

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220805002

汤蕾,李鑫,李昕畅,等.纳米氧化亚铜和氧化铜的肺细胞毒性差异及影响因素[J]. 生态毒理学报,2023,18(4):478-485

Tang L, Li X, Li X C, et al. Different pulmonary cytotoxicity of nano-cuprous oxide and nano-copper oxide and influencing factors [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(4): 478-485 (in Chinese)

纳米氧化亚铜和氧化铜的肺细胞毒性差异及影响因素

汤蕾,李鑫,李昕畅,罗琳*,曹林英*

湖南农业大学资源环境学院,长沙 410128 收稿日期:2022-08-05 录用日期:2022-11-07

摘要:纳米农药的广泛应用将不可避免导致其重要成分(比如纳米氧化铜和纳米氧化亚铜)的环境残留。人体可通过灰尘吸 人、饮水及农产品摄入等方式暴露于纳米氧化铜和纳米氧化亚铜。因此,阐明它们的健康危害具有重要意义。本研究我们首 次对比研究了纳米氧化铜和纳米氧化亚铜的 A549 肺细胞毒性差异,并从氧化应激和线粒体损伤角度探讨了细胞毒性作用机 制。实验结果表明纳米氧化铜和纳米氧化亚铜均具有显著的 A549 细胞毒性,观察到的最低效应浓度分别为 20 mg·L⁻¹和 5 mg·L⁻¹。纳米氧化亚铜表现出更强的细胞毒性作用,100 mg·L⁻¹时细胞活性抑制率达到 95%。活性氧实验结果表明纳米氧化铜和纳米氧化亚铜均可诱导活性氧生成,呈现时间与浓度依赖关系。纳米氧化亚铜的活性氧诱导作用明显强于纳米氧化铜,24 h 最大诱导率分别为对照组的 3.5 倍和 1.5 倍。线粒体膜电位实验结果表明纳米氧化亚铜比纳米氧化铜具有更强的线 粒体去极化作用,并呈剂量(1~100 mg·L⁻¹)依赖关系,最大线粒体膜电位下降率分别为 60% 和 20%。活性氧和线粒体膜电位 的结果与细胞毒性的结果基本一致,提示了氧化应激和线粒体损伤可能是导致纳米氧化铜和纳米氧化亚铜细胞毒性的关键 分子机制。本研究揭示了纳米氧化铜和纳米氧化亚铜的肺细胞毒性差异及潜在分子机制,可为纳米农药的健康风险评估及 合理施用提供重要理论依据。

关键词:纳米氧化铜;纳米氧化亚铜;肺细胞;细胞毒性;氧化应激;线粒体损伤 文章编号:1673-5897(2023)4-478-08 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Different Pulmonary Cytotoxicity of Nano-cuprous Oxide and Nano-copper Oxide and Influencing Factors

Tang Lei, Li Xin, Li Xinchang, Luo Lin[#], Cao Linying^{*} College of Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China **Received** 5 August 2022 accepted 7 November 2022

Abstract: The wide application of nano-pesticides leads to residues of its main components (such as nano-copper oxide and nano-cuprous oxide) in the environment inevitably. The human body can expose to nano-copper oxide and nano-cuprous oxide through inhaling dust, drinking water and ingesting agricultural products. Therefore, it is of great significance to elucidate their health hazards. In the present study, we firstly investigated the cytotoxicity variation of nano-copper oxide and nano-cuprous oxide on A549 cells as well as explored the cytotoxic mechanisms

基金项目:湖南省重点研发计划项目(2023NK2029);湖南省本科生/研究生科研创新项目(S202110537040,CX20220694);国家自然科学基金 青年项目(21906050)

第一作者:汤蕾(2000—),女,硕士研究生,研究方向为环境毒理学,E-mail: t18373757516@163.com

^{*} 通信作者(Corresponding author), E-mail: caolinying226@hunau.edu.cn

[#] 共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: linluo.huau@foxmail.com

