

宁可可,梁建功.*L-/D-半胱氨酸修饰的手性硫量子点对人乳腺癌MCF-7细胞毒性差效应机制研究*[J].华中农业大学学报,2025,44(6):167-175.DOI:10.13300/j.cnki.hnlxb.2025.06.017

L-/D-半胱氨酸修饰的手性硫量子点对人乳腺癌MCF-7细胞毒性差效应机制研究

宁可可,梁建功

华中农业大学化学学院,武汉 430070

摘要 硫量子点(sulfur quantum dots, SQDs)具有独特的生物相容性及低细胞毒性特征,为揭示手性SQDs表面特性与生物体系的相互作用机制,基于手性表面工程策略,以L-半胱氨酸(L-Cys)和D-半胱氨酸(D-Cys)为手性配体,成功构建具有镜像对称结构的对映体SQDs(L-/D-Cys-SQDs)。圆二色谱(CD)分析显示,L-Cys-SQDs与D-Cys-SQDs在200 nm处呈现正负相反的镜像对称信号,明确其手性构型差异。以MCF-7人乳腺癌细胞为模型,系统评估SQDs的构效关系,MTT实验表明,经4.0 mg/mL SQDs处理48 h后,L-Cys-SQDs组细胞活力为80.4%,而D-Cys-SQDs组显著降低至66.0%,揭示D构型SQDs的毒性增强效应。流式定量分析显示,D-Cys-SQDs的细胞摄取量较L-Cys-SQDs降低12.1%,表明其内化效率与毒性呈负相关,DCFH-DA探针检测发现,D-Cys-SQDs诱导的细胞内活性氧(ROS)水平较L-Cys-SQDs升高。

关键词 手性;纳米材料;硫量子点;细胞毒性;细胞内化;细胞摄取;活性氧

中图分类号 R285.5;R965 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)06-0167-09

自2014年硫量子点(sulfur quantum dots, SQDs)首次被报道以来^[1],这类非金属纳米材料因其独特的物理化学性质,逐渐成为传统含金属量子点(如CdSe、PbS)及有机荧光材料的潜在替代品。相较于传统量子点(QDs),SQDs展现出多重优势:合成原料成本低且环境友好^[2]、兼具优异的光致发光特性(高量子产率、可调发射波长)和生物相容性^[3-4]、可通过表面工程赋予手性、抗菌、环境修复等多功能特性^[5]。近年来,SQDs的合成策略持续优化,研究方向聚焦于性能提升与功能拓展。例如,Gao等^[6]通过一锅溶剂热法开发出量子产率达87.8%的超高荧光SQDs,突破了SQDs发光效率低的瓶颈;Gaifullina等^[7]采用阳离子表面活性剂肉豆蔻基三甲基溴化铵(MTAB)调控SQDs表面电荷,实现了胶体稳定性与尺寸均一性的协同优化;Xia等^[8]则创新性地以丙烯酸-2-丙烯酰胺基-2-甲基丙烷磺酸共聚物[P(AA/AMPS)]为多功能封端剂,赋予SQDs抗垢、抗菌及生物成像三重复合功能。手性工程作为调控纳米材料光学与生物效应的前沿策略,已在金属基QDs(如

CdTe、Au)中取得显著进展,但其在SQDs体系中的应用仍处于探索阶段。

SQDs因兼具低细胞毒性和可修饰性等优势,已成为手性纳米材料研究的新焦点^[9-10]。现有研究多集中于手性SQDs的光物理性能优化,而手性构型对其生物识别、细胞摄取及毒性机制的影响尚未被系统探索。目前手性SQDs的构建主要依托表面修饰策略:Jiang等^[11]利用β-环糊精修饰的SQDs实现了色氨酸对映异构体的手性传感;Hasan等^[12]开发了一种机械化学合成策略,揭示了手性SQDs的基态和激发态手性光学特性;Zhao等^[13]报道了L-Cys修饰的手性SQDs的快速、大规模合成方法,并将其应用于细胞内温度监测,为炎症相关疾病的诊断提供了新工具。尽管如此,手性引入对SQDs生物安全性的影响机制仍缺乏系统性研究。深入探索手性SQDs的构效关系,阐明其与细胞相互作用中的手性依赖行为,不仅可为低毒性纳米探针的设计提供理论依据,还将推动手性纳米材料在疾病诊疗一体化中的创新应用。

收稿日期:2025-05-14

基金项目:国家自然科学基金项目(22074048)

宁可可,E-mail:1035506610@qq.com

通信作者:梁建功,E-mail:liangjg@mail.hzau.edu.cn

本研究聚焦于手性 SQDs 对 MCF-7 细胞毒性差异的机制探究, 以 *L*-Cys 和 *D*-Cys 为手性源, 通过水热法制备具有手性特征的 SQDs(分别记为 *L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs), 采用荧光光谱、圆二色谱(CD)和傅里叶变换红外光谱等表征手段, 系统分析手性 SQDs 的光学性质及表面化学结构; 进一步研究 *L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs 对 MCF-7 细胞的毒性效应并通过双光子激光共聚焦显微镜(CLSM)、倒置荧光显微镜及流式细胞术(FCM)等技术, 对手性 SQDs 的细胞内化行为、细胞摄取量及 ROS 水平进行定性与定量分析, 旨在揭示手性依赖的细胞毒性差异机制, 为设计开发具有生物应用潜力的新型手性 SQDs 提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

升华硫、*L*-半胱氨酸(*L*-Cys)、*D*-半胱氨酸(*D*-Cys)、钼酸钠($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、噻唑蓝(MTT)购自上海阿拉丁生化科技有限公司。NaOH、 H_2O_2 、二甲基亚砜(DMSO)购自国药集团化学试剂有限公司。所有化学试剂均为分析纯, 使用时无需进一步纯化。超纯水(18 $\Omega\text{M}/\text{cm}$)用于整个实验。胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、无酚红高糖DMEM购自Gibco公司。*2',7'*-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)购自上海碧云天生物技术股份有限公司。人乳腺癌细胞(MCF-7)和MARC-145(非洲绿猴胚胎肾细胞)来自笔者所在实验室留存。

