏细胞器膜通透性，激活内质网应激、线粒体凋亡与炎症信号通路[4]-[7]。

大量病理对照实验证明，正常肝组织内 ONOO⁻维持极低生理浓度，而急性肝损伤早期病灶区域 ONOO⁻含量显著上调，是区分正常肝组织与受损肝组织的早期生物标志物。更关键的是，现有研究推测过氧化物酶体内蓄积的 ONOO⁻是驱动肝细胞脂质过氧化损伤的核心诱因，但缺少可特异性定位过氧化物酶体、实时追踪 ONOO⁻动态变化的检测工具，无法直观建立细胞器 ONOO⁻水平与肝损伤程度的对应关系，严重制约肝脏氧化损伤病理机制的深入阐释[8]-[11]。

1.2. 荧光探针检测技术现状与现存局限性

荧光成像技术凭借无损检测、毫秒级时空分辨率、可视化示踪等优势，成为生物活性小分子原位检测的主流手段。其中双光子荧光成像采用 800 nm 近红外长波激发光源，相比传统单光子紫外/可见光激发具备三大优势：近红外光生物组织散射、吸收程度更低，组织穿透深度可达数百微米，适配完整肝脏组织活体观测；长波激发光对细胞、组织光毒性弱，可长时间动态追踪；组织自发荧光干扰微弱，成像信噪比更高，是活体脏器氧化应激检测的最优成像方案[12]-[15]。

目前国内外已报道多种用于 ONOO⁻检测的荧光探针，但普遍存在三类难以规避的缺陷：第一，绝大多数探针无细胞器靶向修饰基团，进入细胞后无差别分布于细胞质，无法区分线粒体、溶酶体、过氧化物酶体等不同亚细胞器内的 ONOO⁻信号，不能精准定位氧化应激发生位点；第二，多数探针为单光子激发型，激发光穿透能力有限，仅适用于单层贴壁细胞成像，无法开展小鼠肝脏厚组织活体检测；第三，现有双光子荧光探针多选用香豆素、BODIPY 作为发光骨架，普遍存在斯托克斯位移小、光稳定性差、易光漂白等问题，且能够适配过氧化物酶体 pH≈8.2 弱碱性微环境、特异性靶向过氧化物酶体的 ONOO⁻双光子探针报道十分稀缺。

1,8-萘酰亚胺是一类经典 D- π -A 型双光子荧光发色团, 分子骨架两端分别为共轭萘环与酰亚胺双羰基强吸电子基团, 天然具备分子内电荷转移(ICT)发光特性。该类荧光团拥有斯托克斯位移大、光化学稳定性优异、发射波长集中在绿光-黄光区间、分子结构易修饰改造等突出优势, 是构建细胞器靶向 ROS/RNS 荧光探针的理想发光母体。

在靶向单元选择上, 九肽 HLKPLQSKL 是成熟的过氧化物酶体靶向配体, 多肽序列可特异性结合过氧化物酶体膜转运蛋白 PAS8p, 被高效转运富集至过氧化物酶体内部, 几乎不滞留于其他亚细胞器。1,4-苯二酚是典型富电子芳香类氧化响应识别基团, 分子中羟基具备极高电子云密度, 可被强氧化性 ONOO⁻ 特异性氧化裂解, 依靠光诱导电子转移(PeT)效应实现荧光开关调控。将萘酰亚胺荧光骨架、九肽靶向多肽、1,4-苯二酚响应基团三者共价偶联, 即可构建靶向过氧化物酶体、特异性识别 ONOO⁻ 的“关-开”型双光子荧光探针。

唐波课题组前期基于上述分子设计思路, 成功合成探针 PX-1, 并完整完成全部实验表征工作: 体外光谱测试证实探针在 pH = 8.2 模拟过氧化物酶体缓冲液中, 与 ONOO⁻ 反应后 553 nm 荧光强度提升 300 倍, 检出限低至 6.2 nM, 对各类金属离子、ROS、RNS 干扰物均表现优异选择性; 细胞共定位实验证明 PX-1 可精准富集于 SMMC-7721 肝细胞过氧化物酶体, 皮尔森共定位系数 0.89; 双光子细胞成像可捕捉 SIN-1 诱导的胞内 ONOO⁻ 浓度波动; 活体小鼠成像直观证明 CCl₄ 急性肝损伤模型肝脏过氧化物酶体 ONOO⁻ 显著升高[16]。以上实验结果充分验证 PX-1 具备优秀的生物成像应用性能, 但仅依靠光谱与细胞成像数据, 无法从微观电子、分子轨道层面解释探针荧光开关的内在机理。因此本文依托量子化学计算手段, 对 PX-1 及其氧化产物 PX-OH 开展系统理论模拟, 完整揭示探针识别 ONOO⁻ 的微观传感机制, 为后续新型探针分子优化设计提供理论支撑。图 1 为 PX-1 识别 ONOO⁻ 的分子反应示意图。

