

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190307008

赵宇侠, 李晨红, 黎文明, 等. 量子点对 Cu^{2+} 诱导 L02 细胞毒性的影响及机理研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(5): 195-201

Zhao Y X, Li C H, Li W M, et al. Effects and mechanism of quantum dots on Cu^{2+} induced L02 cytotoxicity [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(5): 195-201 (in Chinese)

量子点对 Cu^{2+} 诱导 L02 细胞毒性的影响及机理研究

赵宇侠^{1,*}, 李晨红¹, 黎文明², 王志正¹, 韩秋琴¹, 陈培清¹

1. 上海健康医学院协同科研中心, 上海 201318

2. 国立药材研究院人参医药研究中心, 越南胡志明市 800010

收稿日期: 2019-03-07 录用日期: 2019-06-24

摘要: 量子点(QDs)和 Cu^{2+} 可能共存于肝脏, 对肝细胞产生联合毒性, 威胁人体健康。本研究以人胚肝细胞(L02)为研究对象, 考察了低/无毒的 QDs(3.6%的细胞致死率)对 Cu^{2+} 诱导 L02 细胞毒性的影响及相关机理, 为其可能的健康和环境风险提供参考。结果显示, QDs 的加入使得 Cu^{2+} 的细胞毒性有了很大的提高, 细胞存活率最高下降了 26.0%, 两者表现为协同作用; 另外 QDs 存在使得 Cu^{2+} 细胞蓄积量增大, 伴随着 Cu^{2+} 天然解毒蛋白 CTR1 和 ATP7A 等表达水平的升高, 从侧面印证了 Cu^{2+} 的蓄积量增加对细胞的影响; 同时, QDs 的存在使得细胞乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)泄露相对于 Cu^{2+} 单独处理组提高, 暗示 QDs 可能破坏了细胞膜, 导致 Cu^{2+} 在细胞内蓄积量增加, 从而使细胞毒性增加, 两者的联合毒性表现为协同作用。

关键词: 量子点纳米; Cu^{2+} ; L02 细胞; 联合毒性; 细胞膜; 蓄积量

文章编号: 1673-5897(2019)5-195-07 中图分类号: R361.3 文献标识码: A

Effects and Mechanism of Quantum Dots on Cu^{2+} Induced L02 Cytotoxicity

Zhao Yuxia^{1,*}, Li Chenhong¹, Li Wenming², Wang Zhizheng¹, Han Qiuqin¹, Chen Peiqing¹

1. Collaborative Scientific Research Centre, Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China

2. Research Center of Ginseng and Medicinal Materials, National Institute of Medicinal Materials, Ho Chi Minh City 800010, Viet Nam

Received 7 March 2019 accepted 24 June 2019

Abstract: Quantum dots nanoparticles (QDs) and Cu^{2+} may coexist in the liver, threatening human health based on the hepatocytotoxicity induced by these two chemicals. In this study, human embryonic hepatocytes (L02) were used to investigate the effects of low/non-toxic QDs on Cu^{2+} -induced L02 cytotoxicity and the associated mechanism, which may provide a reference for health security and environmental risks assessment of QDs. The results showed that the addition of QDs greatly improved the individual Cu^{2+} -induced cytotoxicity, with cell survival rate decreased by 26.0% at the highest level, indicating the synergistic effects between these two chemicals. In addition, the presence of QDs increased the accumulation of Cu^{2+} in the cells, accompanied by the increase of Cu^{2+} detoxification-protein including CTR1 and ATP7A expression level, which partly confirm the higher Cu accumulation in the cells compared to the treatments without QDs addition. Simultaneously, the existence of QDs makes the lactate dehydrogenase (LDH) leakage of cells higher than that of single Cu^{2+} treated groups, suggesting that QDs may

基金项目: 国家自然科学基金“量子点与 Cu^{2+} 对 L02 细胞联合毒性的木马机理研究”项目(21307031); 上海健康医学院种子基金项目(E1-0200-19-201132); 上海健康医学院百人库项目(B1-0200-19-311133)

作者简介: 赵宇侠(1974—), 女, 博士, 研究方向为纳米毒理及中药药理学, E-mail: maryzyx@163.com

damage the cell membrane, leading to increased accumulation of Cu^{2+} in the cell and the cytotoxicity was thus increased, so the synergistic effects of these two chemicals were observed.