Talos F200X 透射电子显微镜(Thermo Fisher, 美国); Nicolet iS50 傅里叶变换红外光谱仪(Thermo Fisher, 美国); J-1500 圆二色光谱(CD)仪(JASCO, 日本); RF-6000 荧光分光光度计(Shimadzu, 日本); SpectraMax® i3x 多功能酶标仪(美谷分子, 中国); Fluoviewer.1000 双光子激光共聚焦显微镜(Olympus, 日本); Ti-U 倒置荧光显微镜(Nikon, 日本); BD Accuri C6 plus 流式细胞仪(BD, 美国)。

1.2 手性 SQDs 的合成

SQDs 的合成方法参考文献[5]合成。在三口圆底烧瓶中依次加入 1.4 g 升华硫、4.0 g 片状 NaOH、*L*-Cys(或 *D*-Cys)3.5 g 及 50 mL 超纯水, 通过磁力搅拌使其充分混合, 形成均质反应体系。将反应体系置于油浴中, 于(70±2) °C 恒温条件下持续搅拌反应 72 h。反应终止后关闭加热装置, 使体系自然冷却至室温。通过恒压分液漏斗向反应液中缓慢滴加 65

mL 6.8% (V/V) H_2O_2 溶液, 控制滴加速度为 1 mL/min, 期间维持体系温度≤30 °C 以避免副反应。将上述混合溶液转移至 4 °C 环境静置 12 h, 随后于 10 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。采用截留分子质量 500 u 的透析袋对离心液进行纯化(超纯水为透析介质, 每 2 h 更换 1 次, 共 3 次), 最终透析液于 4 °C 避光保存备用。

1.3 手性 MoS_2 QDs 的合成

手性 MoS_2 QDs 的合成方法参考文献[14]合成。将 0.125 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加入 40 mL 的超纯水中, 用 0.1 mol/L 盐酸将 pH 值调节至 6.5, 然后加入 *L*-Cys(或 *D*-Cys)0.25 g。上述混合物经超声波溶解后, 在特氟龙内衬的不锈钢高压釜中以 200 °C 的温度加热 12 h。水热溶液在室温下冷却 12 h, 8 000 r/min 离心 6 min, 然后 500 u 透析 12 h。最后, 用 0.22 μm 过滤器收集手性 MoS_2 QDs, 并 4 °C 储存, 备用。

1.4 MTT 法检测手性 SQDs 和手性 MoS_2 QDs 对 MCF-7 和 MARC-145 细胞增殖的影响

将 MCF-7 细胞(或 MARC-145 细胞)以适当密度接种于 96 孔板中(每孔 100 μL , 约含 1×10^4 个细胞), 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养至细胞融合度达到 80%~90%。弃去孔板中的培养基, 分别加入 100 μL 含不同质量浓度(0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.0、1.5、2.0、2.5、4.0 mg/mL)手性 SQDs(或手性 MoS_2 QDs)的培养基, 将 96 孔板置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中分别孵育 24 h 和 48 h。孵育结束后, 弃去含 SQDs(或 MoS_2 QDs)的培养基, 每孔加入 100 μL 新鲜维持液及 20 μL MTT 溶液(5.0 mg/mL, PBS 配制), 继续避光培养 3~4 h。吸弃上清液, 每孔加入 150 μL DMSO, 于室温水平摇床上避光振荡 10 min 以充分溶解甲臜结晶。使用多功能酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度(OD 值), 并计算细胞相对存活率。

1.5 手性 SQDs 细胞内化实验

将 MCF-7 细胞以适当密度接种于 24 孔板中, 置于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养至细胞融合度达到 70%~80%。随后, 分别加入含手性 SQDs(*L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs)的培养基处理细胞 12 h。孵育结束后, 用预冷的 1×PBS 缓冲液轻柔洗涤细胞 2~3 次, 以去除未内化的 SQDs。接着, 用 4% 戊二醛溶液于室温固定细胞 15 min, 固定完成后再次用 1×PBS 洗涤细胞 2~3 次。最后, 使用 CLSM 观察并采集细胞荧光图像, 定性分析手性 SQDs 的细胞内化

行为。

1.6 手性 SQDs 细胞摄取实验

在 24 孔细胞培养板接种合适密度的 MCF-7 细胞,待细胞贴壁生长至 70%~80% 融合度时,更换含不同手性 SQDs(*L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs)的培养基,持续处理 12 h 后,用预冷的 1×PBS 缓冲液洗涤细胞 2~3 次,去除未摄取的 SQDs。采用 0.25% 胰酶消化液于 37 °C 消化细胞 2~3 min,待细胞脱壁后立即加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基终止消化反应。将细胞悬液转移至离心管中,于 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清后用 1×PBS 重悬细胞并洗涤 3 次。最后,将细胞重悬于 1×PBS 中,使用流式细胞仪检测细胞荧光强度,定量分析手性 SQDs 的细胞摄取量。

1.7 ROS 检测实验

采用 DCFH-DA 探针法检测细胞内 ROS 水平。将 MCF-7 细胞接种于 6 孔板中,培养至细胞融合度达到 70%~80% 后,分别用含手性 SQDs 和 H₂O₂(阳性对照)的培养基处理 12 h。移除培养基,用 1×PBS 缓冲液洗涤细胞 2~3 次,随后加入 1.0 mL 5 μmol/L DCFH-DA 工作液,避光孵育 30 min。孵育完成后,