from the perspectives of oxidative stress and mitochondrial damage. Results showed that both nano-copper oxide and nano-cuprous oxide had significant cytotoxic effects on A549 cells, with the lowest observed effective concentrations of 20 mg \cdot L⁻¹ and 5 mg \cdot L⁻¹, respectively. Nano-cuprous oxide exhibited stronger cytotoxic effects than nano-copper oxide with inhibition rate of cell viability reaching 95% at 100 mg \cdot L⁻¹. The experimental results of reactive oxygen species showed that both nano-copper oxide and nano-cuprous oxide could induce the generation of reactive oxygen species in a time-dependent and concentration-dependent manner. The induction effect of nanocuprous oxide on reactive oxygen species was significantly stronger than that of nano-copper oxide, with the maximum induction rate of 3.5-fold and 1.5-fold compared to the ctrl group at 24 h. The experimental results of mitochondrial membrane potential showed that nano-cuprous oxide had stronger activity on mitochondrial depolarization than nano-copper oxide in a dose-dependent manner (1 ~ 100 mg \cdot L⁻¹), with the maximum reduction rates of mitochondrial membrane potential reaching 60% and 20%, respectively. The results of reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential were consistent with the results of cytotoxicity, indicating that oxidative stress and mitochondrial damage might be the key molecular mechanisms of cytotoxicity of nano-copper oxide and nanocuprous oxide. This study revealed the different pulmonary cytotoxicity of nano-copper oxide and nano-cuprous oxide as well as the potential molecular mechanisms, which can provide important theoretical basis for the health risk assessment and rational application of nano-pesticides.

Keywords: nano-copper oxide; nano-cuprous oxide; lung cell; cytotoxicity; oxidative stress; mitochondria damage

目前,我国的农药利用率低、用量大,造成了农 药残留量大及环境污染等问题。纳米技术在农业的 可持续发展中显示出巨大的应用潜力,其中纳米农 药可增加农药活性成分的稳定性,延长有效持续时 间,有效改善农药利用率,从而减少农药的环境负 荷,其在农业生产中的使用已备受关注。但是随着 纳米农药的广泛使用,将不可避免地导致了它们在 环境中的残留,甚至进入人体产生危害,因此,阐明 它们的生态风险及环境健康危害具有重要意义^[1-2]。

纳米农药主要分为两大类:纳米材料作为载体 包裹有机小分子农药活性成分;无机纳米农药。纳 米氧化铜(CuO NPs)和纳米氧化亚铜(Cu₂O NPs)是 无机纳米农药的 2 种典型成分^[1,3]。由于 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 具有很好的抗菌活性,对多种菌类有 效,被列为推荐药剂在农业领域得到广泛应用^[4-6], 并且一些研究表明,Cu₂O NPs 的抗菌活性较 CuO NPs 更强^[7-8]。

纳米颗粒(nano-particles, NPs)进入人体最常见的途径是通过呼吸系统吸入,深入肺部,引起肺部氧化应激和炎症反应^[9-10]。同时,NPs也可以通过肺泡或其他方式(如饮水、皮肤接触等)进入血液并影响其他器官^[11]。与其他 NPs 类似,除了通过呼吸、饮水及皮肤暴露等方式以外,由于 CuO NPs 和Cu₂O NPs 在农业系统的广泛使用,通过农产品的摄入也是它们进入人体的重要途径。NPs 对生物体的

毒性机制主要是诱导氧化应激、炎症反应及 DNA 损伤等^[9,12-13]。目前已有较多研究显示了 CuO NPs 具有较强的细胞毒性作用。例如孙婷婷和蒋澄宇[14] 通过比较 CuO、Fe,O,、TiO,、SiO, 等金属 NPs 对小 鼠的肺部毒性作用,发现 CuO NPs 具有较强的毒 性,可导致小鼠急性肺损伤,而其他几种金属 NPs 的作用较小;Fahmy 和 Cormier^[15]对 SiO₂ NPs、Fe₂O₃ NPs 和 CuO NPs 进行比较研究,发现 CuO NPs 导致 气管上皮 Hep-2 细胞活力出现显著的剂量依赖性下 降,而其他 NPs 基本无细胞毒性作用,并且 CuO NPs 的细胞毒性作用与氧化损伤直接相关;Fu^[16]的 研究证明 CuO NPs 可以抑制 HepG2 细胞增殖,对 细胞产生氧化损伤作用,其机制与 ROS 诱导线粒体 介导的细胞凋亡途径有关。此外,也有研究表明 CuO NPs 对植物^[17-18]、水生动物^[19]及微生物^[20-21]的 毒性作用,并且与氧化应激有关。

目前已有较多研究表明了 CuO NPs 的毒性作 用,但对 Cu₂O NPs 的研究非常缺乏。虽然有研究 表明 Cu₂O NPs 具有更强的抗菌活性,但其是否具 有更强的非靶标毒性作用进而产生更严重的健康危 害,需要进一步的毒理学评估。因此,本研究以 A549 人源肺细胞作为模型,对比研究了 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 的细胞毒性差异,并探讨了影响其毒 性差异的潜在因素,有望为其环境健康风险评估及 安全使用提供理论参考。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料与试剂

