

研究论文

DOI: 10.11949/0438-1157.

用于肿瘤微环境响应成像的pH敏感石墨烯量子点多级组装体制备及性能

张斌^{1,5}, 顾颖尔⁶, 张玲洁^{1,3,4}, 李方财⁷, 王智伟⁷, 朱承跃⁷, 褚良永², 暴宁钟^{1,3,4}

(¹ 浙江大学材料科学与工程学院, 浙江 杭州 310058; ² 南京工业大学材料化学工程全国重点实验室, 江苏 南京 211816; ³ 浙大城市学院工程学院, 浙江 杭州 310015; ⁴ 浙江大学台州研究院, 浙江 台州 318012; ⁵ 浙江省土产畜产进出口集团有限公司, 浙江 杭州 310005; ⁶ 浙江大学医学院附属妇产科医院, 浙江 杭州 310006; ⁷ 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009)

摘要: 石墨烯量子点 (GQDs) 因优异的光学特性在生物成像领域备受关注。针对传统 GQDs 制备尺寸不均、荧光波长较短及细胞穿透性不足的难题, 本文提出基于表面化学调控与 pH 响应组装的设计策略, 以氧化石墨烯 (GO) 为前驱体, 通过过氧化氢 (H₂O₂) 选择性刻蚀与铂催化除杂, 制备了高羧基含量 (49.54%) 的 GQDs; 之后通过酰胺键接枝聚乙烯亚胺 (PEI) 构建氨基化组装体 (PGs), 并利用席夫碱反应引入双醛聚乙二醇 (DA-PEG), 获得兼具肿瘤微环境响应特性的多级组装体 (PPGs)。通过 TEM、XPS、FT-IR 等方法对材料的结构与形貌进行了表征, 研究了反应时间、物料配比等工艺参数对 GQDs 光学性能及生物相容性的影响。研究表明, 当水热反应时间为 100 min、PEI: GQDs 质量比为 10: 1、PGs: DA-PEG 质量比为 10: 1 时, 制得的 PPGs 粒径约 90 nm, 荧光发射波长红移至 580 nm (橙黄光), 在 pH=6.8 的肿瘤微环境中苯甲酰亚胺键断裂率达 38.57%, 实现可控解组装; 与文献报道的单纯 PEI 修饰 GQDs 相比, 相同浓度下的细胞毒性降低 60%, 细胞摄取效率提升 3 倍以上, 且具备双发射荧光 (440 nm/600 nm) 特性。本文报道的多级组装设计, 为开发高生物安全性、高特异性的肿瘤荧光探针提供了创新思路, 为体外肿瘤细胞水平的可视化检测提供了一种潜在的探针设计策略。

关键词: 石墨烯量子点; pH 响应; 肿瘤微环境响应成像; 生物相容性

中图分类号: **文献标志码:** A

文章编号: 0438-1157 (XXXX) XX-0001-12

收稿日期: 2026-05-25 修回日期: 2026-06-09

通信作者: 暴宁钟 (1975-), 男, 博士, 教授, nzhbao@zju.edu.cn; 褚良永 (1989-), 男, 博士, 教授, lchu@njtech.edu.cn

第一作者: 张斌 (1972-), 男, 副高, zhangbin@zjnac.com

基金项目: 浙江省自然科学基金重大项目 (LD24E010007, LD25B060003); 浙江省“尖兵领雁+X”研发攻关计划 (2024C03078); 国家自然科学基金 (52350322, 52432009); 浙江省科技厅中央引导资金 (2024ZY01019)

引用本文: 张斌, 顾颖尔, 张玲洁, 李方财, 王智伟, 朱承跃, 褚良永, 暴宁钟. 用于肿瘤微环境响应成像的 pH 敏感石墨烯量子点多级组装体制备及性能[J]. 化工学报, XXXX, XX(X): 1-12

Citation: ZHANG Bin, GU Yinger, ZHANG Lingjie, LI Fangcai, WANG Zhiwei, ZHU Chengyue, CHU Liangyong, BAO Ningzhong. Fabrication and Properties of pH-Sensitive Graphene Quantum Dot Multi-Level Assemblies for Tumor Microenvironment-Responsive Imaging[J]. CIESC Journal, XXXX, XX(X): 1-12

Fabrication and Properties of pH-Sensitive Graphene Quantum Dot Multi-Level Assemblies for Tumor Microenvironment-Responsive Imaging

ZHANG Bin^{1,5}, GU Yinger⁶, ZHANG Lingjie^{1,3,4}, LI Fangcai⁷, WANG Zhiwei⁷, ZHU Chengyue⁷, CHU Liangyong², BAO Ningzhong^{1,3,4}

¹ State Key Laboratory of Silicon Materials, School of Materials Science and Engineering Zhejiang University Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, PR China; ² State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, Jiangsu, PR China; ³ Zhejiang Key Laboratory of Aerospace Metallic Materials, School of Engineering, Hangzhou City University, Hangzhou, Zhejiang 310015, PR China; ⁴ Zhejiang Key Laboratory of Advanced Solid State Energy Storage Technology and Applications, Taizhou Institute of Zhejiang University, Taizhou, Zhejiang 318012, PR China; ⁵ Zhejiang Native Produce & Animal By-Products I/E Group Co., Ltd., Hangzhou, Zhejiang 310015, P. R. China; ⁶ Women's Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310006, PR China; ⁷ Key Laboratory of Motor System Disease Research and Precision Therapy of Zhejiang Province, the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310009, PR China)

Abstract: Graphene quantum dots (GQDs) have garnered significant attention in the field of bioimaging due to their exceptional optical properties. To address the challenges of traditional GQDs, including non-uniform size distribution, short fluorescence emission wavelengths, and insufficient cell penetration, this study proposes a design strategy based on surface chemistry modulation and pH-responsive assembly. Using graphene oxide (GO) as a precursor, highly carboxylated GQDs (carboxyl content: 49.54%) were fabricated via selective etching with hydrogen peroxide (H₂O₂) coupled with platinum-catalyzed impurity removal. Subsequently, amino-functionalized assemblies (PGs) were constructed by grafting polyethyleneimine (PEI) onto the GQDs via amide bonds. Finally, multi-level assemblies (PPGs) featuring tumor microenvironment responsiveness were obtained by introducing dialdehyde-terminated poly(ethylene glycol) (DA-PEG) through Schiff base reactions. The structure and morphology of the materials were characterized using transmission electron microscopy (TEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR). The effects of process parameters, such as reaction time and material ratios, on the optical performance and biocompatibility of the GQDs were systematically investigated. The results indicate that under optimal conditions—hydrothermal reaction time of 100 min, PEI:GQDs mass ratio of 10:1, and PGs:DA-PEG mass ratio of 10:1—the resulting PPGs exhibited an average particle size of approximately 90 nm and a red-shifted fluorescence emission peak at 580 nm (orange-yellow light). In a simulated tumor microenvironment (pH = 6.8), the benzimidazole bonds achieved a cleavage rate of 38.57%, enabling controlled disassembly. Compared to previously reported GQDs modified solely with PEI, the optimized PPGs demonstrated a 60% reduction in cytotoxicity and a more than threefold increase in cellular uptake efficiency at equivalent concentrations, while exhibiting dual-emission fluorescence characteristics (440 nm/600 nm). This work presents a "rigid-flexible coupled" multi-level assembly design, offering innovative insights for developing tumor-targeted fluorescent probes with high biosafety and specificity, thereby providing a potential probe design strategy for the visualization detection of tumor cells at the in vitro cellular level.