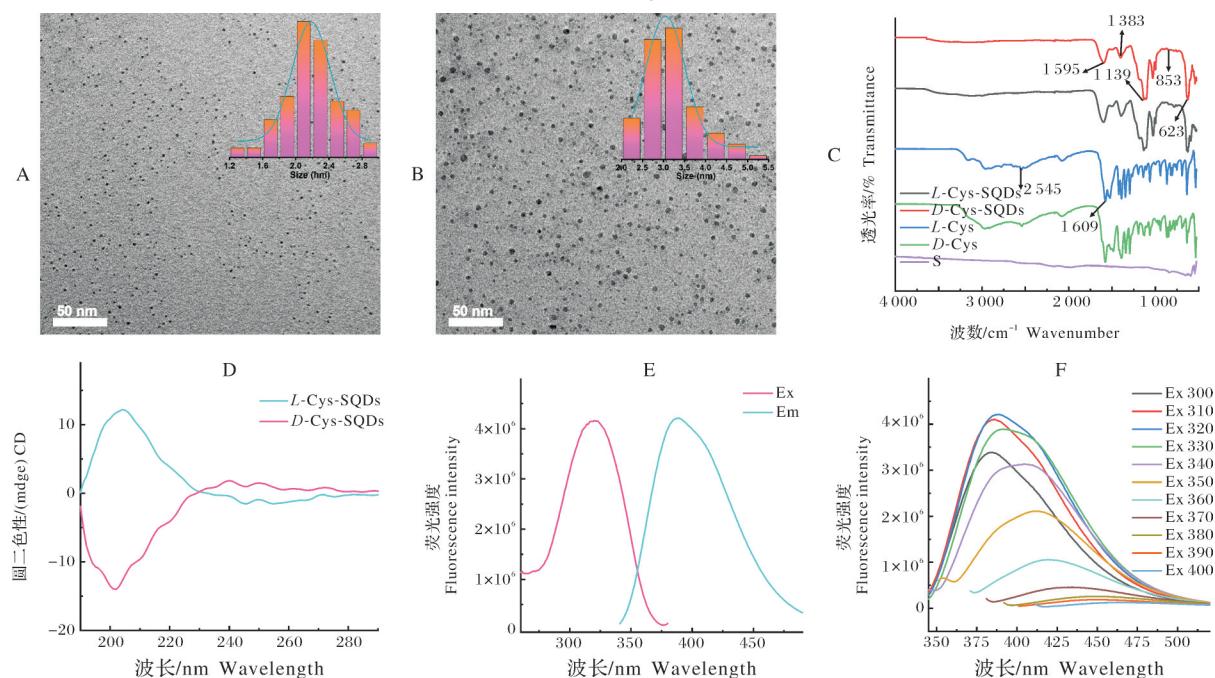
弃去 DCFH-DA 工作液,用 1×PBS 洗涤细胞 2~3 次。

对于定性分析,使用倒置荧光显微镜观察并采集细胞荧光图像,以未处理组 MCF-7 细胞作为阴性对照。对于定量分析,用 0.25% 胰酶消化液消化细胞,加入含 2% FBS 的 DMEM 培养基终止消化,离心收集细胞后用 1×PBS 洗涤 3 次,最后将细胞重悬于 1×PBS 中,使用流式细胞仪检测荧光强度,分析细胞内 ROS 水平。

2 结果与分析

2.1 手性 SQDs 的表征

通过透射电子显微镜(TEM)对手性 SQDs 的形貌进行表征(图 1A, B),结果表明,*L*-Cys-SQDs(图 1A)和*D*-Cys-SQDs(图 1B)均呈单分散状态,且具有典型的球形形貌。粒径统计分析显示,*L*-Cys-SQDs 的平均直径为 (2.2±0.2) nm(图 1A),而 *D*-Cys-SQDs 的平均直径为 (3.2±0.3) nm(图 1B),表明手性源对 SQDs 的尺寸具有调控作用。傅里叶变换红外光谱分析 *L*-Cys-SQDs、*D*-Cys-SQDs、*L*-Cys、*D*-Cys 和升华硫,结果如图 1C 所示,位于 1 383 cm⁻¹ 处



A: *L*-Cys-SQDs 的 TEM 图像 TEM image of *L*-Cys-SQDs; B: *D*-Cys-SQDs 的 TEM 图像 TEM image of *D*-Cys-SQDs; C: *L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs 的傅里叶变换红外光谱图 Fourier-transform infrared spectrograms; D: CD 光谱 Circular dichroic spectrograms of *L*-Cys-SQDs and *D*-Cys-SQDs; E: SQDs 的最佳激发和最佳发射光谱 Optimal excitation and optimal emission spectra of SQDs; F: SQDs 的不同激发光谱下的发射光谱图 Emission spectrograms of SQDs under different excitation spectra.

图 1 手性 SQDs 的表征

Fig.1 Characterization of chiral SQDs

的特征峰归属于C=O(COO⁻)的对称伸缩振动^[15]。2 545 cm⁻¹处巯基(S-H)的伸缩振动峰消失,表明L-Cys中的S-H在H₂O₂氧化作用下形成了二硫键(S-S),即转化为胱氨酸结构。同时羰基(COO⁻)的伸缩振动从1 609 cm⁻¹移动到了1 595 cm⁻¹,进一步证实羧基通过氢键与其他L-Cys分子发生相互作用。此外,623 cm⁻¹处的特征峰进一步验证了S-S键的存在,而853 cm⁻¹和1 139 cm⁻¹处的特征峰分别归属于S-O和S=O的伸缩振动,表明H₂O₂处理后成功将含氧基团引入SQDs结构中。基于以上分析,可以推断L-Cys通过化学键合作用修饰在SQDs表面^[16]。CD分析结果如图1D所示,L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs在200 nm处表现出正负相反的镜像对称CD信号,证实所制备的SQDs具有手性特征^[17]。荧光光谱分析(图1E)表明L-Cys-SQDs的最佳激发波长为320 nm,最佳发射波长为388 nm,呈现蓝色荧光发射,表明其可作为细胞内荧光探针。此外,图1F显示L-Cys-SQDs的荧光发射光谱具有激发波长依赖性,随着激发波长的增加,发射峰逐渐红移。以上结果充分证实了手性SQDs的成功制备。