Keywords: quantum dot nanoparticles; Cu^{2+} ; L02 cells; combined toxicity; cell membrane; accumulative capacity

量子点(QDs)一般由 II ~ VI 族或 III ~ V 族元素构成,也称半导体纳米微晶体,由于其粒径很小(约 2 ~ 10 nm),电子和空穴被量子限域而被称为量子点。QDs 以其稳定的荧光性和不易降解等特点在生物和医学领域中用于体内成像及细胞标记^[1-5]。此外,QDs 的小粒径及大比表面积也赋予了其高反应活性,这使得 QDs 很容易与共存环境的其他物质以各种方式结合,比如 QDs 能够结合 Cu^{2+} ,并且基于结合后量子点荧光变化的特性衍生出用 QDs 检测 Cu^{2+} 浓度的方法^[6-7]。

铜元素是生物体正常生命代谢活动过程必需的微量矿物质元素,主要以酶结合金属的形式广泛参与各种生命活动。铜构成了多酚氧化酶、细胞色素氧化酶、抗坏血酸氧化酶、多胺氧化酶和锌超氧化物歧化酶(Zn-SOD)等的蛋白质的重要辅因子,主要通过参与呼吸代谢中的氧化还原反应来参与代谢;然而,尽管铜是生物体所必需的元素,稍微过量的铜便会干扰细胞代谢和离子平衡,对生物体乃至生态系统的微生物和植物产生毒害作用^[8-9]。肝脏是 Cu^{2+} 蓄积的重要靶器官。 Cu^{2+} 的蓄积会诱导细胞毒性,很多铜代谢相关的缺陷导致 Cu^{2+} 在肝脏内缓慢蓄积最后导致肝脏疾病^[10-12]。

QDs 在生物医学的应用带来了更多的人体暴露机会^[13]。铜的主要的暴露路径是摄食^[14]。肝脏是众所周知的 Cu^{2+} 富集的靶器官。QDs 被证明可以在生物体内系统分布并主要滞留在肝脏内^[15]。因此,QDs 和 Cu^{2+} 可能在肝脏内共存并且 QDs 能够结合肝脏环境中的 Cu^{2+} ,而 QDs 作为纳米材料曾被证明容易绕过细胞膜屏障进入细胞,并且 QDs 产生的活性氧自由基(ROS)有破坏细胞膜的作用,那么两者共存可能通过 QDs 破坏细胞膜,使得 Cu^{2+} 容易进入细胞,导致细胞 Cu^{2+} 蓄积量增加,从而带来细胞毒性增加,引发肝脏疾患的风险。

本研究用人胚肝细胞(L02 细胞)作为肝脏的指示细胞,调查 QDs 的加入对于 Cu^{2+} 细胞毒性的改变,同时考察 QDs 对 Cu^{2+} 细胞蓄积量的影响,该影响可能解释细胞毒性的增加。进一步考核细胞内 Cu^{2+} 泵出蛋白表达的变化验证以上的 Cu^{2+} 蓄积带来的细胞应激变化,通过测定乳酸脱氢酶(LDH)的变

化确定细胞膜的破坏,佐证 QDs 可能通过破坏细胞膜辅助 Cu^{2+} 进入细胞。本研究旨在阐述 QDs 和 Cu^{2+} 的共存对肝脏的可能威胁,以期对纳米材料可能的体内和环境风险评价提供参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

实验所用的人胚肝细胞(L02 细胞)购自中国科学院细胞库。

1.1.2 试剂

无水氯化铜,分析纯,购自 Sigma 试剂公司;DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco[®] 公司;MTT Cell Proliferation Assay Kit 购自北京赛驰生物科技有限公司;Cyto Tox 96[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒购自美国 Promega 公司;量子点 CdTe-MPA(巯基丙酸)由华东理工大学化工学院合成,包覆 MPA,直径为 3.7 nm,发红光,在水相中合成的发射波长为 628 nm,物质的量浓度为 $5.8 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,质量浓度为 $0.64 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,在 pH 值 6 ~ 12 范围内稳定,合成方法参见参考文献^[2],合成后离心收集,用丙醇纯化以去除杂质。