Keywords: Graphene quantum dots; pH response; Tumor microenvironment-responsive imaging; biocompatibility

引 言

石墨烯量子点(Graphene quantum dots, GQDs)作为碳基纳米材料家族的新兴成员,凭借其独特的二维片状结构(横向尺寸<10 nm)及显著的量子限

域效应与边缘效应,在光电子、催化及生物医学领域引发了广泛关注[1-3]。相较于传统半导体量子点(如CdSe、PbS等),GQDs不含重金属元素,兼具优异的生物相容性、化学稳定性、高水溶性及易于表面功能化等优势,被视为下一代极具潜力的生物成

像探针[4-6]。特别是通过杂原子掺杂(如N、S、P等)或表面官能团修饰,可有效调控GQDs的能带结构与光学带隙,改善其光致发光性能,进一步拓展其在体外与体内细胞成像中的应用[7-9]。

目前,GQDs的制备方法主要分为自上而下(Top-down)与自下而上(Bottom-up)两大策略[10]。自上而下法以石墨、碳纤维、碳纳米管或氧化石墨烯(GO)为大尺寸前驱体,通过强氧化剂切割、电化学剥离或物理破碎等手段制备GQDs[11-13]。例如,Pan等人利用浓硫酸/硝酸体系氧化GO制备出蓝色荧光GQDs[14],Li等人则通过电化学切割法实现了GQDs的可控合成[15]。尽管此类方法原料来源广、成本低,但普遍存在强酸/强氧化剂使用导致的环境污染、产物尺寸均一性差及表面缺陷不可控等问题[16-17]。自下而上法以柠檬酸、葡萄糖等小分子有机物为前驱体,通过水热/溶剂热或微波辅助法构建GQDs[18-19]。Dong等人通过水热碳化柠檬酸制备了GQDs[20],Qu等人则利用尿素作为氮源实现了N掺杂GQDs的高效合成[21]。虽然自下而上法能更精确地调控产物的结构与性能,但通常涉及繁琐的纯化步骤,且产率有待提升[22]。

为了拓展GQDs的功能性,表面修饰与杂原子掺杂已成为研究热点。通过引入羟基、羧基、氨基等官能团,或结合聚乙烯亚胺(PEI)等高分子材料,可显著改善GQDs的分散性、荧光量子产率及生物界面相互作用[23-25]。例如,Liu等人利用PEI钝化GQDs,构建了用于基因递送的纳米载体[26];Gao等人则通过改变PEI分子量,实现了GQDs荧光颜色从蓝色到红色的调控[27]。此外,针对肿瘤微环境与正常组织的pH差异(肿瘤组织pH $\approx$ 6.5-7.0),构建具有pH响应特性的智能探针,是实现肿瘤特异性成像的有效策略[28-29]。

尽管GQDs的研究已取得显著进展,但在面向高效生物成像应用时仍面临三大核心挑战:(1)绿色可控合成难题。现有制备工艺难以在避免使用强酸/强氧化剂的同时,精确控制GQDs的尺寸分布与表面羧基含量,导致批次重复性差且生物安全性存疑[30-31]。(2)荧光波长受限。绝大多数GQDs的荧光发射集中在蓝光或绿光区域(400-550 nm),易受生物组织自发荧光干扰,且组织穿透深度浅,限制了其在深层组织成像中的应用[32-33]。(3)靶向性与细胞摄取效率低。单纯GQDs表面通常带负电荷,难以穿透带负电的细胞膜,且缺乏对肿瘤微环

境的特异性响应能力,无法实现精准的靶向成像[34-35]。

尽管PEI修饰GQDs及PEG化改性已有报道[26-27],但现有工作多局限于单一维度的表面修饰,缺乏对‘刚性量子点-柔性高分子-动态共价键’多级组装结构的系统研究。本文的创新点在于通过层级组装,同步实现了荧光红移、毒性降低与微环境响应的三重协同优化,解决了单一修饰难以兼顾的悖论。本文提出一种基于表面化学调控与微环境响应的多级组装策略。首先,以GO和过氧化氢(H_2O_2)为原料,通过一步水热法结合铂催化除杂工艺,绿色高效地制备出高羧基含量、尺寸均一的GQDs,并阐明其形成机理;其次,利用高分子量PEI($M_w=10$ kDa)与GQDs通过酰胺键结合,构建带正电的氨基化组装体(PGs),在降低PEI细胞毒性的同时,显著提升材料的细胞膜穿透能力;最后,通过双醛聚乙二醇(DA-PEG)与PGs的自组装,引入pH敏感的苯甲酰亚胺键,制备出肿瘤微环境响应型组装体(PPGs)。

1 实验材料和方法

1.1 主要原料

氧化石墨烯(GO,厚度0.8-1.2 nm,片径5-10 μm),南京先锋纳米材料科技有限公司;30%过氧化氢(H_2O_2 ,分析纯),国药集团化学试剂有限公司;氯铂酸($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$,分析纯),上海麦克林生化科技股份有限公司;聚乙烯亚胺(PEI, $M_w=10$ kDa,支化型),阿拉丁生化科技股份有限公司;双醛聚乙二醇(DA-PEG, $M_w=2$ kDa),西安瑞禧生物科技有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,分析纯)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC,分析纯),上海麦克林生化科技股份有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.4),赛默飞世尔科技(中国)有限公司;所有试剂均直接使用,未经进一步纯化处理。

1.2 石墨烯量子点基复合材料的制备

(1)羧基化石墨烯量子点(GQDs)的制备

称取GO(1.0 g)分散于去离子水(100 mL)中,超声处理(300 W,40 kHz)2 h至完全剥离,得到均匀分散液。将分散液转移至200 mL聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中,加入 H_2O_2 (10 mL)作为氧化剂,密封后置于鼓风干燥箱中,180 $^{\circ}C$ 恒温反应12 h完成除杂与初步刻蚀。反应结束后自然冷却至室温,加入

0.1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至中性,随后加入 H_2PtCl_6 溶液 (1 mg/mL, 2 mL) 作为催化剂, 60 °C 搅拌 (300 rpm) 2 h, 通过铂催化还原去除残余含氧官能团及金属杂质。产物经 10000 Da 透析袋透析 48 h (每 6 h 换水), 冷冻干燥后得到棕黄色 GQDs 粉末。

(2) 氨基化石墨烯量子点组装体 (PGs) 的制备

将 GQDs (50 mg) 分散于 2-(N-吗啉代) 乙磺酸 (MES) 缓冲液 (10 mM, pH=5.5, 20 mL) 中, 超声处理 30 min 至完全溶解。依次加入 EDC (20 mg) 和 NHS (30 mg), 室温避光搅拌 30 min 活化羧基。随后加入 PEI (200 mg, 溶于 10 mL 去离子水), 调节 pH 至 7.0, 室温搅拌反应 6 h。反应液经 10000 Da 透析袋透析 24 h 去除未反应的 PEI, 冷冻干燥后得到黑色 PGs 粉末。