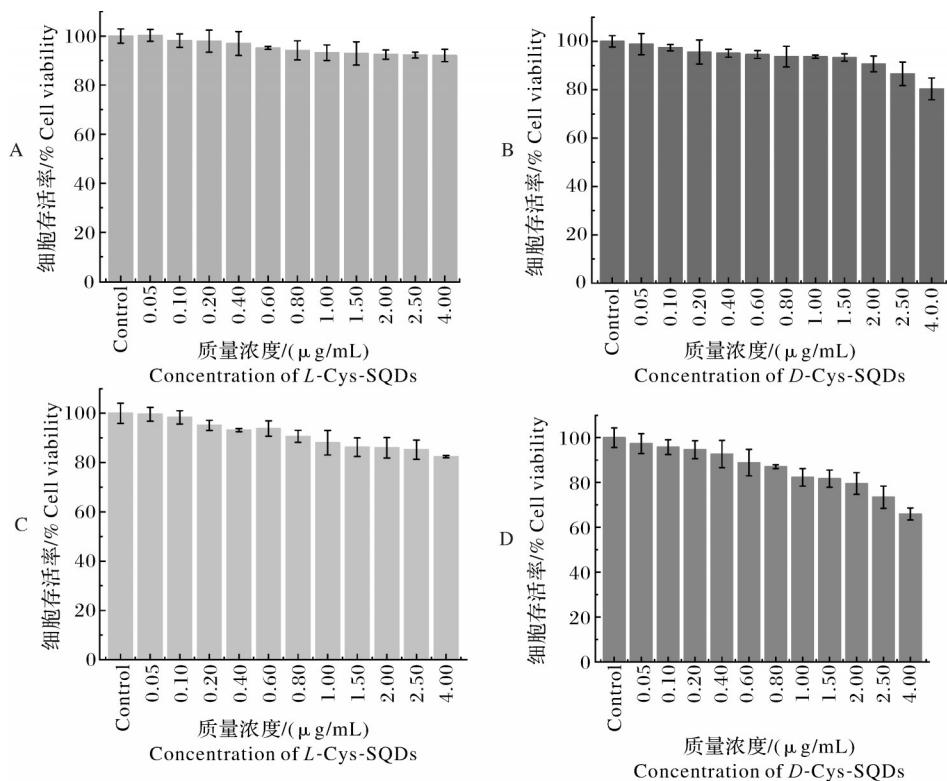


图2 不同质量浓度L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs孵育24 h(A, B)和48 h(C, D)后对MCF-7细胞的细胞毒性效应
Fig.2 Cytotoxicity results of different concentrations of L-Cys-SQDs and D-Cys-SQDs after 24 h(A, B) of incubation and after 48 h(C, D) of incubation on MCF-7 cells

2.2 手性SQDs的细胞毒性评价

为系统评估手性SQDs的细胞毒性效应,采用MTT比色法定量分析SQDs对MCF-7细胞代谢活性的影响,其原理基于线粒体琥珀酸脱氢酶将黄色MTT还原为紫色甲臜晶体的生化过程^[18],通过比色定量可精确反映细胞活力变化。实验设置梯度质量浓度(0.05~4.0 mg/mL)的L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs分别与MCF-7细胞共培养24、48 h,结果显示2种SQDs均呈现显著的浓度依赖性细胞毒性,且其毒性强度呈现显著手性分化(图2)。值得注意的是,L-Cys-SQDs在24 h孵育期间展现出卓越的生物相容性:即使在最高质量浓度4.0 mg/mL条件下,细胞相对活力仍维持92.1%;延长孵育时间至48 h后,其细胞活力仅轻微下降至82.4%,表明L-Cys-SQDs具有优异的时间耐受性。D-Cys-SQDs则表现出时间依赖性增强的细胞毒性效应:孵育24 h时,4.0 mg/mL处理组细胞活力已显著降至80.4%;当孵育时间延长至48 h,该质量浓度下细胞活力进一步下降至66.0%,较L-Cys-SQDs同条件处理组降低16.4%,其显著的细胞毒性差异可能源于立体选择性。

为系统评估手性 SQDs 对正常细胞的毒性效应,本研究选用 MARC-145 细胞模型,通过质量浓度梯度实验(25~750 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别探究 L-/D-Cys-SQDs 及 L-/D-Cys-MoS₂ QDs 的生物相容性差异。MTT 检测结果显示(图 3A、B),2 种手性 SQDs 均表现出浓度依赖性细胞毒性,但其毒性强度呈现显著手性分化:L-Cys-SQDs 在 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 暴露下仍维持 88.2% 的细胞相对活力,而 D-Cys-SQDs 组活力显著下降至 78.8%,表明 L 型修饰赋予 SQDs 更优异的生物相容性。在平行对照实验中,手性 MoS₂ QDs 展现

出更强的细胞毒性效应(图 3C、D),L-Cys-MoS₂ QDs 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组细胞活力为 82.4%,而 D-Cys-MoS₂ QDs 在 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时活力为 81.2%,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时进一步降低至 75.7%。该结果表明手性依赖的毒性普适性:D 型修饰显著增强纳米材料的细胞毒性,此现象在 SQDs 与 MoS₂ QDs 体系中均稳定存在;材料本征毒性差异:SQDs 体系较 MoS₂ QDs 具有更优的生物安全性。综上,手性修饰与材料化学组成共同决定了纳米 QDs 的生物效应,为纳米药物的安全性评估提供了依据。