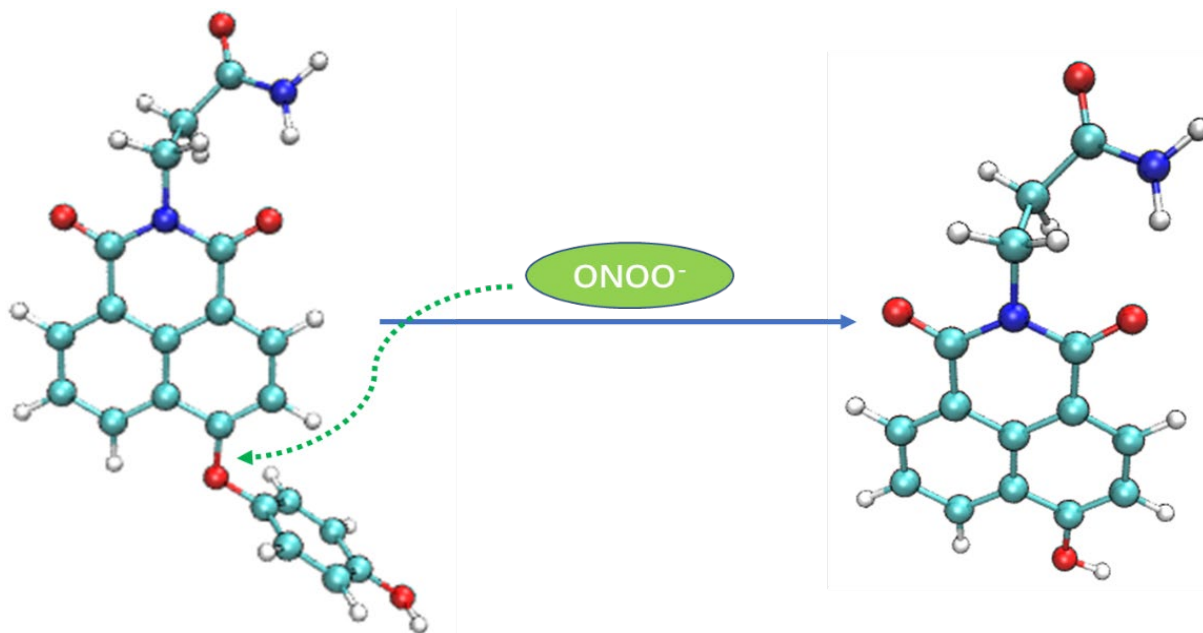


Figure 1. Schematic diagram of PX-1 probe for the detection of ONOO⁻
图 1. 探针 PX-1 检测 ONOO⁻ 离子示意图

2. 量子化学计算方法

本研究全部量子化学模拟计算均采用 Gaussian16 软件包完成, 分为分子几何优化、垂直激发计算两大核心步骤, 后处理分析依托 Multiwfn 3.8 程序实现电子结构可视化与定量数据提取。1、几何结构优化:

分别对未反应探针 PX-1、PX-1 与 ONOO⁻氧化裂解产物 PX-OH 分子进行基态几何全优化, 密度泛函选用应用广泛且精度均衡的 B3LYP 泛函, 基组设置为 6-311 G(d,p), 优化过程无对称性限制, 收敛标准选用程序默认严苛阈值, 确保分子骨架、侧链、识别基团均达到能量最低稳定构型。2、垂直激发计算: 基于优化完成的稳定基态结构, 采用 TD-DFT 方法计算分子垂直激发过程, 获取 S₀ 基态至 S₁ 第一激发态的跃迁能量、振子强度、轨道跃迁组成等关键参数, 为后续空穴-电子分析提供激发态电子数据。3、Multiwfn 后处理分析: 1) 态密度(DOS)分析: 分别绘制 PX-1、PX-OH 分子轨道态密度分布图, 拆分萘酰亚胺荧光团、1,4-苯二酚、酰胺连接片段各轨道能级贡献, 对比两种分子 HOMO、LUMO 轨道能级差, 判断 PeT 效应发生的轨道能级条件; 2) 平均局部离子化能(ALIE)计算: 绘制 PX-1 分子 ALIE 等值面分布图, 识别分子内电子云密度最高、最易被氧化剂进攻的活性位点, 预测 ONOO⁻氧化裂解反应发生位置; 3) 空穴-电子分布可视化: 提取 S₀→S₁ 激发跃迁过程中空穴、电子空间分布等值面, 区分两种分子激发态电荷转移模式, 判断 PeT 与 ICT 特征; 4) 原子贡献热图定量分析: 计算分子各原子、各结构片段对 S₀→S₁ 激发跃迁中空穴、电子的贡献占比, 量化苯二酚与萘酰亚胺骨架在激发过程中的权重, 定量佐证电子转移机理。