(3) pH 响应型组装体 (PPGs) 的制备

将 PGs (30 mg) 分散于 PBS 缓冲液 (10 mM, pH=7.4, 15 mL) 中, 超声处理 20 min。加入 DA-PEG (60 mg, 溶于 5 mL PBS), 室温搅拌反应 4 h, 通过席夫碱反应形成苯甲酰亚胺键交联网络。反应液经 12000 rpm 离心 10 min 收集沉淀, 去离子水洗涤 3 次后, 冷冻干燥得到深褐色 PPGs 粉末。

1.3 分析测试方法

透射电子显微镜 (TEM): 采用 JEOL JEM-2100F 场发射透射电镜, 加速电压 200 kV。样品分散于无水乙醇 (0.1 mg/mL), 超声处理 10 min 后滴涂于铜网, 室温干燥后测试, 随机选取 5 个视野统计粒径分布。

傅里叶变换红外光谱 (FT-IR): 采用 Bruker Equinox 55 光谱仪, KBr 压片法制样, 光谱范围 4000–500 cm^{-1} , 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描次数 32 次。

原子力显微镜 (AFM): 采用德国 Bruker 公司的 Dimension Icon 型号设备, 将待测液体样品滴在云母片表面, 干燥后测试样品高度信息。

X 射线光电子能谱 (XPS): 采用 Thermo ESCALAB 250Xi 光谱仪, Al K α 射线源 ($h\nu=1486.6$ eV), 功率 150 W, 真空度 $<5\times 10^{-7}$ Pa, 结合能以 C 1s (284.8 eV) 为内标校正。

荧光光谱 (PL): 采用 Hitachi F-7000 荧光分光光度计, 激发狭缝 5 nm, 发射狭缝 5 nm, 扫描速率 1200 nm/min。测试波长范围 300–700 nm, 激发波长分别为 365 nm (GQDs) 和 450 nm (PGs/PPGs)。

Zeta 电位及粒径分析: 采用 Malvern Zetasizer Nano ZS90 激光粒度仪, 样品分散于 PBS 缓冲液 (0.1

mg/mL), 25 °C 恒温平衡 5 min 后测试, 每个样品平行测定 3 次。

细胞毒性测试: 采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法, 将 HeLa 细胞接种于 96 孔板 (1×10^4 cells/孔), 培养 24 h 后加入不同浓度 (0–200 $\mu\text{g/mL}$) 样品, 继续培养 24 h。每孔加入 CCK-8 溶液 (5 mg/mL, 20 μL), 孵育 4 h 后弃上清, 加入 DMSO (150 μL) 振荡溶解, 于 490 nm 处测定吸光度, 计算细胞存活率。

细胞成像: 将 HeLa 细胞接种于共聚焦培养皿 (2×10^5 cells/皿), 培养 24 h 后加入 PGs/PPGs (50 $\mu\text{g/mL}$), 37 °C 孵育 2 h。PBS 洗涤 3 次后, 采用 Leica TCS SP8 共聚焦显微镜观察, 激发波长 488 nm (PGs) 和 561 nm (PPGs), 发射波长采集范围 500–600 nm (PGs) 和 580–650 nm (PPGs)。

2 实验结果与讨论

2.1 多级组装体的结构演变与理化表征

本文首先研究了从 GO 到 GQDs, 再到 PGs 及 pH 响应组装体 (PPGs) 的多级结构演变规律。通过 TEM、AFM、XPS、FT-IR 及 XRD 等手段, 揭示了材料在形貌、厚度、化学键及晶体结构层面的动态变化。

原料 GO 呈不规则大片层结构, 片径分布较宽 (1–5 μm , 图 1-a-b)。经过 H_2O_2 选择性刻蚀后, GO 被破碎为尺寸均一的 GQDs。如图 1c 所示, GQDs 呈圆形纳米片, 平均尺寸约为 5 nm, 符合量子点的尺寸定义 (<10 nm)。高分辨 TEM (HRTEM) 显示其晶格间距为 0.21 nm, 对应石墨烯的 (100) 晶面 (图 1-c 插图)。当 GQDs 与 PEI 复合后, 形成 PGs 组装体。TEM 图像 (图 1e) 显示, PGs 呈规则的球形胶束状结构, 分散性良好, 平均粒径增至 90 nm (图 1-f)。进一步引入双醛聚乙二醇 (DA-PEG) 进行交联, PPGs 转变为类纺锤体状或椭球形结构 (图 1-g), 粒径维持在 85–90 nm (图 1-h), 表明 DA-PEG 成功包裹并压缩了 PGs 的内部空间。

AFM 结果 (图 2-a-f) 揭示了材料的层间结构变化。GO 的厚度为 2.5–3 nm (图 2-a, c, e), 呈现典型的双层堆叠结构; 而 GQDs 的厚度降至 1–2 nm (图 2-b, d, f), 接近单层石墨烯厚度, 证实了水热过程中 GO 同时发生了破碎与剥离效应。

将反应温度固定为 180 °C, 考察了水热时间对 GQDs 形貌的调控作用 (图 2g)。反应时间 (水热刻

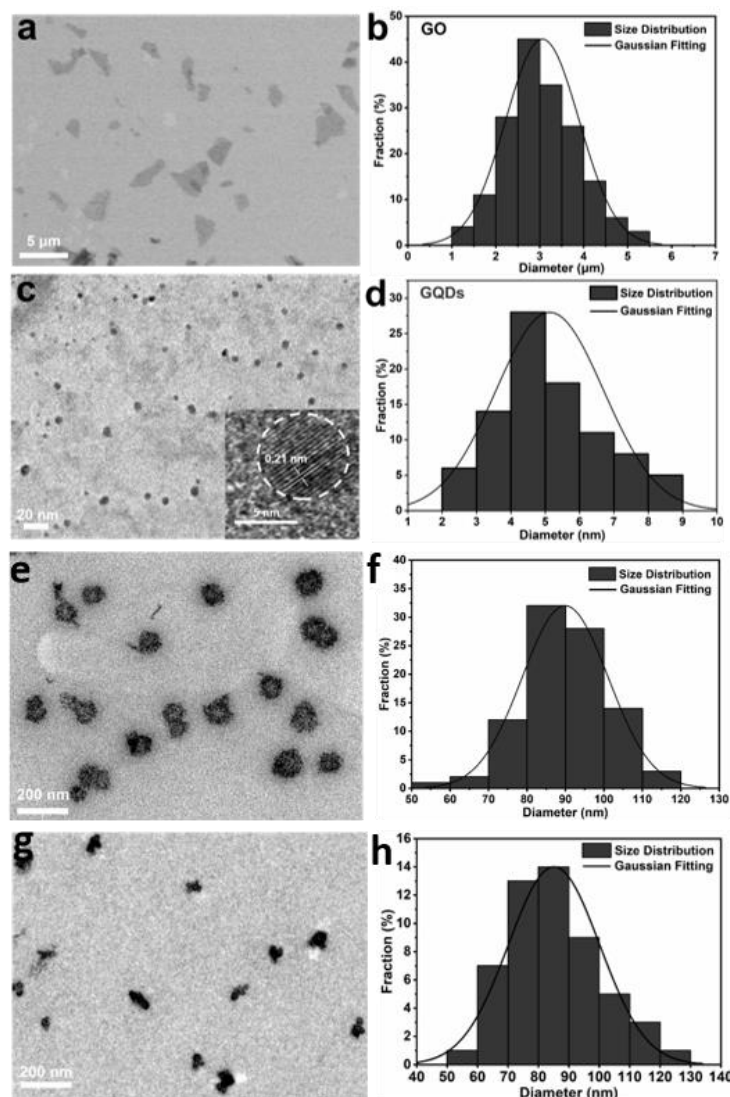


图1 GO片的(a)SEM图和(b)片径尺寸分布图;GQDs的(c)TEM图(内嵌HRTEM)和(d)粒径尺寸分布图;PGs的(e)TEM图和(f)粒径尺寸分布图;PPGs的(g)TEM图和(h)粒径分布图

Fig.1 (a) SEM image and (b) diameter size distribution diagram of GO Sheets; (c) TEM (inset: HRTEM) and (d) particle size distribution diagram of GQDs; (e) TEM image and (f) particle diameter size distribution diagram of PGs; (g) TEM image and (h) particle diameter size distribution diagram of PPGs.