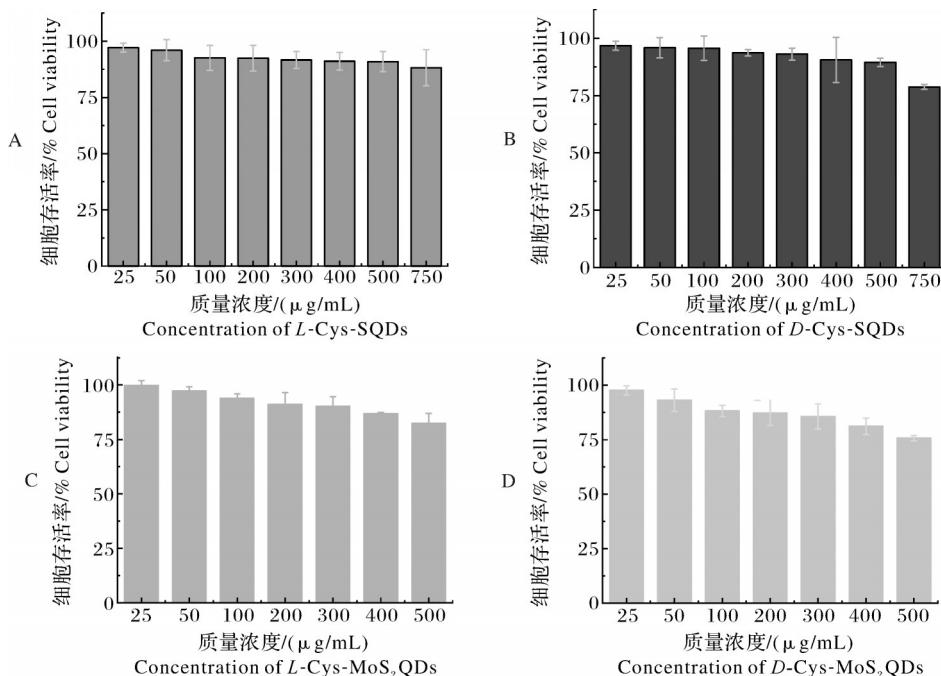


图 3 不同质量浓度 L-Cys-SQDs(A)、D-Cys-SQDs(B)、L-Cys-MoS₂ QDs(C) 和 D-Cys-MoS₂ QDs(D)
孵育 24 h 后对 MARC-145 细胞的细胞毒性效应

Fig.3 Cytotoxicity results of different concentrations of L-Cys-SQDs(A), D-Cys-SQDs(B), L-Cys-MoS₂ QDs(C) and D-Cys-MoS₂ QDs(D) after 24 h of incubation on MARC-145 cells

2.3 手性 SQDs 的细胞内化行为及其机制

纳米粒子的细胞摄取量与其纳米毒性密切相关。基于 SQDs 优异的光学性质及手性依赖的生物毒性差异,本研究将 MCF-7 细胞分别与 L-Cys-SQDs 和 D-Cys-SQDs 共培养,通过 CLSM 和 FCM 系统研究了手性 SQDs 的细胞内化行为。CLSM 观察结果表明(图 4A),未处理组 MCF-7 细胞未检测到明显的荧光信号。相比之下,L-Cys-SQDs 处理组(图 4B)的荧光强度显著高于 D-Cys-SQDs 处理组(图 4C),表明 L-Cys-SQDs 的细胞内化量明显高于 D-Cys-SQDs。这一结果通过 FCM 定量分析得到进一步验证(图 4E,F)。定量数据显示,与对照组相比,L-Cys-SQDs 和 D-Cys-SQDs 分别使 MCF-7

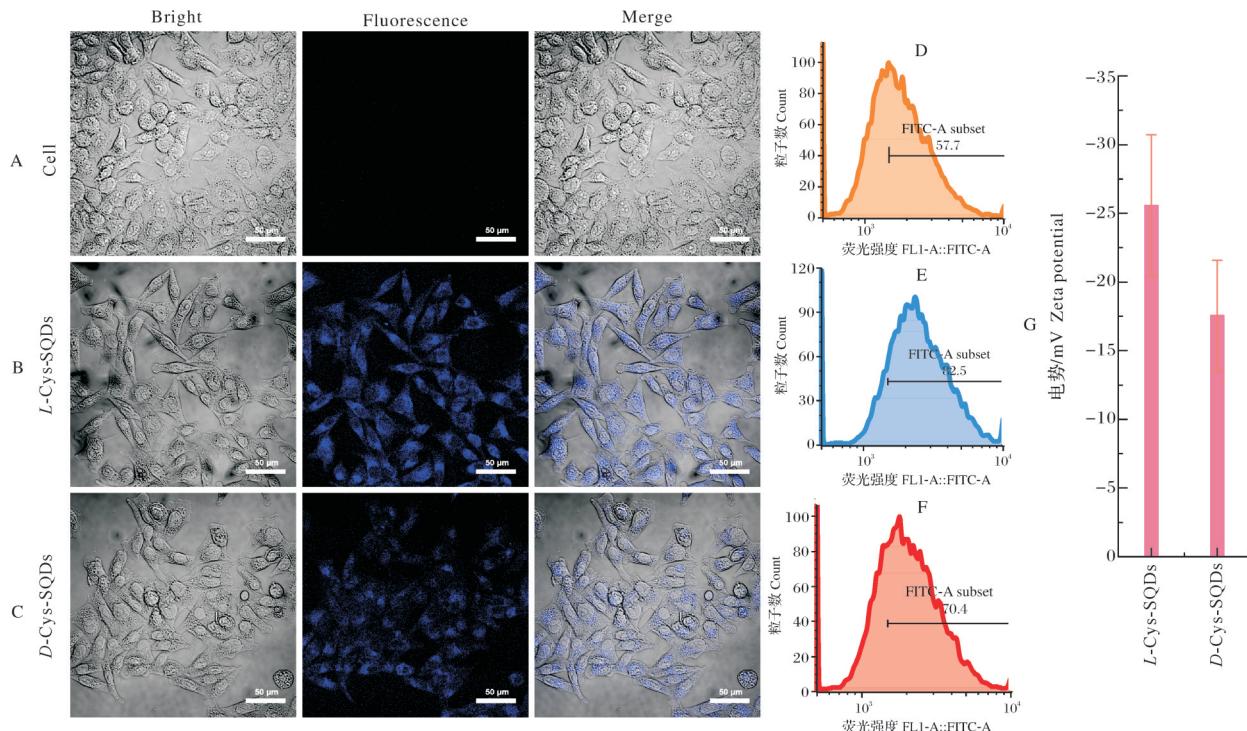
细胞的荧光强度增加 24.8% 和 12.7%,即 L-Cys-SQDs 的细胞内化量约为 D-Cys-SQDs 的 2 倍,表明 MCF-7 细胞对 SQDs 的摄取具有显著的手性依赖性。

尽管 L-Cys-SQDs 优先内化的具体机制尚不完全明确,但可能与以下因素有关:一是尺寸效应:L-Cys-SQDs 的平均直径(2.2 nm)小于 D-Cys-SQDs(3.2 nm),在相同质量浓度(4.0 mg/mL)下,L-Cys-SQDs 的颗粒数浓度更高,这可能促进了其细胞内化^[19]。二是表面蛋白质吸附:研究表明,纳米粒子的表面手性对其细胞摄取的影响强烈依赖于蛋白质吸附行为^[20]。白蛋白等蛋白质的吸附可能削弱甚至屏蔽表面手性的影响^[21],而 L-Cys-SQDs 较小的尺寸