为建立可通用的萘酰亚胺探针 PeT 效应量化设计指标, 以 1,4-苯二酚为母核, 引入 5 种不同电子效应取代基修饰识别单元, 构建系列对照分子(统一对接萘酰亚胺荧光骨架, 截断多肽链消除靶向单元干扰), 分子编号与取代基设计如下:

M1: 无取代 1,4-苯二酚(原始 PX-1 识别基团);

M2: 给电子取代基-CH₃(甲基);

M3: 强给电子取代基-OCH₃(甲氧基);

M4: 弱吸电子取代基-F(氟原子);

M5: 强吸电子取代基-NO₂(硝基)。

对全部 M1~M5 分子执行几何优化、轨道能级计算、TD-DFT 激发态计算, 提取定量参数:

1) 各识别基团片段独立 HOMO 能级 E_{HOMO} (Rec); 萘酰亚胺荧光团 HOMO (E_{HOMO} (Flu)), LUMO (E_{LUMO} (Flu));

2) 能级差值 $\Delta E = E_{\text{HOMO}}(\text{Rec}) - E_{\text{HOMO}}(\text{Flu})$, 表征识别基团相对荧光团的能级抬升幅度;

3) S₀→S₁ 激发中空穴在识别基团的贡献占比 R_{hole}, 作为 PeT 淬灭效率定量表征(R_{hole} 越高, 跨片段 PeT 效应越强, 荧光淬灭越显著);

4) 拟合 ΔE 与 R_{hole} 线性关联方程, 构建 PeT 淬灭量化预测指标, 用于指导新型识别基团定向改造。

3. 结果与讨论

3.1. DOS 态密度轨道能级分析

图 2、图 3 分别为 PX-1 与氧化产物 PX-OH 的分子轨道态密度(DOS)分布图, 图中曲线依据分子结构拆分为萘酰亚胺荧光团、1,4-苯二酚、酰胺连接片段三部分轨道贡献, 纵坐标为轨道能量(eV), 直观呈现不同片段 HOMO、LUMO 轨道能级排布差异。对于原始探针 PX-1, 1,4-苯二酚识别单元的最高占据轨道 HOMO 能级处于萘酰亚胺荧光团 HOMO 与 LUMO 轨道能级之间, 完全满足光诱导电子转移(PeT)效应发生的能级匹配条件。当 PX-1 分子吸收光子能量后, 萘酰亚胺荧光团电子由基态 S₀ 跃迁至激发态 S₁, 荧光团形成空轨道; 此时高能级苯二酚片段的孤对电子自发向荧光团空轨道转移, 激发态电子无法以辐射跃迁形式释放能量, 只能通过非辐射跃迁耗散, 宏观表现为 PX-1 水溶液几乎无荧光发射, 即本底强效荧光淬灭。当体系中存在 ONOO⁻时, 强氧化性 ONOO⁻进攻 1,4-苯二酚结构, 发生氧化裂解反应, 脱除苯二酚富电子片段, 生

成产物 PX-OH。从 PX-OH 的 DOS 图可见, 高能级给电子苯二酚片段完全消失, 分子轨道体系仅保留萘酰亚胺 D- π -A 共轭骨架, 轨道能级差发生重构, 原本支撑 PeT 电子转移的中间能级不复存在, PeT 电荷转移通路被彻底阻断。此时分子激发态跃迁完全由萘酰亚胺自身共轭骨架主导, 分子内电荷转移(ICT)成为主要跃迁模式, 激发态电子辐射跃迁效率大幅提升, 宏观表现为 553 nm 荧光信号显著恢复。DOS 轨道能级计算从微观电子轨道层面, 完整解释 PX-1 “无 ONOO⁻ 荧光淬灭、存在 ONOO⁻ 荧光开启” 的光谱变化本质, 验证分子识别基团与荧光团的能级匹配设计是探针实现高信噪比开关响应的核心基础。