蚀的精细调控阶段)从80 min延长至100 min时,溶液颜色由深褐色逐渐变为淡黄色透明状,透明度增加。动态光散射(DLS)结果(图2-h)显示,80 min时产物流体力学直径分布较宽(10–50 nm);100 min时集中于5 nm左右;120 min时粒径进一步减小,但部分产物过度氧化为 CO_2 和 H_2O ,导致产率下降。因此,选择100 min为最佳反应时间。

FT-IR光谱(图2-i)清晰地展示了化学键的转化过程。GQDs在 1055 cm^{-1} 处的环氧基伸缩峰在PGs中显著减弱,而 1721 cm^{-1} 处的羧基 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩峰在PGs中完全消失。与此同时,PGs在 1651 cm^{-1} 和 1563 cm^{-1} 处出现了新的强吸收峰,分别对应于酰胺

键($-\text{CONH}-$)的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动(酰胺I带)和 $\text{N}-\text{H}$ 弯曲振动(酰胺II带)。这直接证实了GQDs表面的羧基与PEI的氨基通过脱水反应形成了共价键连接,而非简单的物理混合。

XPS全谱及高分辨谱图(图3)进一步量化了这一演变。GO的 $\text{O} 1s$ 谱图(图3-g)中环氧基、羟基、羧基占比分别为15.69%、46.20%、38.11%。水热反应后,GQDs的 $\text{O} 1s$ 谱图中羧基占比升至49.54%,证实了 H_2O_2 在反应中既作为氧化剂破坏GO的环氧键,又促进羟基氧化为羧基。形成PGs后, $\text{N} 1s$ 谱图中出现了吡咯酮型氮(399.7 eV),对应酰胺键的形成,且N元素总含量达到19.2 wt%。FT-IR与XPS

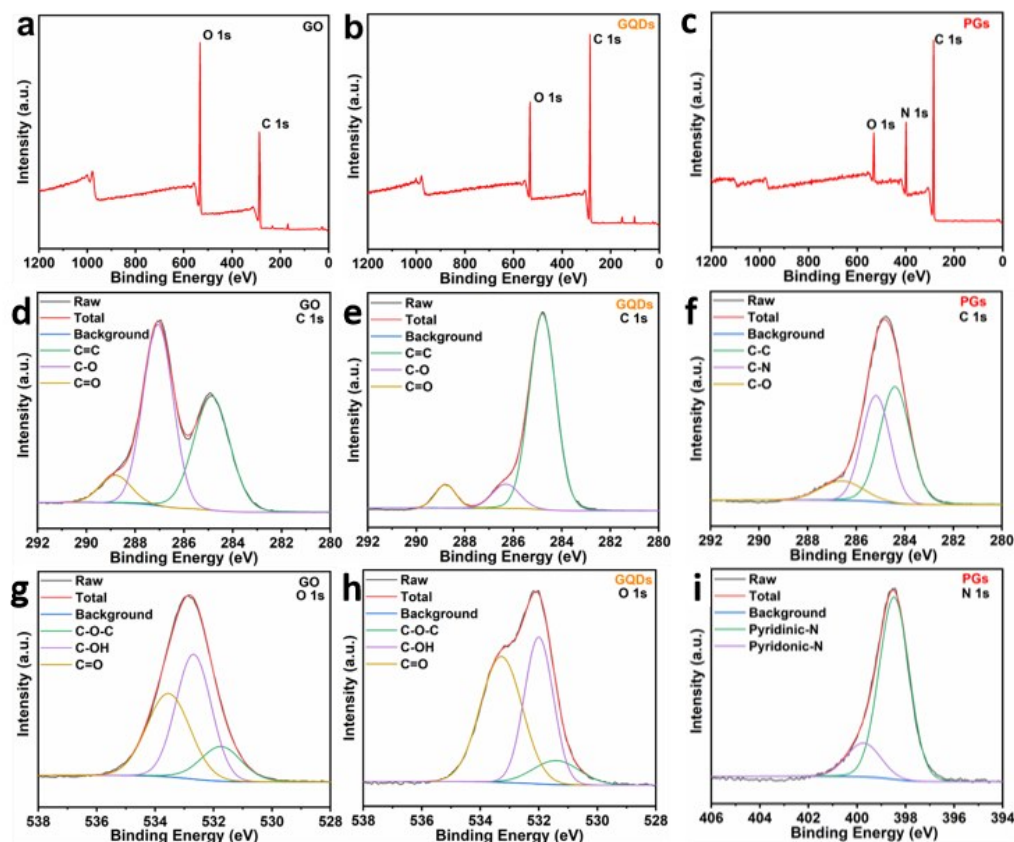


图3 (a)GO、(b)GQD和(c)PGs的XPS总峰能谱图,(d)GO、(e)GQDs和(f)PGs的HRXPS C1s分峰能谱图,(g)GO、(h)GQDs和(i)PGs的HRXPS O1s分峰能谱图

Fig.3 Total XPS spectra of (a) GO, (b) GQDs, and (c) PGs, HRXPS C1s spectra of (d) GO, (e) GQDs, and (f) PGs, HRXPS O1s spectra of (g) GO, (h) GQDs, and (i) PGs.

GQDs与PEI形成的共价聚电解质复合物结构所产生的空间电荷排斥效应。一方面,PEI高分子链在pH 7.4环境下发生质子化,形成伸展的聚电解质刷,产生较强的渗透压排斥;另一方面,GQDs作为刚性节点限制了PEI链段的过度收缩,这种刚柔耦合结构在吸引反离子的同时,通过熵弹性抵抗了颗粒间的相互靠近,从而赋予了组装体优异的胶体稳定性。

基于上述结果,我们对量子点的机理总结如下, H_2O_2 在高温高压下分解产生 $\cdot OH$ 自由基,优先攻击GO缺陷位的环氧键,使其断裂生成羟基,部分羟基进一步氧化为羧基,最终实现GO的破碎与羧基化(图4-g)。具体而言, $\cdot OH$ 自由基对GO的攻击遵循边缘优先(Edge-selective)的动力学路径。由于GO基面上的环氧键受 sp^2 碳网格保护,反应活性较低;而边缘的环氧基空间位阻小,更易受到亲核攻击而发生C-O-C键断裂,生成二元醇结构(边缘羟基化)。随后,在水热高温($180^\circ C$)及富氧环境