1.1.3 仪器

UV7500 紫外-可见分光光度计,上海天美生物科技有限公司;F7000 型荧光光谱仪,日本日立公司;Tecnai G2 20 型透射电镜(TEM),美国 FEI 公司;Malvern Zetasizer Nano ZS 90 型动态光散射仪(DLS),英国马尔文仪器有限公司;7700 型等离子体质谱(ICP-MS)仪,美国 Agilent 公司;Molecular Imager ChemiDoc[™] XRS⁺ imaging System 凝胶成像系统,BIO-RAD 公司;BioTek Synergy2 多功能酶标仪,美国 BioTek 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 QDs 样品表征

样品在工作电位为 200 kV 时测定 TEM 图像;用 UV7500 紫外-可见分光光度计在光程 1 cm 的光谱池测定样品紫外光谱,发射光谱在 F7000 型荧光光谱仪上测定。采用动态光散射法对 QDs 的水合粒径进行测定,测定条件为 25℃,散射角 90°,激光波长 633 nm。

1.2.2 细胞培养方法

L02 细胞用 DMEM 培养基加入 10% 的胎牛血清(FBS)在 37 ℃、湿度为 95% 和 5% 的 CO₂ 条件下培养。

用不同浓度的 Cu²⁺(0、5、10、20 和 40 μg·mL⁻¹) 溶液单独或与 QDs(200 μg·mL⁻¹)联合处理细胞,培养 24 h 后,用于各项分析。QDs 从 10 mg·mL⁻¹ 的无血清的培养基配制的母液稀释得到,Cu²⁺ 溶液从无菌超纯水配制的 30 mg·mL⁻¹ 的母液稀释得到。

1.2.3 MTT 法测定细胞存活率

取对数生长期细胞接种于 96 孔板(10⁴ 个·孔⁻¹),培养使细胞贴壁,弃培养液,每孔加入含 Cu²⁺ 或 QDs-Cu²⁺ 的培养基,Cu²⁺ 浓度分别为 0、5、10、20 和 40 μg·mL⁻¹,QDs 的浓度为 200 μg·mL⁻¹,每个剂量组设定 3 个复孔置于 5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后,在光学显微镜下观察细胞形态学变化^[14]。然后弃去每孔中的培养液,加入含 10% 噻唑蓝(MTT)(5 mg·mL⁻¹)的 DMEM 培养基(无 FBS),继续培养 4 h 后,弃去 MTT 溶液,每孔加二甲基亚砷(DMSO)150 μL 后,充分振荡至紫色的甲臞结晶完全溶解后,用 BioTek Synergy2 多功能酶标仪测定在 490 nm 波长处的吸光度值,确定相对于 Cu²⁺ 单独处理组,QDs 的加入对 L02 细胞存活率的影响^[16-17]。

1.2.4 LDH 释放的检测

取对数生长期细胞接种于 96 孔板(10⁴ 个·孔⁻¹),细胞贴壁后,选择 0、10、20 和 40 μg·mL⁻¹ 的 Cu²⁺ 单独及与 200 μg·mL⁻¹ 的 QDs 联合处理细胞 24 h,根据 Cyto Tox 96[®] 非放射性细胞毒性检测试剂盒实验步骤操作,用酶标仪在 490 nm 下测定吸光度。

1.2.5 总蛋白提取和蛋白印迹实验(Western blot)

细胞培养和处理同 LDH 实验,给予药物处理 24 h 后,置于冰浴,用提前预冷的 PBS(含蛋白酶抑制剂)清洗细胞 2 次,加 5 mL 冷的 PBS 洗涤,用细胞刮片收集细胞,4 ℃、300×g 离心 5 min,去上清液,加入 1 mL 总细胞裂解液,冰浴 5 min,4 ℃、16 000×g 离心 5 min,取上清,BSA 作为标准蛋白,考马斯亮蓝法测定蛋白质浓度后加入蛋白上样缓冲液并于 100 ℃ 下蛋白变性 5 min,-80 ℃ 备用。

制备 8%~10% 的 SDS-PAGE 胶,上样,以 80 V 电压电泳,待条带跑入分离胶部分,提高到 120 V,跑至距离玻璃板底部 1 cm 左右停止并开始转膜。电流调到 350 mA,NC 膜低温湿转,转膜 1~2 h,用