可能使其表面蛋白质吸附模式与 *D*-Cys-SQDs 存在差异,从而影响内化效率。以上结果表明, SQDs 的尺寸和表面手性共同调控其细胞内化行为,这为理解手性纳米材料的生物相互作用提供了重要参考。

Zeta 电位是影响药物内化的关键因素,基于纳米颗粒表面电荷(Zeta 电位)与细胞摄取效率的密切关联性,本研究系统分析了 *L*-/*D*-Cys-SQDs 的电位特

性及其生物学意义。实验结果显示(图 4G),*L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs 均呈现负电荷,但 *L* 型 Zeta 电位绝对值显著高于 *D* 型 [(-25.6 ± 5.2) mV vs. (-17.6 ± 4.0) mV]。研究表明,正/负 Zeta 电位绝对值越大,与细胞膜的静电相互作用越强,吞噬效率越高,高 Zeta 电位通过增强纳米颗粒与细胞膜的静电吸附,促进内吞作用;而近中性电位则显著降低吞噬速率,实验结果和研究报道一致^[22]。



A: MCF-7 细胞在处理 12 h 未加入 SQDs 的细胞图像 SQDs MCF-7 cells after treated for 12 h of cellular images without the addition of SQDs; B: MCF-7 细胞在处理 12 h 加入 *L*-Cys-SQDs 的细胞图像 Cell images of MCF-7 cells treated for 12 h with the addition of *L*-Cys-SQDs; C: MCF-7 细胞在处理 12 h 加入 *D*-Cys-SQDs 的细胞图像 Cell images of MCF-7 cells treated for 12 h with the addition of *D*-Cys-SQDs; D: 未加入 SQDs 的流式细胞图 Flow cytogram without the addition of SQDs; E: 加入 *L*-Cys-SQDs 的流式细胞图 Flow cytogram without the addition of *L*-Cys-SQDs; F: 加入 *D*-Cys-SQDs 的流式细胞图 Flow cytogram without the addition of *D*-Cys-SQDs; G: *L*-Cys-SQDs, *D*-Cys-SQDs 的 Zeta 电势图 Zeta potential of *L*-Cys-SQDs and *D*-Cys-SQDs.

图 4 手性 SQDs 进入后的 MCF-7 细胞量及 Zeta 电势

Fig.4 The amount of chiral SQDs into MCF-7 cells was probed by laser confocal images and flow cytometry and the Zeta potential of chiral SQDs

2.4 手性 SQDs 的 ROS 生成水平

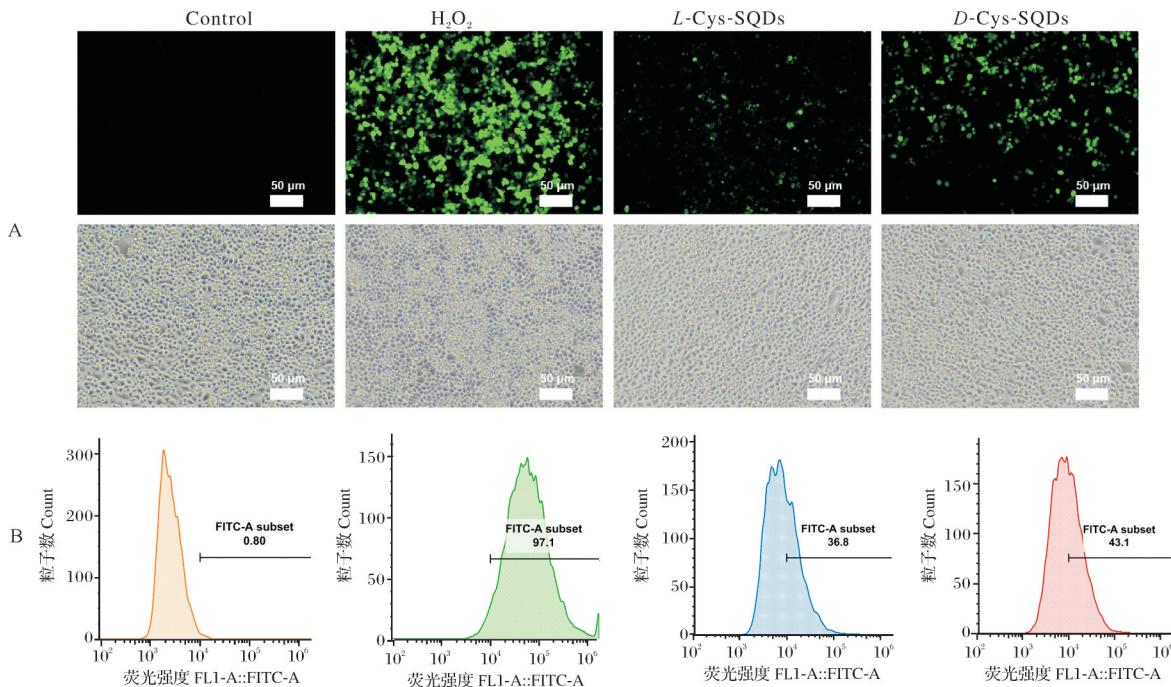
氧化应激是纳米颗粒暴露相关的最重要且最常见的毒性机制之一。研究表明,过量产生的 ROS 可导致蛋白质和 DNA 的氧化损伤,从而介导纳米颗粒的细胞毒性^[23]。此外,ROS 的存在会增强荧光染料的染色强度,并引起发射光谱的红移^[24]。基于此,本研究通过检测 ROS 生成水平,探讨了 *L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs 的毒性机制。实验结果显