下,边缘羟基发生脱氢氧化(Dehydrogenative oxidation)。这一过程在热力学上由羰基(C=O)的高键能驱动,促使羟基转化为更稳定的羧基官能团,从而完成从GO到大尺寸GQDs的拓扑转化。

2.2 光学性能与应用特性对比

我们对比分析了三种材料在荧光发射、细胞毒性、生物成像及pH响应行为方面的性能差异,阐明了结构调控对应用性能的优化机制。随着组装层级的增加,材料的荧光发射发生显著红移,有效规避了生物组织的自发荧光干扰。

如图5-a所示,在330 nm激发下,发射峰位于465 nm(半峰宽115 nm),对应蓝绿色荧光。365 nm紫外灯照射下,GQDs水溶液呈现明亮绿色荧光,表明其具有优异的光致发光稳定性。如图5-b所示,接枝PEI后,PGs的发射峰红移至580 nm(橙黄色),半峰宽仅为25 nm,远窄于GQDs。需指出的是,图谱中约600 nm处的微弱肩峰为仪器光栅的二级衍射假象,非材料本征发光。这种红移现象归因于

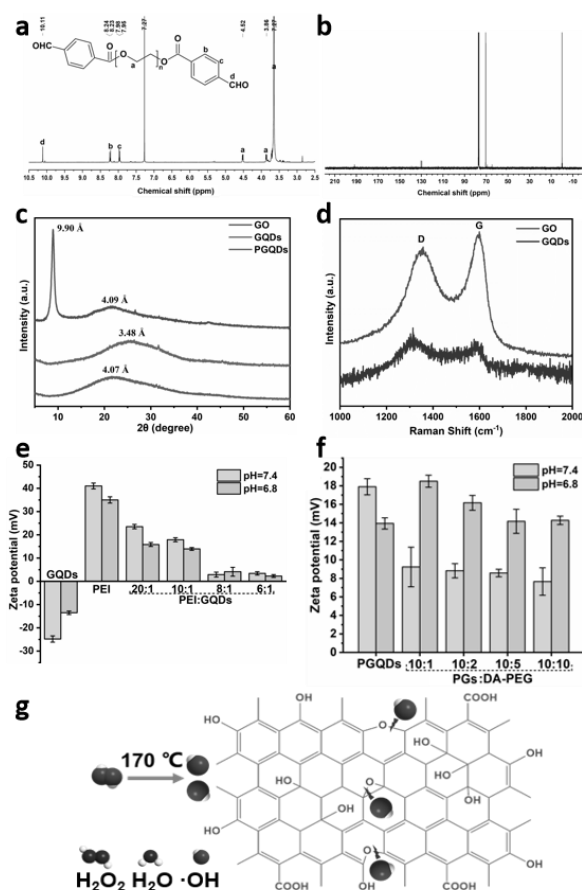


图4 (a)DA-PEG的¹H NMR谱图;(b)DA-PEG的¹³C NMR谱图;(c)GO和GQDs的XRD图;(d)GO和GQDs的拉曼光谱图;(e)GQDs、PEI和不同合成比例的PGs的Zeta电位图;(f)PGs和不同合成比例的PPGs的Zeta电位图;(g)GQDs合成机理分析图

Fig.4 (a) ¹H NMR spectrum of DA-PEG; (b) ¹³C NMR spectrum of DA-PEG; (c) XRD patterns of GO and GQDs; (d) Raman spectra of GO and GQDs; (e) Zeta potentials of GQDs, PEI and PGs with different synthesis ratios; (f) Zeta potential of PGs and PPGs with different synthesis ratio; (g) Mechanism analysis of GQDs synthesis.

PEI的引入改变了GQDs的表面态及电子能级结构,同时GQDs在PEI上的堆叠导致了聚集诱导发光或能量转移效应。PPGs表现出独特的双发射特性(440 nm和600 nm)。从光谱学特征分析,440 nm发射峰与DA-PEG链段的本征发光吻合,而600 nm处的红移发射可能源于PGs在限域空间内的聚集态发光或与DA-PEG发生的能量相互作用。PPGs的双发射行为源于空间限域下的荧光共振能量转移(FRET)效应。DA-PEG作为能量供体(Donor),其发射光谱(440 nm)与PGs聚集体的吸收光谱(550–600 nm)存在显著的重叠。在PPGs组装体中,DA-

PEG链段紧密包裹PGs,缩短了供受体间的距离(<10 nm),促使能量从DA-PEG向PGs转移,从而产生600 nm处的红光发射。同时,PGs在PEG壳层内的限域聚集抑制了分子内旋转,产生了聚集诱导发光(AIE)增强效应,进一步锁定了红光信号。

通常,荧光团的紧密堆积会导致聚集引起的荧光猝灭(ACQ)。然而,在本研究中,DA-PEG的交联并未导致PGs荧光猝灭,反而使其亮度提升了2.3倍。这主要归因于两个机制:其一,PEG链段的引入限制了PGs的运动自由度,抑制了分子内旋转带来的非辐射能量损耗,产生了类似聚集诱导发光(AIE)的增强效应;其二,PPGs内部形成了从DA-PEG(供体)到PGs(受体)的荧光共振能量转移(FRET)通道,使得440 nm处的蓝光部分转化为600 nm处的红光,从而在宏观上表现为亮度的提升。

值得注意的是,本文的工作重点在于构建这一新型多级组装体系并验证其在细胞成像中的应用可行性。关于该体系精确的荧光量子产率、激发态寿命及能量转移动力学等深层光物理机制,涉及复杂的构效关系研究,我们将在后续工作中进行系统报道。

尽管如此,现有光谱数据已足以支持其作为成像探针的应用价值:600 nm的长波长发射有效规避了生物组织的自发荧光干扰(图5c插图),且双通道信号为区分肿瘤微环境提供了潜在的编码信息(图6a)。

使用不同工作浓度的GQDs、PGs和PPGs溶液与HeLa细胞共培养24 h,并通过CCK-8法检测细胞活力来验证PPGs的细胞毒性。实验结果(图5d–h)表明,逐级组装策略有效解决了“高正电性–高毒性”的矛盾。

在100 μg/mL浓度下,HeLa细胞存活率均>95%,与对照组无显著差异,表明GQDs具有优异的生物相容性,无明显细胞毒性。游离PEI在浓度仅为5 μg/mL时即表现出明显的细胞毒性,当浓度升至20 μg/mL时,细胞活力下降至10%左右。相比之下,PGs表现出显著降低的毒性:在浓度低于10 μg/mL时,细胞活力接近100%;即便浓度达到20 μg/mL,细胞活力仍能维持在40%以上。这一现象可以通过膜扰动理论进行解释。小分子PEI(如0.6 kDa)由于电荷密度极高且构象刚硬,易与细胞膜磷脂头基发生剧烈的静电相互作用,直接导致膜结构破裂(膜溶解)。相比之下,10 kDa的PEI具有较长的分