含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 2 h,加对应的一抗(按比例 1:1 000 稀释)与目的蛋白特异性结合,4 ℃ 孵育过夜,TBST 溶液清洗一抗,加对应二抗(比例 1:1 000 稀释),室温轻摇孵育 1 h,TBST 漂洗 3 次后 ECL 液显色,并在凝胶成像系统上显影,并利用 Image J 软件分析各组条带的灰度值,以 GAPDH 为内参计算各组蛋白的变化情况。

1.2.6 细胞内 Cu²⁺ 含量检测

细胞接种于 6 孔板(10⁵ 个·孔⁻¹),处理浓度同上,培养 24 h 后,离心 5 min(5 000 r·min⁻¹),细胞残留的上清液从孔中吸出,细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次以除去细胞表面残留的 Cu²⁺。200 μL 的 Tritonx-100(0.5% 质量浓度)溶液加入孔中以裂解细胞。细胞再放入 -20 ℃ 的冰箱中反复冻融直至完全裂解。离心 10 min(10 000 r·min⁻¹),收集上清液采用火焰原子吸收光谱法,以铜特征线(共振线)324.7 nm 为分析线,用 ICP-MS 仪检测 Cu²⁺ 浓度,每个实验设 3 组平行。

1.2.7 统计分析

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 Origin7.5 软件对数据进行单因素方差分析和 T-test 检验,* 表示以 $P<0.05$ 置信度下的差异有显著性,代表 QDs-Cu²⁺ 联合处理样品相比于单独 Cu²⁺ 处理的差异显著。

2 结果(Results)

2.1 QDs 纳米粒子的表征

如图 1(a)所示,合成的量子点 CdTe-MPA 纳米粒子的尺寸较均匀,大致呈球形,平均粒径约为 2~10 nm。DLS 结果显示 QDs 水合粒径为 100 nm 左右,在水溶液中会有部分团聚,分散较均匀(图 1(b));紫外可见吸收光谱法测得 QDs 在 530 nm 以下吸收较好(图 1(c));荧光强度在 610 nm 左右达到峰值(图 1(d))。

2.2 QDs 对 Cu²⁺ 诱导的细胞毒性的影响

用 MTT 实验和细胞形态变化来评估 QDs 对 Cu²⁺ 诱导的细胞毒性。结果表明,QDs 作用 24 h 后,对 L02 细胞的毒性较低,单独的 200 μg·mL⁻¹ QDs 细胞致死率约为 3.6%(表 1);不同浓度的 Cu²⁺ 处理 24 h 后,随着剂量的增大,细胞增殖能力明显下降,呈剂量-效应关系;200 μg·mL⁻¹ QDs 的加入能显著提高 Cu²⁺ 的毒性,其中细胞毒性最大提高了 26.0%,表现为协同作用(图 2(a))。