示,与未处理的 MCF-7 细胞(空白和阳性对照)相比,用 4.0 mg/mL 的 *L*-Cys-SQDs 和 *D*-Cys-SQDs 处理细胞 12 h 后,ROS 生成量显著增加(图 5A),而 *D*-Cys-SQDs 诱导的 ROS 水平明显高于 *L*-Cys-SQDs。这一结果通过 FCM 定量分析得到进一步验证(图 5B),表明 *D*-Cys-SQDs 具有更强的 ROS 诱导能力。

上述结果表明,表面手性在纳米尺度上对细胞毒性的影响与 ROS 生成水平密切相关。尽管 *L*-

Cys-SQDs的细胞内化量显著高于D-Cys-SQDs,但其诱导的ROS水平却低于后者(43.1 vs. 36.8),表现出一种低摄取量-高生物效应的现象。这种负相关性提示,SQDs的细胞毒性可能由多种机制共同调控,其中细胞内ROS的差异起主导作用。具体而言,D-Cys-SQDs可能通过以下途径诱导更强的氧化应激。表面化学特性:D-Cys-SQDs的表面手性

可能更易与细胞内的氧化还原敏感分子相互作用,且ROS类型之一可能为羟基自由基^[25];细胞内分布:D-Cys-SQDs可能在细胞内的特定区域(如线粒体)富集,从而更有效地干扰细胞的氧化还原平衡。这些发现为理解手性纳米材料的毒性机制提供了新的视角,同时也强调了ROS在纳米毒性中的核心作用。



A:倒置荧光图 Inverted fluorescence plot; B:流式细胞图 Flow cytogram.

图5 4.0 mg/mL SQDs的L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs暴露12 h后对ROS生成的影响

Fig.5 Effect of SQDs concentration of 4.0 mg/mL L-Cys-SQDs and D-Cys-SQDs respectively on ROS generation after 12 h of exposure

3 讨 论

本研究成功合成了2种新型手性SQDs,分别以L-Cys和D-Cys作为手性修饰剂,制备了L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs。除表面手性分子构型相反外,L-Cys-SQDs和D-Cys-SQDs具有相似的物理化学性质(如尺寸、表面官能团及光学特性),因此,其细胞行为的差异主要归因于表面手性分子的空间构型。实验结果表明,SQDs对MCF-7细胞的毒性表现出显著的手性和形状依赖性。其中,D-Cys-SQDs的细胞毒性显著高于L-Cys-SQDs。进一步研究发现,细胞毒性与SQDs的细胞内化量呈负相关,而与细胞内ROS水平呈正相关。这种低摄取量-高生物效应的现象表明,SQDs的细胞毒性不仅取决于其细胞内化效率,还与其诱导氧化应激的能力密切相关。

这些发现为通过生物分子修饰和表面结构设计调控纳米材料的生物相容性提供了重要见解。同时,本研究也为开发基于手性SQDs的新型生物医学应用(如靶向药物递送和生物成像)开辟了新的研究方向。本研究揭示了手性SQDs的“构型依赖性毒性”现象,并发现低摄取量-高生物效应的现象,突破了传统纳米材料“摄取量-毒性正相关”的认知框架。此外,本研究所建立的手性表面工程策略为精准调控SQDs的生物效应提供了新思路,不仅拓展了手性纳米材料在疾病诊疗中的应用潜力,也为低毒功能化QDs的设计奠定了基础。

参考文献 References

- [1] LI S X, CHEN D J, ZHENG F Y, et al. Water-soluble and lowly toxic sulphur quantum dots[J]. Advanced functional ma-