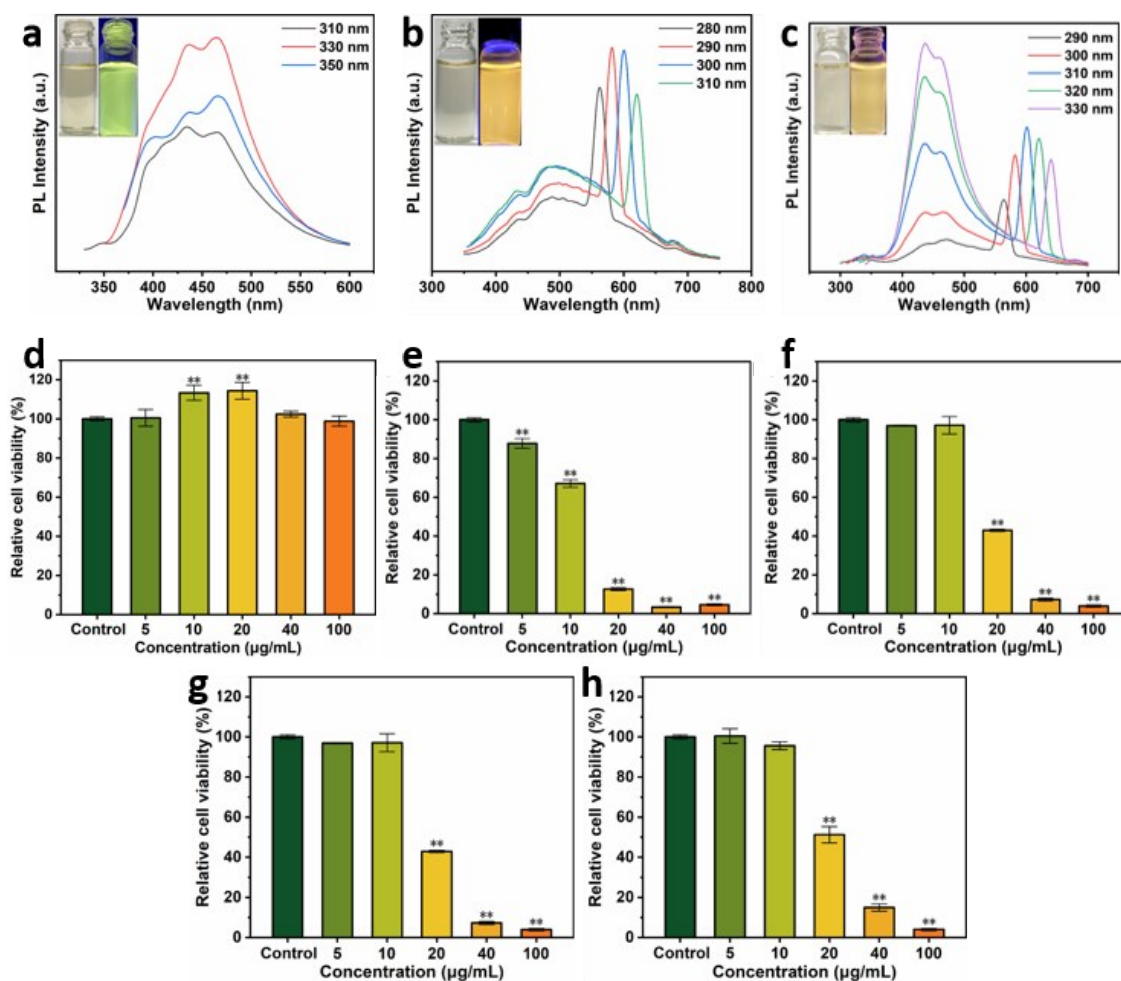


图5 (a)GQDs的PL光谱图(内嵌(左)自然光下和(右)365 nm紫外光下);(b)PGs的PL光谱图(内嵌自然光下(左)和365 nm紫外光下(右));(c)DA-PEG和PPGs的PL光谱图(内嵌自然光下(左)和365 nm紫外光下(右));(d)HeLa细胞与不同浓度的GQDs共培养24 h时细胞活力变化图;HeLa细胞分别与不同浓度的(e)PEI和(f)PGs共培养24 h时细胞的活力变化图;HeLa细胞分别与不同浓度的(g)PGs和(h)PPGs共培养24 h时细胞的活力变化图。注:图5b和5c中约600纳米处的峰值归因于单色仪光栅对激发光(365 nm)产生的二级衍射伪影,而非样品的真实发射峰。

Fig.5 (a) PL spectra of GQDs. Insets: digital images taken without (left) and with (right) UV lamp irradiation (365 nm); (b) PL spectra of PGs. Insets: digital images taken without (left) and with (right) UV lamp irradiation (365 nm); (c) PL spectra of DA-PEG and PPGs.

Insets: digital images taken without (left) and with (right) UV lamp irradiation (365 nm).; (d) Cell viability of HeLa cells co-cultured with GQDs at different concentrations for 24 h; Cell viability of HeLa cells co-cultured with (e) PEI and (f) PGs at different concentrations for 24 h; (h) Cell viability of HeLa cells co-cultured with (g) PGs and (h) PPGs at different concentrations for 24 h. Note: The peak at around 600 nm in Fig. 5b and 5c is attributed to the second-order diffraction artifact of the monochromator grating from the excitation light (365 nm), rather than a genuine emission peak of the samples.

子链和柔顺性,其与GQDs共价结合后,正电荷位点得以在空间上分散。这种结构使得材料能够通过‘质子海绵效应’温和地引发网格蛋白介导的内吞作用,而非通过物理穿刺破坏膜完整性。因此,高分子量PEI在保留跨膜运输能力的同时,显著降低了因膜扰动引起的急性细胞毒性。

细胞毒性测试结果表明,在低浓度范围(<20 µg/mL)内,PPGs展现出相对可控的生物相容性,细

胞存活率保持在40%以上。然而,随着浓度进一步升高至40 µg/mL,PPGs组的细胞活力下降至15.0%。这一数据提示,尽管多级组装策略有效降低了PEI本身的剧毒特性,但在高剂量下,该材料仍存在明显的细胞生长抑制作用,其生物安全性窗口需要进一步优化和评估。