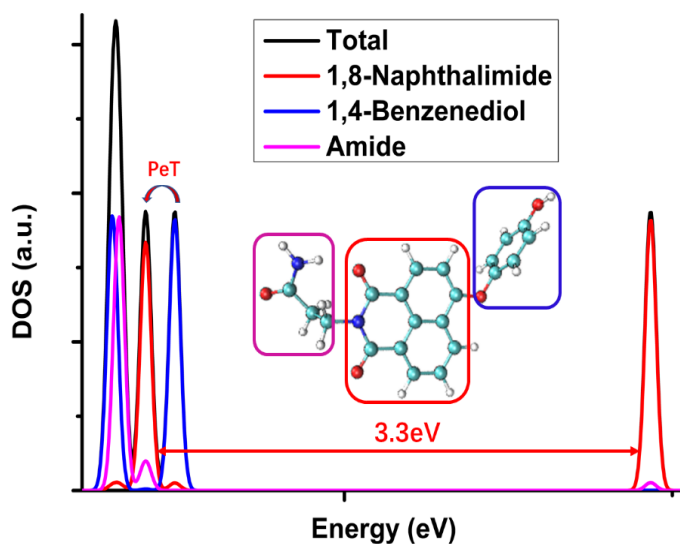


Figure 2. Density of states (DOS) diagram of probe PX-1

图 2. 探针 PX-1 的 DOS 图

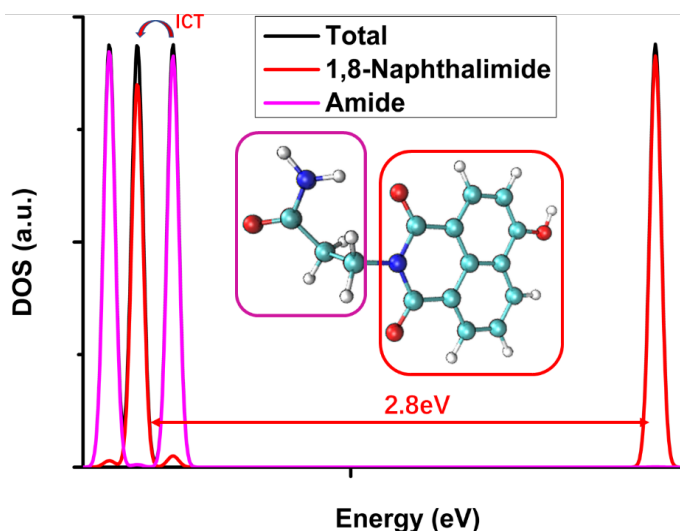


Figure 3. Density of states (DOS) diagram of oxidation product PX-OH

图 3. 产物 PX-OH 的 DOS 图

3.2. ALIE 平均局部离子化能反应位点预测

平均局部离子化能(ALIE)是判断分子氧化活性位点的经典理论指标, 分子区域 ALIE 数值越低, 代表该区域电子云密度越高、电离能越低, 越容易被强氧化性自由基进攻发生氧化反应。图 4 为 PX-1 分子

ALIE 等值面分布图，图中标注的反应位点集中于 1,4-苯二酚两个羟基取代的芳香碳原子区域，该区域 ALIE 数值为全分子最低，电子富集程度最高。理论计算预测的氧化位点与唐波课题组前期实验推导的裂解位点完全吻合：ONOO⁻作为强氧化剂，优先进攻苯二酚富电子碳位点，发生氧化断键，脱除整个苯二酚识别单元，生成仅保留萘酰亚胺骨架的 PX-OH 发光产物。ALIE 结果直接证明 PX-1 分子识别基团结构设计具备合理性，从理论角度解释探针仅对 ONOO⁻产生特异性氧化响应，而对其他低氧化性 ROS/RNS 无明显反应的选择性根源。