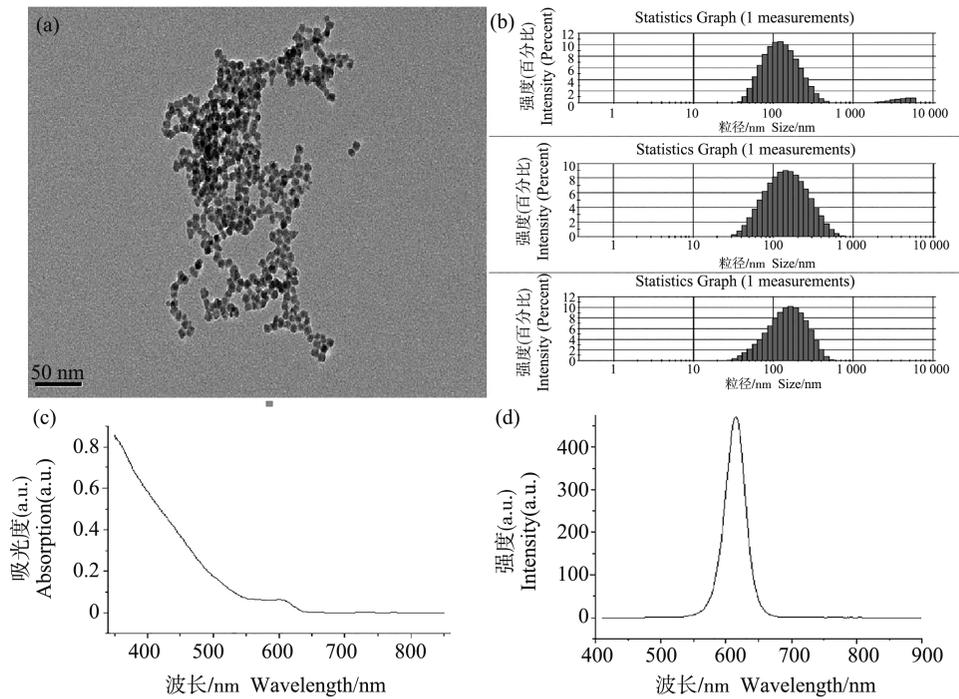


图1 量子点(QDs)的表征和荧光光谱

注: CdTe-MPA QDs 的 TEM 图(a); CdTe-MPA QDs 的动态光散射(DLS)表征(b); QDs 的紫外吸收光谱(c); QDs 的荧光光谱(d)。CdTe-MPA QDs 为巯基丙酸包覆的 CdTe 量子点。

Fig. 1 Characterization of quantum dots (QDs) and fluorescence spectra

Note: TEM of CdTe-MPA QDs (a); Dynamic light scattering (DLS) analysis of CdTe-MPA QDs (b); Ultraviolet absorption spectra of QDs (c); Fluorescence spectra of QDs (d). CdTe-MPA QDs represents mercaptopropionic acid-coated CdTe QDs.

通过在光学显微镜观察各处理组的细胞形态变化(图 2(b)),结果基本和 MTT 实验一致。对照组为正常的 L02 细胞,呈多边形,具有完整的细胞核,并且折光性和贴壁状态也很好。相对于 Cu²⁺ 处理组而言,QDs 的加入使细胞受到更加明显的伤害。在显微镜下观察可见,活细胞数量减少,明显出现细胞间质消失、细胞体积缩小和细胞核浓缩等各种程度的异常形态变化。

2.3 QDs 及 Cu²⁺对细胞膜的影响

通过测定 LDH 释放率来考察 QDs 对细胞膜的破坏作用,从而推测细胞毒性机理。由图 3 可知,不同浓度 Cu²⁺ 处理组在加入 200 μg·mL⁻¹ QDs 后,均表现出 LDH 释放量增加,且随着 Cu²⁺ 处理的浓度增加,LDH 释放率变化量增加,其中相对于对照组,单独 QDs(200 μg·mL⁻¹)处理组,LDH 释放率增加了 2.8%;加入 200 μg·mL⁻¹ QDs 后,相对于单独

表 1 QDs 和 Cu²⁺对 L02 细胞存活率的影响

Table 1 Effects of QDs and Cu²⁺ on the survival rate of L02 cells

Cu ²⁺ 浓度/(μg·mL ⁻¹) Cu ²⁺ concentration /(μg·mL ⁻¹)	Cu ²⁺ 细胞存活率/% Survival rate of Cu ²⁺ treatments/%	Cu ²⁺ +QDs(200 μg·mL ⁻¹) 细胞存活率/% Survival rate of Cu ²⁺ +QDs (200 μg·mL ⁻¹) treatments/%	细胞存活率变化量/% The change of the survival rate/%
0	100.0	96.4	3.6
5	93.0	79.7	13.3
10	83.7	66.5	17.2
20	59.9	33.9	26.0
40	22.8	8.6	14.2

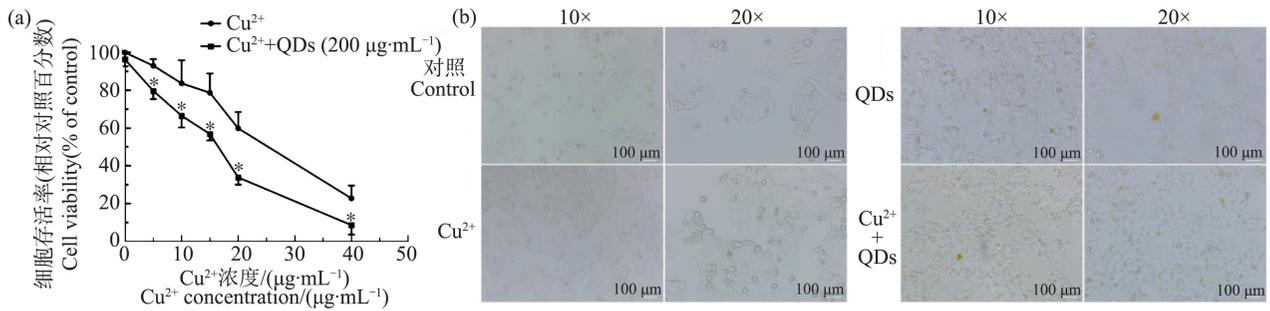


图 2 QDs 的加入对 Cu^{2+} 诱导的细胞毒性的影响

注: Cu^{2+} 和 QDs- Cu^{2+} 处理对 L02 细胞存活率的影响(a); Cu^{2+} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及 QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 联合 Cu^{2+} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理的细胞形态变化(b)。