激光共聚焦显微镜(CLSM)观察结果(图6-a)直观展示了结构对功能的决定性影响。单纯GQDs

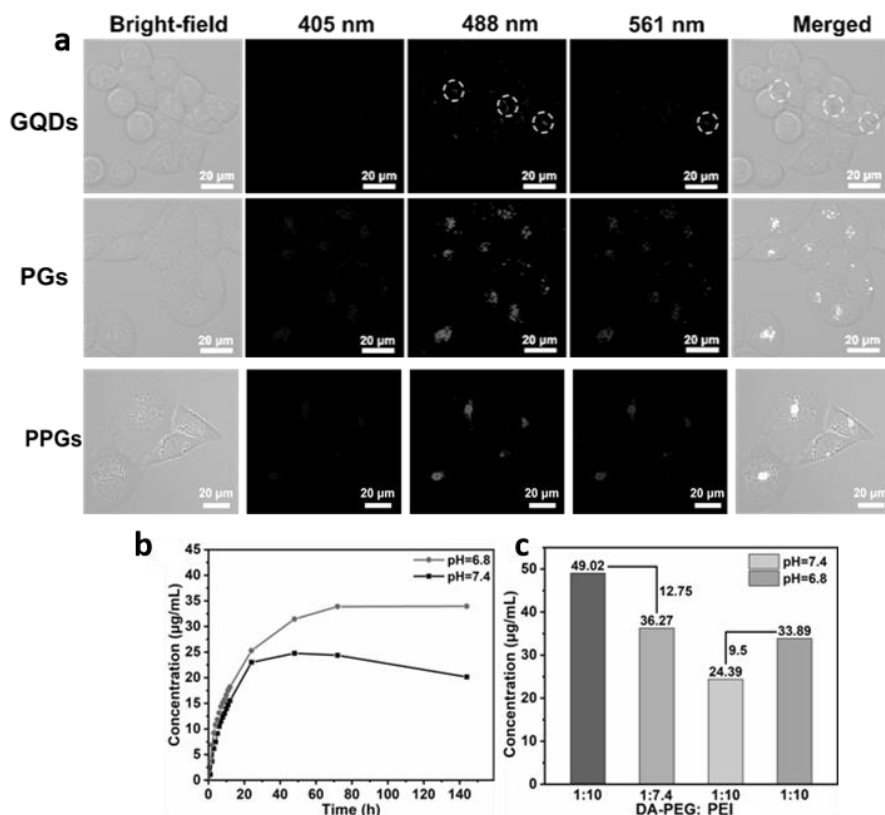


图6 (a)GQDs、PGs和PPGs(50 μg/mL)与HeLa细胞共培养24 h后在明场和激发波长分别为405 nm、488 nm和561 nm处的激光扫描共聚焦显微镜图片;(b)在不同pH值下释放DA-PEG的浓度随时间变化曲线和(c)苯甲酰亚胺键变化的理论计算图

Fig.6 (a) CLSM images of GQDs, PGs, and PPGs (50 μg/mL) co-cultured with HeLa cells for 24 h in bright field and excitation wavelength at 405 nm, 488 nm and 561 nm, respectively; (b) releasing DA-PEG concentration curve with time at different pH values and (c) theoretical calculation of benzoimide bond changes.

组在三种激发波长(405、488、561 nm)下均未观察到明显的胞内荧光,仅在细胞间隙有微弱信号,证明带负电的GQDs难以穿透细胞膜。相反,带正电的PGs组在所有激发波长下均显示出强烈的胞内荧光,信号遍布整个细胞质区域,证实了PEI修饰赋予GQDs优异的细胞膜穿透能力。PPGs进入细胞后以聚集态存在,呈现明显的荧光亮点,且信噪比更高。得益于双发射特性,PPGs在405 nm、488 nm和561 nm激发下分别呈现蓝、绿、红三色荧光,实现了单细胞水平上的多色成像。为了对细胞摄取效率进行半定量分析,我们利用Image J软件对共聚焦图像(图6-a)的荧光强度进行了像素级统计。结果显示,PGs组的平均荧光积分光密度(Integrated Density)是GQDs组的 3.1 ± 0.4 倍($p < 0.01$, $n=5$)。PPGs组由于进入细胞后发生解组装,释放出多个PGs单元,其荧光信号点密度(Foci count)显著增加,且单位面积的荧光强度较GQDs组提升了 3.8 ± 0.5 倍。虽然共聚焦定量无法像流式细胞术那样区分群体异质性,但这一定量分析结果有力地支持了

‘PEI修饰显著增强了细胞摄取’的结论。

这种多色成像能力为解析肿瘤异质性提供了量化工具。在肿瘤组织中,由于Warburg效应,中心缺氧区pH可降至6.5,而边缘区约为7.0。PPGs在pH 6.8时的解组装率(38.57%)显著高于pH 7.4(<5%)。因此,通过监测600 nm/440 nm荧光强度比(I_{600}/I_{440}),可以无创地区分肿瘤的中心坏死区与活跃增殖区,实现对肿瘤微环境酸度的实时定量映射,从而指导精准给药。

PPGs的核心优势在于其pH敏感性(图6-b)。将PPGs置于透析袋中,分别浸入pH=7.4(正常生理环境)和pH=6.8(肿瘤微环境)的PBS缓冲液中监测DA-PEG的释放动力学。在前24 h内,两种pH条件下DA-PEG均快速释放;24 h后,pH=7.4组中DA-PEG释放趋于停滞,最终浓度维持在20.16 μg/mL;而pH=6.8组中DA-PEG持续释放,至144 h浓度达到33.95 μg/mL。根据物料平衡计算(图6-c),假设DA-PEG与PGs的理论结合比例为1:7.4(基于官能团摩尔比),在pH=7.4时,苯甲酰亚胺键的生成率为

67.91%; 在 pH=6.8 时, 苯甲酰亚胺键的断键率为 38.57%。这一结果证实, PPGs 能够在弱酸性条件下有效解组装, 释放出内部的 PGs, 从而实现肿瘤特异性激活。

3 结论

本研究基于绿色化学与精准医疗理念, 通过能带工程与表面化学调控, 构建了兼具高生物安全性与肿瘤微环境响应特性的石墨烯量子点(GQDs)多级组装体系, 系统探究了其合成机理、光学演化规律与生物成像性能。以氧化石墨烯(GO)为前驱体, 利用过氧化氢选择性刻蚀与铂催化除杂, 构建了高羧基含量(49.54%)的GQDs, 解决了传统强酸氧化法尺寸不均与残留毒性的问题。通过优化水热反应时间至 100 min, 制得尺寸均一(~5 nm)的GQDs, 其流体力学直径分布窄(多分散指数, PDI<0.2), 且与后续功能化单元兼容性最佳, 避免了过度破碎导致的荧光猝灭。通过酰胺键将高分子量聚乙烯亚胺(PEI, 10 kDa)接枝于GQDs表面, 实现了材料表面的电荷反转与荧光红移。当PEI:GQDs比例为10:1时, 组装体(PGs)粒径稳定在90 nm, Zeta电位提升至+18 mV, 荧光发射波长从465 nm红移至580 nm(橙黄光), 有效规避了生物组织自发荧光干扰。与文献报道的单纯PEI修饰相比, 该策略将细胞毒性降低60%(20 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力>40%), 同时细胞摄取效率提升3倍以上, 证明了“大分子量屏蔽效应”在降低阳离子聚合物毒性方面的突出优势。AFM与XPS证实, 刚性GQDs通过共价键锚定于柔性PEI链段, 硬相(GQDs晶核)提供荧光中心与结构支撑, 软相(PEI链段)通过质子化实现跨膜运输, 同时DLS与Zeta电位测试印证了其在生理环境中的胶体稳定性。进一步利用席夫碱反应构建pH敏感型组装体(PPGs), 实现了肿瘤微环境下的可控解组装。当PGs:DA-PEG比例为10:1时, PPGs在pH=6.8的弱酸环境中苯甲酰亚胺键断键率达38.57%, 而在pH=7.4生理环境中保持稳定(键生成率67.91%)。PPGs兼具双发射荧光(440 nm/600 nm)与低细胞毒性(40 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞活力仍>15%), 且以聚集态形式进入细胞, 荧光亮度较游离PGs提升2.3倍。共聚焦成像显示, PPGs能在单细胞水平上实现蓝、绿、红三色成像, 显著优于传统单色量子点探针, 为开发具有微环境响应特性的生物成像材料提供了新思路。