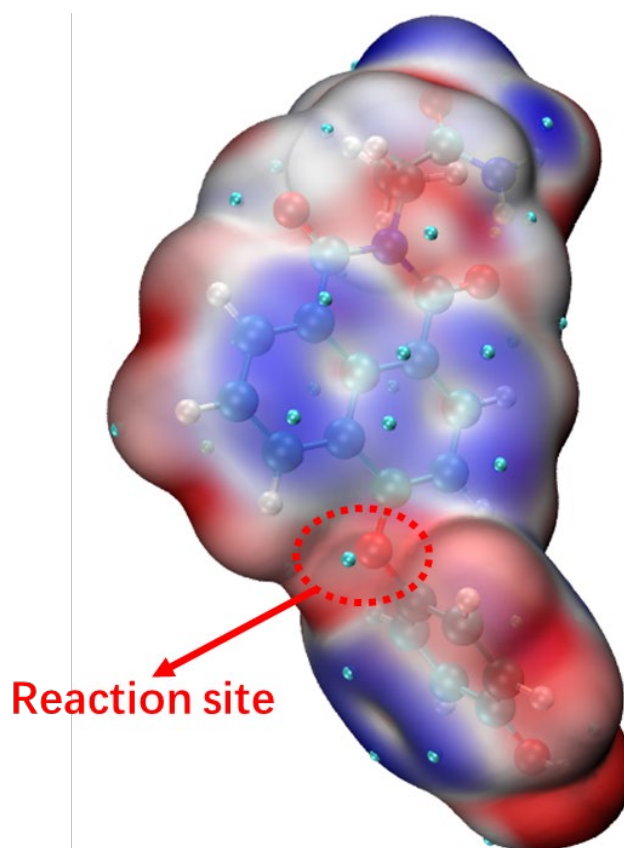


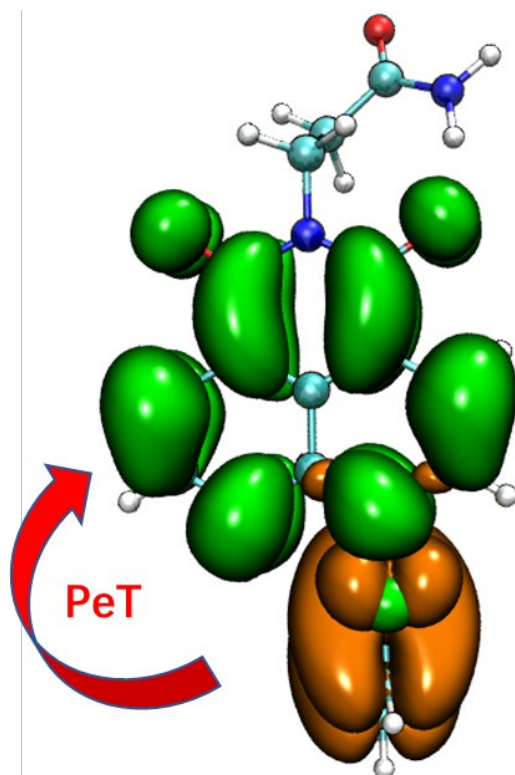
Figure 4. Average local ionization energy (ALIE) diagram of PX-1 showing the reactive site for oxidation

图 4. 探针 PX-1 的 ALIE 图，显示其反应位点

3.3. $S_0 \rightarrow S_1$ 激发空穴 - 电子分布与原子贡献定量分析

3.3.1. 原始探针 PX-1 激发态电子转移特征

图 5 为 PX-1 分子 $S_0 \rightarrow S_1$ 垂直激发的空穴 - 电子分布图，橙色区域代表跃迁产生的空穴分布，绿色区域代表激发后电子富集区域。从空间分布可见，激发产生的空穴绝大部分集中分布于 1,4-苯二酚给电子片段，而激发态电子完全富集在萘酰亚胺荧光团共轭骨架上，空穴与电子在分子空间上完全分离，是典型分子间 PeT 电荷转移特征。图 6 为 PX-1 激发跃迁原子贡献热图，定量统计各原子、结构片段对空穴与电子的贡献占比。定量数据显示，1,4-苯二酚片段对空穴总贡献占比超过 37%，是产生空穴的核心结构；萘酰亚胺骨架则承担绝大部分激发态电子容纳功能。空穴、电子分属两个独立分子片段，跨片段电子转移过程损耗大量激发态能量，荧光辐射效率被极大抑制，从激发态跃迁角度解释 PX-1 初始低荧光量子产率(0.004)的微观机理。



橙色：空穴部分；绿色：电子富集部分

Figure 5. Hole-electron distribution of PX-1 upon $S_0 \rightarrow S_1$ excitation. Note: Orange = hole distribution; Green = electron distribution

图 5. 探针 PX-1 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 激发过程电子分布

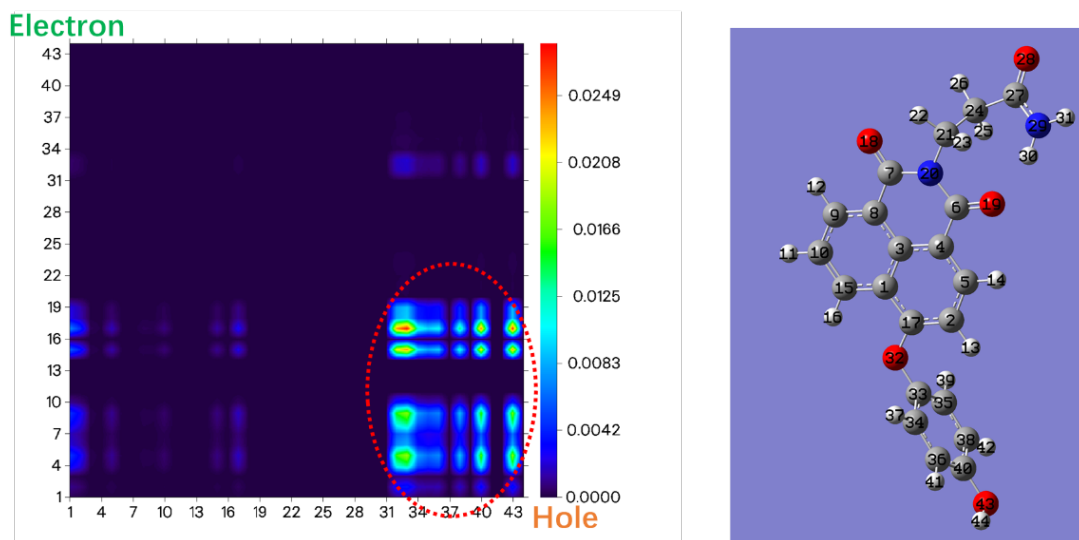


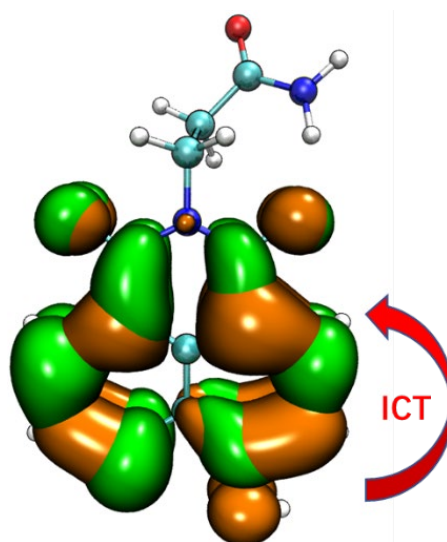
Figure 6. Atomic contribution heatmap of PX-1 in $S_0 \rightarrow S_1$ excitation together with molecular structure