- terials, 2014, 24(45):7133-7138.
- [2] 刘佳欣, 彭大鹏, 梁建功, 等. 硫量子点的合成及其分析应用研究进展[J]. 分析科学学报, 2022, 38(1):108-114. LIU J X, PENG D P, LIANG J G, et al. Progress in synthesis and analytical application of sulfur quantum dots[J]. Journal of analytical science, 2022, 38(1):108-114 (in Chinese with English abstract).
- [3] 廖静, 刘承昊, 朱云霄, 等. 硫量子点的合成及其在光学传感中的应用[J]. 发光学报, 2024, 45(9):1431-1444. LIAO J, LIU C H, ZHU Y X, et al. Synthesis of sulfur quantum dots and their application in optical sensing[J]. Chinese journal of luminescence, 2024, 45(9):1431-1444 (in Chinese with English abstract).
- [4] MA S L, WEN T, MO Z M, et al. One-pot synthesis of fluorescent guanidyl sulfur quantum dots for antibacterial and antioxidant performance[J]. ACS applied nano materials, 2025, 8(9):4580-4590.
- [5] NING K K, FU Y, WU J H, et al. Inner filter effect-based redshift and fluorescence dual-sensor platforms with sulfur quantum dots for detection and bioimaging of alkaline phosphatase[J]. Analytical methods, 2023, 15(1):79-86.
- [6] GAO P X, HUANG Z Y, TAN J S, et al. Efficient conversion of elemental sulfur to robust ultrabright fluorescent sulfur quantum dots using sulfur-ethylenediamine precursor[J]. ACS sustainable chemistry & engineering, 2022, 10(14):4634-4641.
- [7] GAIFULLINA E T, SHMELEV A G, GATAULLINA R M, et al. Sulfur quantum dots stabilized by myristyl trimethylammonium bromide [J/OL]. Optical materials, 2024, 157: 116269 [2025-05-14]. <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2024.116269>.
- [8] XIA H T, DING R, XIA C, et al. Triple effective water treatment agent; P(AA/AMPS) capped sulfur quantum dots boast remarkable antiscale, antibacterial, and real-time tracking capabilities[J/OL]. Desalination, 2024, 589:117979 [2025-05-14]. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2024.117979>.
- [9] LIU J S, WEI J W, XIAO S Q, et al. Multienzyme-activity sulfur quantum dot nanozyme-mediated cascade reactions in whole-stage symptomatic therapy of infected bone defects[J]. ACS nano, 2025, 19(7):6858-6875.
- [10] WANG Y, ZHAO Y N, WU J L, et al. Negatively charged sulfur quantum dots for treatment of drug-resistant pathogenic bacterial infections[J]. Nano letters, 2021, 21(22):9433-9441.
- [11] JIANG W J, HE R, LV H, et al. Chiral sensing of tryptophan enantiomers based on the enzyme mimics of β -cyclodextrin-modified sulfur quantum dots[J]. ACS sensors, 2023, 8(11): 4264-4271.
- [12] HASAN H, KULBIR, KUMAR P, et al. Efficient mechanochemical conversion of elemental sulfur to circularly polarized luminescent sulfur quantum dots[J]. The journal of physical chemistry C, 2024, 128(19):8114-8122.
- [13] ZHAO L, SHA T J, LIU Y F, et al. Rapid and large-scale synthesis of chiral and fluorescent sulfur quantum dots for intracellular temperature monitoring[J]. Chemical & biomedical imaging, 2024, 2(12):817-824.
- [14] ZHONG Y P, GUO L J, ZOU Y B, et al. Cys-functionalized MoS₂ quantum dots and calcium ion for ratiometric fluorescence probes for doxycycline[J]. ACS applied nano materials, 2023, 6(23):22355-22362.
- [15] GHANBARI S, AHOUR F, KESHIPOUR S. An optical and electrochemical sensor based on L-arginine functionalized reduced graphene oxide[J/OL]. Scientific reports, 2022, 12(1): 19398 [2025-05-14]. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23949-5>.
- [16] MA Q, ZU Y Y, GUAN Y N, et al. Small molecule L-cysteine assisted synthesis of green fluorescent sulfur quantum dots for nimesulide sensing and bioimaging [J/OL]. Microchemical journal, 2023, 190: 108734 [2025-05-14]. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108734>
- [17] HASAN H, AZHAR M I, BEHERA S K, et al. Emerging chiral sulfur-based nanomaterials for chiroptical applications[J]. Nanoscale, 2024, 16(48):22065-22076.
- [18] 范晓霞. 手性无机纳米材料抗猪繁殖与呼吸综合征病毒的机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2024. FAN X X. Preparation of chiral inorganic nanomaterials and their selective antiviral effects on porcine reproductive and respiratory syndrome virus [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2024 (in Chinese with English abstract).
- [19] DENG J, YAO M Y, GAO C Y. Cytotoxicity of gold nanoparticles with different structures and surface-anchored chiral polymers[J]. Acta biomaterialia, 2017, 53:610-618.
- [20] DENG J, ZHENG H H, GAO C Y. Influence of protein adsorption on the cellular uptake of AuNPs conjugated with chiral oligomers[J]. Materials chemistry frontiers, 2017, 1(3): 542-549.
- [21] LI C S, LIU J, ZHANG Q Q, et al. Combined effect of nanoparticles of silver and silica to HeLa cells: synergistic internalization and toxicity[J]. Environmental toxicology, 2025, 40(5):802-816.
- [22] 于洁, 郑茂盛, 肖超妮, 等. 纳米药物状态对药物吸收影响的灰色关联度分析[J]. 药学学报, 2015, 50(9):1096-1100. YU J, ZHENG M S, XIAO C N, et al. Gray relational analysis for the effect of nano-drug features on drug absorption [J]. Acta pharmaceutica sinica, 2015, 50 (9) : 1096-1100 (in Chinese with English abstract).
- [23] SHARMA V, SINGH P, PANDEY A K, et al. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles[J]. Mutation research, 2012, 745(1/2):84-91.
- [24] ARANDA A, SEQUEDO L, TOLOSA L, et al. Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative

- method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells [J]. *Toxicology in vitro*, 2013, 27(2):954-963.
- [25] XIE X L, BIAN J, SONG Y, et al. *In situ* fluorescence imaging reveals contribution of cerebral hydroxyl radicals in hyperhomocysteinemia-induced Alzheimer-like dementia [J]. *Analytical chemistry*, 2023, 95(26):9872-9880.

Mechanism of differential cytotoxicity of *L-/D-cysteine modified chiral sulfur quantum dots* on human breast cancer MCF-7 cells

NING Keke, LIANG Jiangong

College of Chemistry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Sulfur quantum dots (SQDs), as an emerging class of non-metallic quantum dots (QDs), have attracted much attention in the biomedical field due to their characteristics of unique biocompatibility and low cytotoxicity. However, there is still a lack of systematic studies on the interaction mechanism of their chiral surface properties with biological systems. This article successfully constructed enantiomeric SQDs (*L-/D-Cys-SQDs*) with mirror symmetry structure based on the chiral surface engineering strategy using *L-cysteine* (*L-Cys*) and *D-cysteine* (*D-Cys*) as chiral ligands. The results of circular dichroism (CD) analysis showed that the enantiomeric structures of *L-Cys-SQDs* and *D-Cys-SQDs* were identical. Cys-SQDs had positive and negative mirror symmetry signals at 200 nm, clarifying their differences in chiral conformation. Human breast cancer MCF-7 cells were used as a model to systematically evaluate the conformational relationship of SQDs. The results of MTT assay showed that the cell viability of the *L-Cys-SQDs* group after 48 h treatment with 4.0 mg/mL SQDs, was 80.4%, while that of the *D-Cys-SQDs* group was significantly reduced to 66.0%, indicating that the *D*-configuration SQDs enhance the toxicity. The results of flow quantitative analysis showed that the cellular uptake of *D-Cys-SQDs* was 12.1% lower than that of *L-Cys-SQDs*, indicating a negative correlation between the cell internalization efficiency and toxicity. The results of the DCFH-DA probe assay showed that the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was elevated in the cells induced by *D-Cys-SQDs* compared with that of *L-Cys-SQDs*. The “configuration-dependent toxicity” phenomenon of chiral SQDs was revealed and the phenomenon of low uptake-high bioeffects was found, breaking through the traditional cognitive framework of “positive uptake-toxicity correlation” of nanomaterials. The chiral surface engineering strategy established will provide a new idea to precisely regulate the biological effects of SQDs, with both expanding the potential of chiral nanomaterials in the diagnosis and treatment of diseases and laying the foundation for designing the functionalized QDs with low-toxicity.

Keywords chiral; nanomaterials; sulfur quantum dots (SQDs); cytotoxicity; cell internalization; cellular uptake; reactive oxygen species (ROS)

(责任编辑:陆文昌)