Fig. 2 Effect of QDs on Cu^{2+} -induced cell viability decrease

Note: Effect of Cu^{2+} and QDs- Cu^{2+} treatment on the survival rate of L02 cells (a); Morphological changes of cells treated with Cu^{2+} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) combined with Cu^{2+} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (b).

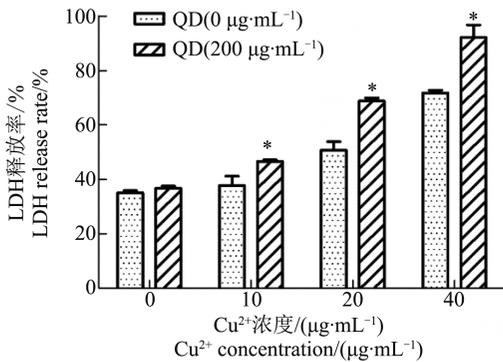


图 3 Cu^{2+} 单独及联合 QDs 对 L02 肝细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 释放的影响

Fig. 3 Effects of Cu^{2+} alone and combined with QDs on lactate dehydrogenase (LDH) release from L02 hepatocytes

10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cu^{2+} 处理组, LDH 释放率增加了 23.6%。

2.4 细胞内 Cu^{2+} 含量变化

为了进一步确证 QDs 的加入带来细胞毒性的增加,用 ICP-MS 仪检测细胞内实际 Cu^{2+} 含量。由图 4 可知,不同浓度 Cu^{2+} 联合 QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作用于 L02 细胞 24 h 后,均表现出明显的细胞 Cu^{2+} 蓄积量增加,相对于对照组,单独 QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组细胞 Cu^{2+} 含量增加了 6.4%; 相对于单独 Cu^{2+} (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组,加入 QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 后, Cu^{2+} 细胞蓄积量明显增加,增加了 431.8%。

2.5 Cu^{2+} 解毒蛋白表达结果

Western blot 法检测 Cu^{2+} 天然解毒蛋白 ATP7A、ATP7B 及 CTR1 表达情况,发现解毒蛋白表达量增

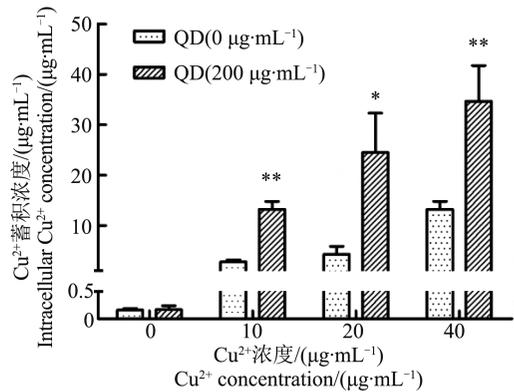


图 4 QDs- Cu^{2+} 联合对 L02 肝细胞内 Cu^{2+} 含量的影响

Fig. 4 Effect of QDs- Cu^{2+} combination on Cu^{2+} content in L02 hepatocytes

加,也从侧面证明了, Cu^{2+} 在细胞内蓄积量确实增加,这才导致解毒蛋白表达增加,与 QDs (200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 可能对细胞膜产生破坏作用导致 Cu^{2+} 蓄积这一推测相一致。如图 5 可知,10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Cu^{2+} 联合 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QDs 处理组,相对于单独 Cu^{2+} 处理组,解毒蛋白表达不同程度地增加,ATP7A 蛋白增加了 133.6%,CTR1 蛋白增加了 57.3%。

3 讨论 (Discussion)

无毒的 QDs 由于粒径很小(约 2 ~ 10 nm),受小尺寸效应和表面效应等的影响,具备很多优异的性质,是近年使用率最多的新型纳米材料之一^[5,18]。其生产量的增加不可避免地带来环境排放量的增加^[19],而且太阳能电池、计算机、生物传感器、成像技术、药物传递和光电探测器等方面的应用可能带来