图 6. 探针 PX-1 的 $S_0 \rightarrow S_1$ 激发过程原子贡献热图及其结构

3.3.2. 氧化产物 PX-OH 激发态 ICT 发光特征

图 7 为 PX-OH 分子 $S_0 \rightarrow S_1$ 激发空穴 - 电子分布，对比 PX-1 存在明显差异：氧化脱除苯二酚后，分

子仅剩余完整萘酰亚胺 D- π -A 共轭骨架, 激发产生的空穴与电子均集中分布在萘酰亚胺共轭体系内部, 空穴与电子空间重叠程度大幅提升, 不存在跨片段远距离电荷转移, PeT 效应完全消失。图 8 PX-OH 原子贡献热图进一步定量验证, 分子全部空穴、电子贡献均来自萘酰亚胺荧光骨架, 无外部给电子片段参与激发跃迁, 分子内电荷转移(ICT)成为唯一跃迁模式。ICT 跃迁过程能量损耗低, 激发态电子可高效通过辐射跃迁释放光子, 因此 PX-OH 荧光量子产率提升至 0.151, 荧光强度较 PX-1 提升 300 倍。综合空穴-电子可视化与原子贡献定量结果, 完整构建 PX-1 识别 ONOO⁻双重调控机理: 未反应探针依靠苯二酚介导的 PeT 效应实现荧光关闭; 与 ONOO⁻氧化裂解后 PeT 通路消失, 萘酰亚胺骨架 ICT 效应主导发光, 二者协同实现超高对比度荧光开关响应。



橙色: 空穴部分; 绿色: 电子富集部分

Figure 7. Hole-electron distribution of PX-OH upon $S_0 \rightarrow S_1$ excitation. Note: Orange = hole distribution; Green = electron distribution

图 7. 产物 PX-OH 的 S_0 - S_1 激发过程电子分布

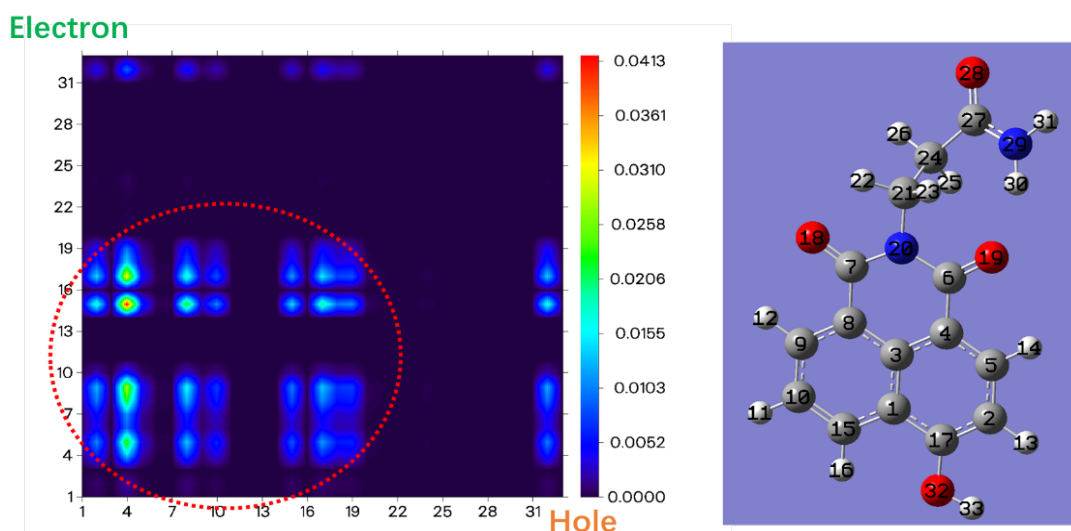


Figure 8. Atomic contribution heatmap of PX-OH in $S_0 \rightarrow S_1$ excitation together with molecular structure

图 8. 产物 PX-OH 的 S_0 - S_1 激发过程原子贡献热图及其结构

不同取代识别基团能级与 PeT 效率定量关系 M1~M5 系列取代苯二酚分子的轨道能级、空穴贡献占比定量结果如表 1:

Table 1. Energy levels of receptor groups modified by different substituents and quantitative parameters for PET quenching
表 1. 不同取代基修饰识别基团能级与 PeT 淬灭定量参数

分子编号	苯二酚取代基	E_HOMO(Rec)/eV	$\Delta E = E_HOMO(Rec)-E_HOMO(Flu)/eV$	R_hole (识别基团空穴占比)	PeT 淬灭强度
M1	无取代(原型)	-5.16	1.26	36.8%	强
M2	-CH ₃ (弱给电子)	-4.93	1.49	45.2%	极强
M3	-OCH ₃ (强给电子)	-4.61	1.81	58.7%	极强
M4	-F (弱吸电子)	-5.47	0.95	21.3%	中等
M5	-NO ₂ (强吸电子)	-6.52	-0.10	1.2%	几乎无 PeT

随识别基团给电子能力提升, E_HOMO (Rec)能级抬升, ΔE 数值增大, 识别基团在激发态中空穴贡献占比 R_hole 线性升高, PeT 淬灭效应同步增强; 强吸电子硝基取代后, 识别基团 HOMO 能级低于萘酰亚胺 HOMO, ΔE 为负值, 彻底丧失 PeT 发生的能级条件, 探针无荧光淬灭效果。

4. 结论

唐波课题组已完成 PX-1 探针合成、体外光谱、细胞双光子成像、CCl₄ 诱导急性肝损伤活体成像全套实验工作, 证实该 1,8-萘酰亚胺基靶向探针可高灵敏、高选择性可视化过氧化物酶体内 ONOO⁻。本文依托量子化学 TD-DFT 理论计算, 从分子轨道、氧化活性位点、激发态电子转移三个维度系统解析 PX-1 识别 ONOO⁻的微观内在机理, 得到如下核心结论: 1、DOS 态密度轨道分析证明, PX-1 中 1,4-苯二酚 HOMO 轨道能级介于萘酰亚胺荧光团 HOMO 与 LUMO 之间, 满足 PeT 荧光淬灭能级条件; 氧化生成 PX-OH 后苯二酚片段脱除, PeT 电子转移通路阻断, 荧光恢复; 轨道能级排布是探针开关响应的基础。2、ALIE 平均局部离子化能计算精准定位氧化反应位点为 1,4-苯二酚羟基取代碳, 理论预测氧化裂解位点与实验反应机理完全匹配, 解释探针针对 ONOO⁻的特异性氧化识别能力。3、S₀→S₁ 激发空穴 - 电子分布与原子贡献热图直观区分两种分子激发模式: PX-1 为跨片段 PeT 电荷转移, 荧光被淬灭; PX-OH 为骨架内 ICT 跃迁, 高效发光, 完整阐明 PeT 淬灭抑制、ICT 增强协同调控荧光开关的双重传感机制。本理论研究从微观电子层面解释 PX-1 优异传感性能的分子本质, 弥补仅依靠实验数据无法阐明微观机理的短板。同时研究也发现该探针体系存在一定缺陷: 多肽靶向修饰导致分子整体合成路线冗长、多肽在体内易被蛋白酶降解, 生物体内长期稳定性不足。基于 5 组不同电子效应取代苯二酚衍生物定量计算, 建立线性量化预测方程, 以识别基团与荧光团 HOMO 能级差 ΔE 为核心指标, 可定量预判探针 PeT 淬灭效率与荧光开关对比度, 实现新型探针分子的前置理论筛选, 将本文机理解释从单一 PX-1 分子拓展为一类探针的通用预测工具。结合能级定量规律、多肽模型结论, 提出三维度可量化分子定向优化策略: ① 轻量化短肽/非多肽靶向基团改造, 兼顾靶向能力与体内稳定性; ② 调控苯二酚取代基电子效应, 将能级差 ΔE 控制在 1.4~1.6 eV 区间, 最大化荧光增强倍数; ③ 萘酰亚胺 4 位共轭给电子修饰, 红移发射波长、提升量子产率与双光子吸收性能。上述量化设计准则可指导脂肪肝、药物性肝损伤、肝纤维化等多种肝病氧化应激成像探针的定向开发, 突破传统“合成 - 试错”研发模式, 实现荧光探针分子的理性、可预测化设计。