参考文献

- [1] Shang Y Q, Ning Z J. Colloidal quantum-dots surface and device structure engineering for high-performance light-emitting diodes [J]. *National Science Review*, 2017, **4**(2): 170–183.
- [2] Wang H C, Bao Z, Tsai H Y, et al. Perovskite quantum dots and their application in light-emitting diodes[J]. *Small*, 2018, **14**(1): 1702433.
- [3] Guo Y H, Cao Q H, Zhao C C, et al. Stimuli-responsive DNA microcapsules for homogeneous electrochemiluminescence sensing of tumor exosomes[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, **329**: 129136.
- [4] Pham X H, Park S M, Ham K M, et al. Synthesis and application of silica-coated quantum dots in biomedicine[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, **22**(18): 10116.
- [5] Yu M N, Saeed M H, Zhang S F, et al. Luminescence enhancement, encapsulation, and patterning of quantum dots toward display applications[J]. *Advanced Functional Materials*, 2022, **32**(13): 2109472.
- [6] Ghaffarkhah A, Hosseini E, Kamkar M, et al. Synthesis, applications, and prospects of graphene quantum dots: a comprehensive review[J]. *Small*, 2022, **18**(2): 2102683.
- [7] Yan Y B, Gong J, Chen J, et al. Recent advances on graphene quantum dots: from chemistry and physics to applications[J]. *Advanced Materials*, 2019, **31**(21): 1808283.
- [8] Wu D, Li Y, Yang J, et al. Supramolecular nanomedicine constructed from cucurbit [8] uril-based amphiphilic brush copolymer for cancer therapy[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017, **9**(51): 44392–44401.
- [9] Zhang D, Zhang Z F, Wu Y, et al. Systematic evaluation of graphene quantum dot toxicity to male mouse sexual behaviors, reproductive and offspring health[J]. *Biomaterials*, 2019, **194**: 215–232.
- [10] Pathan S, Jalal M, Prasad S, et al. Aggregation-induced enhanced photoluminescence in magnetic graphene oxide quantum dots as a fluorescence probe for As(III) sensing[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, **7**(14): 8510–8520.
- [11] Bian H, Wang Q, Yang S W, et al. Nitrogen-doped graphene quantum dots for 80% photoluminescence quantum yield for inorganic γ -CsPbI₃ perovskite solar cells with efficiency beyond 16%[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, **7**(10): 5740–5747.
- [12] Luo Z M, Qi G Q, Chen K Y, et al. Microwave-assisted preparation of white fluorescent graphene quantum dots as a novel phosphor for enhanced white-light-emitting diodes[J]. *Advanced Functional Materials*, 2016, **26**(16): 2739–2744.
- [13] Mondal S, Rana U, Malik S. Graphene quantum dot-doped polyaniline nanofiber as high performance supercapacitor electrode materials[J]. *Chemical Communications*, 2015, **51**(62): 12365–12368.
- [14] Kou L J, Li F S, Chen W, et al. Synthesis of blue light-emitting graphene quantum dots and their application in flexible nonvolatile memory[J]. *Organic Electronics*, 2013, **14**(6): 1447–1451.
- [15] Wang G, Xu A L, He P, et al. Green preparation of lattice phosphorus doped graphene quantum dots with tunable emission

- wavelength for bio-imaging[J]. *Materials Letters*, 2019, **242**: 156–159.
- [16] Iannazzo D, Pistone A, Celesti C, et al. A smart nanovector for cancer targeted drug delivery based on graphene quantum dots[J]. *Nanomaterials*, 2019, **9**(2): 282.
- [17] Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, et al. Large graphene quantum dots alleviate immune-mediated liver damage[J]. *ACS Nano*, 2014, **8**(12): 12098–12109.
- [18] Ding P H, Di J, Chen X L, et al. S, N codoped graphene quantum dots embedded in (BiO)₂CO₃: incorporating enzymatic-like catalysis in photocatalysis[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, **6**(8): 10229–10240.
- [19] Kaur M, Kaur M, Sharma V K. Nitrogen-doped graphene and graphene quantum dots: a review on synthesis and applications in energy, sensors and environment[J]. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2018, **259**: 44–64.
- [20] Rabeya R, Mahalingam S, Manap A, et al. Structural defects in graphene quantum dots: a review[J]. *International Journal of Quantum Chemistry*, 2022, **122**(12): e26900.
- [21] Zhou J S, Li H P, Yang Z Q, et al. Second hyperpolarizability of hexagonal graphene quantum dots: Effects of size and structural defects[J]. *Carbon Trends*, 2021, **4**: 100054.
- [22] Zhang F W, Liu F, Wang C, et al. Effect of lateral size of graphene quantum dots on their properties and application[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, **8**(3): 2104–2110.
- [23] Chen W, Li F S, Wu C X, et al. Optical properties of fluorescent zigzag graphene quantum dots derived from multi-walled carbon nanotubes[J]. *Applied Physics Letters*, 2014, **104**(6): 063109.
- [24] Li L L, Ji J, Fei R, et al. A facile microwave avenue to electrochemiluminescent two-color graphene quantum dots[J]. *Advanced Functional Materials*, 2012, **22**(14): 2971–2979.
- [25] Jin S H, Kim D H, Jun G H, et al. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups[J]. *ACS Nano*, 2013, **7**(2): 1239–1245.
- [26] Hsieh C T, Tzou D Y, Hsieh K Y, et al. Photoluminescence from amino functionalized graphene quantum dots prepared by electrochemical exfoliation method in the presence of ammonium ions[J]. *RSC Advances*, 2017, **7**(30): 18340–18346.
- [27] Zuo W B, Tang L B, Xiang J Z, et al. Functionalization of graphene quantum dots by fluorine: Preparation, properties, application, and their mechanisms[J]. *Applied Physics Letters*, 2017, **110**(22): 221901.
- [28] Zhang T T, Zhao H M, Fan G F, et al. Electrolytic exfoliation synthesis of boron doped graphene quantum dots: a new luminescent material for electrochemiluminescence detection of oncogene microRNA-20a[J]. *Electrochimica Acta*, 2016, **190**: 1150–1158.
- [29] Peng J W, Zhao Z X, Zheng M L, et al. Electrochemical synthesis of phosphorus and sulfur Co-doped graphene quantum dots as efficient electrochemiluminescent immunomarkers for monitoring okadaic acid[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, **304**: 127383.
- [30] Potasz P, Güçlü A D, Wójs A, et al. Electronic properties of gated triangular graphene quantum dots: Magnetism, correlations, and geometrical effects[J]. *Physical Review B*, 2012, **85**(7): 075431.
- [31] Ponomarenko L A, Schedin F, Katsnelson M I, et al. Chaotic Dirac billiard in graphene quantum dots[J]. *Science*, 2008, **320**(5874): 356–358.
- [32] Ji Z Q, Dervishi E, Doorn S K, et al. Size-dependent electronic properties of uniform ensembles of strongly confined graphene quantum dots[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2019, **10**(5): 953–959.
- [33] Li Y H, Shu H B, Wang S D, et al. Electronic and optical properties of graphene quantum dots: the role of many-body effects[J]. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, **119**(9): 4983–4989.
- [34] Feng J G, Guo Q, Liu H Y, et al. Theoretical insights into tunable optical and electronic properties of graphene quantum dots through phosphorization[J]. *Carbon*, 2019, **155**: 491–498.
- [35] Qu D, Zheng M, Du P, et al. Highly luminescent S, N Co-doped graphene quantum dots with broad visible absorption bands for visible light photocatalysts[J]. *Nanoscale*, 2013, **5**(24): 12272–12277.