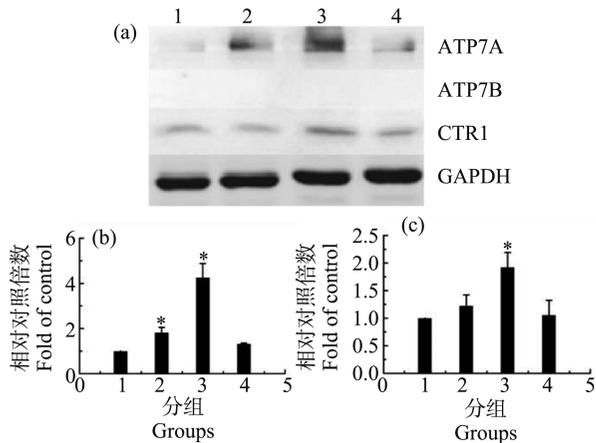


图5 Cu^{2+} 解毒蛋白 ATP7A、ATP7B 及 CTR1 蛋白的表达注: Cu^{2+} 解毒蛋白的 Western blot 结果(a);不同处理对 ATP7A 表达的影响(b);不同处理对 CTR1 表达的影响(c)。1. 对照组, 2. Cu^{2+} ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 3. Cu^{2+} ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+QDs($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 4. QDs($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

Fig. 5 Expression of Cu^{2+} detoxification protein ATP7A, ATP7B and CTR1

Note: Western blot results of Cu^{2+} detoxification protein (a); Effects of different treatments on ATP7A expression (b); Effect of different treatments on CTR1 expression (c). 1. Control; 2. Cu^{2+} ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 3. Cu^{2+} ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)+QDs($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 4. QDs($200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

QDs 的体内蓄积^[1-5]。Rocha 等^[20]证明了 QDs 在体内主要在肝脏中蓄积。同时,由于工业和自然地理等原因造成 Cu^{2+} 环境污染,并且作为人体必需元素也主要富集于肝脏^[21]。所以,QDs 和 Cu^{2+} 的联合毒性的评价和相应机理以及防护措施的研究等尤其必要。

QDs 毒性机理中有一个通过活性氧簇(ROS)导致细胞膜破坏,使得细胞的屏障作用消失^[10,19]。另外, Cu^{2+} 要克服细胞天然的屏障作用,离细胞足够近才能发挥毒性,而此时细胞的天然屏障作用相当于被 QDs 破坏,有了 QDs 的“辅助”作用,使得 Cu^{2+} 能够靠近细胞,细胞内 Cu^{2+} 蓄积量增加,导致细胞毒性增加。

一般而言,细胞都有对应的金属离子的天然解毒蛋白,会防止其过度蓄积^[22-23],比如 Cu^{2+} 拥有天然的解毒蛋白 ATP7A、ATP7B 及 CTR1 等蛋白。现解毒蛋白在 QDs 加入后,表达量确实增加,说明 QDs 的加入造成 Cu^{2+} 蓄积量的增加,导致解毒蛋白的表达量增加,细胞自身试图降低 Cu^{2+} 蓄积量,以缓冲 Cu^{2+} 带来的毒性作用。因此,关注无毒 QDs 或低毒 QDs 与 Cu^{2+} 的复合毒性是有必要的。

QDs 浓度为 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,L02 细胞致死率

为 3.6%。 Cu^{2+} 浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,L02 细胞致死率为 16.3%,当加入 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ QDs 时,致死率变为 33.5%,提高了 17.2%,说明 QDs 和 Cu^{2+} 的加入都会对 L02 细胞产生毒性,并且 QDs 的加入对 Cu^{2+} 诱导的 L02 细胞毒性具有显著协同作用;细胞膜完整性被破坏的指示物 LDH 增加, Cu^{2+} 的解毒蛋白增加,这证明 QDs 对 Cu^{2+} 诱导 L02 细胞毒性增加的机理可能是通过破坏细胞膜作用导致 Cu^{2+} 蓄积量增加。

参考文献 (References):