基金项目

辽宁省科技厅自然科学基金面上联合项目(2024-MSLH-147)。

参考文献

- [1] Zheng, Z.L. and Zheng, Y.L. (2026) A TICT-Activated Dual-Function Fluorescent Probe for Imaging of Intracellular Viscosity and Peroxynitrite. *Journal of Fluorescence*, **36**, 2221-2229. <https://doi.org/10.1007/s10895-026-04716-5>
- [2] Zheng, Z.J., Liao, R.H. and Du, Y.T. (2025) Ratiometric Fluorescent Probe for Sensitive Tracking of Peroxynitrite during Drug-Induced Hepatotoxicity. *ChemBioChem*, **26**, e202400907. <https://doi.org/10.1002/cbic.202400907>
- [3] Xue, X.L., Wang, Y., Fang, Y.P., Wang, K., Chen, S.J. and Hu, Z.Q. (2025) A Ratiometric Fluorescent Probe Based on Oxabenzofluorene Structure for the Detection of Peroxynitrite in Mitochondria. *Journal of Luminescence*, **283**, Article 121258. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2025.121258>
- [4] Xiang, Y.H., Lu, J., Rui, W., Yu, Y., Wen, M., Yu, F., *et al.* (2025) Visualizing Peroxynitrite Dynamics in an Epilepsy Model Using an Endoplasmic Reticulum-Targeted Fluorescent Probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **444**, Article 138398. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.138398>
- [5] Wang, K., Li, Z.L., Wang, Y., Liu, C.Y., Liu, X.T., Xu, J., *et al.* (2025) A Peroxynitrite-Specific Fluorescent Probe Combined with Phototransformation Strategy for Detecting Nitrate and Nitrite in Water Source and Food Samples. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **444**, Article 138294. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2025.138294>
- [6] Qin, J.J., Cheng, M.Y., He, C.L., Shen, X. and Zhu, Z.Q. (2025) An Imidazo-Pyridin Derivative as Fluorescent Probe for the Peroxynitrite Detection in Pulmonary Permissive Hypercapnia. *Analytical Sciences*, **41**, 457-464. <https://doi.org/10.1007/s44211-025-00721-z>
- [7] Han, H.H., Ge, P.X., Li, W.J., Hu, X.P. and He, X. (2025) Recent Advancement in Fluorescent Probes for Peroxynitrite (ONOO⁻). *Sensors*, **25**, Article 3018. <https://doi.org/10.3390/s25103018>
- [8] Ye, X.P., Li, L.X., Liu, H., Fang, Y.Y. and Liu, X.Y. (2024) The First N,O-Chelated Diphenylboron-Based Fluorescent Probe for Peroxynitrite and Its Bioimaging Applications. *Biosensors*, **14**, Article 515. <https://doi.org/10.3390/bios14110515>
- [9] Yang, Y., Shang, J.T., Xia, Y.Y. and Gui, Y.R. (2024) Fluorescent Probes for Sensing Peroxynitrite: Biological Applications. *Redox Report*, **29**, Article 2430157. <https://doi.org/10.1080/13510002.2024.2430157>
- [10] Sun, N.N., Cai, Y.J., Yan, H.J., Yang, W.G. and Hu, Y.H. (2024) Development of a Ratiometric Fluorescent Probe for the Detection of Peroxynitrite. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **317**, Article 124404. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124404>
- [11] Lu, C.Y., Li, L., Tang, J.X., Xue, H.Y., Wang, T.Z., Sun, H.J., *et al.* (2024) Chromone-Based Fluorescent Probe for Peroxynitrite Imaging in Arabidopsis Thaliana. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **455**, Article 115743. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2024.115743>
- [12] Liu, L.H., Shang, X.Z., Yuan, J.H., Luo, Y.N., Wang, J.Y., Xue, X.L., *et al.* (2024) A Fluorescent Probe Based on Cyclochalcone for Detecting Peroxynitrite. *Photochemical & Photobiological Sciences*, **23**, 1031-1039. <https://doi.org/10.1007/s43630-024-00565-y>
- [13] Chen, X., Wang, Y., Zhao, X.Y., Fan, Y., Bie, H.Y., Wu, W., *et al.* (2024) Construction of a Dual-Excitation Ratiometric Fluorescent Probe for Determining Peroxynitrite Levels in Living Cells and Zebrafish. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **313**, Article 124084. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2024.124084>
- [14] Alam, S., Lu, L.C., Tao, X.Z., Mao, Y.X., Zheng, S.J., Jiang, C.H., *et al.* (2024) A Highly Selective and Sensitive Carbazole-Based Fluorescent Probe for Peroxynitrite Detection and Cellular Imaging. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **52**, Article 100456. <https://doi.org/10.1016/j.cjac.2024.100456>
- [15] Zhuo, J.Z., Hui, J., Chi, H.J., Guo, Y.X. and Lu, G.H. (2023) Near-Infrared Fluorescent Probes with Long-Acting Cyclic Monitoring and Effectively Eliminating Peroxynitrite. *Chemistry—An Asian Journal*, **18**, e202300717. <https://doi.org/10.1002/asia.202300717>
- [16] Zhou, Y.Q., Li, P., Fan, N.N., Wang, X., Liu, X.N., Wu, L.J., *et al.* (2019) *In Situ* Visualization of Peroxisomal Peroxynitrite in the Livers of Mice with Acute Liver Injury Induced by Carbon Tetrachloride Using a New Two-Photon Fluorescent Probe. *Chemical Communications*, **55**, 6767-6770. <https://doi.org/10.1039/c9cc02483b>