- [1] Qu M, Qiu Y, Lv R, et al. Exposure to MPA-capped CdTe quantum dots causes reproductive toxicity effects by affecting oogenesis in nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 173: 54-62
- [2] Santos A R, Miguel A S, Tomaz L, et al. The impact of CdSe/ZnS quantum dots in cells of *Medicago sativa* in suspension culture [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2010, 8: 24
- [3] Matea C T, Mocan T, Tabaran F, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 5421-5431
- [4] Rocha T L, Gomes T, Mestre N C, et al. Tissue specific responses to cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 169: 10-18
- [5] 李鸿程, 周群芳, 刘伟, 等. 量子点毒性效应的研究进展[J]. *中国科学 B 辑: 化学*, 2008, 38(5): 396-403
- [6] Terwogt J M, Nuijen B, Huinink W W, et al. Alternative formulations of paclitaxel [J]. *Cancer Treatment Reviews*, 1997, 23(2): 87-95
- [7] Lo E H, Singhal A B, Torchilin V P, et al. Drug delivery to damaged brain [J]. *Brain Research Reviews*, 2001, 38 (1-2): 140-148
- [8] 王松华, 杨志敏, 徐朗莱. 植物铜素毒害及其抗性机制研究进展[J]. *生态环境*, 2003, 12(3): 336-341
Wang S H, Yang Z M, Xu L L. Mechanisms of copper toxicity and resistance of plants [J]. *Ecology and Environment*, 2003, 12(3): 336-341 (in Chinese)
- [9] Karami S, Zeynizadeh B. Reduction of 4-nitrophenol by a disused adsorbent: EDA-functionalized magnetic cellulose nanocomposite after the removal of Cu^{2+} [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 211: 298-307
- [10] Wang J, Sun H, Meng P, et al. Dose and time effect of CdTe quantum dots on antioxidant capacities of the liver and kidneys in mice [J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2017, 12: 6425-6435

- [11] Rashed M N. The role of trace elements on hepatitis virus infections: A review [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine & Biology*, 2011, 25(3): 181-187
- [12] Gaetke L M, Chow C K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients [J]. *Toxicology*, 2003, 189(1-2): 147-163
- [13] Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: Toxicity depends on physicochemical and environmental factors [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2006, 114(2): 165-172
- [14] Luza S C, Speisky H C. Liver copper storage and transport during development: Implications for cytotoxicity [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1996, 63 (5): 812S-820S
- [15] Yang R S, Chang L W, Wu J P, et al. Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice: ICP-MS quantitative assessment [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(9): 1339-1343
- [16] Lovric J, Cho S J, Winnik F M, et al. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death[J]. *Chemistry & Biology*, 2005, 12(11): 1227-1234
- [17] 赵宇侠, 林匡飞, 张卫, 等. 量子点与 Cu²⁺ 对 L02 细胞毒性的协同作用机制: 量子点可能的木马角色[J]. *环境科学*, 2010, 31(9): 2196-2201
Zhao Y X, Lin K F, Zhang W, et al. Mechanism of quantum dots facilitating Cu²⁺-induced hepatic L02 cells toxicity: Possible Trojan-Horse role of QDs [J]. *Environmental Science*, 2010, 31(9): 2196-2201 (in Chinese)
- [18] Elzorkany H E, Farghali M A, Hassan M A, et al. Ecotoxicology impact of silica-coated CdSe/ZnS quantum dots internalized in *Chlamydomonas reinhardtii* algal cells [J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 666: 480-489
- [19] Rocha T L, Gomes T, Cardoso C, et al. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Marine Environmental Research*, 2014, 101: 29-37
- [20] Rocha T L, Mestre N C, Saboia-Morais S M, et al. Environmental behaviour and ecotoxicity of quantum dots at various trophic levels: A review [J]. *Environment International*, 2017, 98: 1-17
- [21] Chen Y M, Tsao T M, Wang M K, et al. Kinetic and thermodynamic studies on removal of Cu(II) from aqueous solutions using soil nanoclays [J]. *Water Environment Research*, 2015, 87(1): 88-95
- [22] Yu X Z, Lin Y J, Zhang Q. Metallothioneins enhance chromium detoxification through scavenging ROS and stimulating metal chelation in *Oryza sativa* [J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 300-313
- [23] Penicaud V, Lacoue-Labarthe T, Bustamante P. Metal bioaccumulation and detoxification processes in cephalopods: A review [J]. *Environmental Research*, 2017, 155: 123-133