人肺腺癌细胞 A549、细胞培养基 DMEM、PBS 缓冲溶液购于武汉普诺赛生命科技有限公司;活性 氧检测探针(DCFH-DA)、线粒体膜电位检测探针 (Mito-Tracker Red CMXRos)购自碧云天生物技术有 限公司;二甲基亚砜(DMSO,纯度为99%)和噻唑蓝 (MTT,纯度>99%)购自上海麦克林生化科技有限公 司;纳米氧化铜(CuO NPs,纯度>99.9%)和纳米氧化 亚铜(Cu₂O NPs,纯度>99.9%)购自北京中科科优科 技有限公司,CuO NPs 和 Cu₂O NPs 暴露前采用细 胞培养基配制,现配现用。

1.2 仪器设备

BB150-2TCS-L CO₂ 培养箱(赛默飞世尔科技有限公司,美国);TECAN Spark 20M 酶标仪(帝肯集团有限公司,瑞士);FA004 分析天平(上海舜宇恒平仪器有限公司,中国);ZEISS Sigma 300 型扫射电子显微镜(scanning electron microscope, SEM; 蔡司,德国);FEI Tecnai F20 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM;FEI,美国);Malvern Zetasizer Nano ZS 90 型动态光散射仪(dynamic light scattering, DLS;马尔文,英国);AA-6880 原子吸收仪(岛津,日本)。

1.3 材料的表征

将 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 分散在去离子水中, 超声后得到悬浮液。采用德国 ZEISS Sigma 300 SEM 和美国 FEI Tecnai F20 TEM 拍摄 NPs 形貌。 用纳米粒度 Zeta 电位仪测定 Zeta 电位,同时以动态 光散射法测定水合粒径。

1.4 细胞毒性检测

A549 细胞采用加入了 100 µg·mL⁻¹链霉素、 100 U·mL⁻¹青霉素和 10% (V:V)胎牛血清的完全 培养基(普诺塞,武汉)在恒温恒湿培养箱(37 ℃ 和 5%(V:V)CO₂)中进行培养。在 96 孔板中每孔接 种 A549 细胞(5×10⁴个),贴壁培养 24 h。暴露不同 浓度(0.1~100 mg·L⁻¹)的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs,继 续培养 24 h。吸出染毒液,用 PBS 对细胞进行清洗 2 次。加入 MTT 溶液孵育 3 h,吸去探针,加入 100 µL DMSO,以溶解 MTT 的深紫色产物(甲瓒)。轻 轻摇晃,用酶标仪,以 690 nm 为参考波长,在 490 nm 的吸收度测定细胞活性。

1.5 活性氧检测

将 A549 细胞悬浮液(5×10⁴个,100 μL)接种在

96 孔板中孵育 24 h。吸出培养基,加入 10 μmol・ L⁻¹ 的 DCFH-DA 探针(100 μL)孵化 20 min 后吸出, 用 100 μL PBS 轻轻洗涤 2 次。将细胞暴露于不同 浓度(1~100 mg·L⁻¹)的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs。采 用酶标仪检测荧光强度(激发波长 485 nm,发射波 长 535 nm)。

1.6 线粒体膜电位检测

将 A549 细胞(5×10⁴个,100 μL)接种在 96 孔板 中孵育 24 h。吸出培养基,将细胞分别暴露于不同 浓度(1~100 mg·L⁻¹)的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 12 h。然后将含污染物的溶液吸出,分别加入100 nmol ·L⁻¹的线粒体膜电位探针,孵化 20 min,再将探针去 除后,用 PBS 将细胞洗 3 次,最后加入100 μL 的 PBS 溶液用酶标仪检测荧光强度,设置激发波长为 565 nm,发射波长 610 nm。

1.7 培养基中铜离子浓度检测

将配好的 20、40、50、100 mg·L⁻¹的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 悬浊液加入到 12 孔板中,与细胞在相同 条件下处理 24 h 后,离心 30 min(12 000 r·min⁻¹),取 上清液。用火焰原子吸收光谱仪检测上清液中铜离 子含量。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 和 Excel 进行实验数据 处理和分析。所有的实验都进行 3 次重复,每个实 验组都设置至少 3 个平行,用平均值±标准差来表 示试验的结果。* P<0.05 表示处理组与对照组具有 显著性差异。

2 结果(Results)

2.1 NPs 的表征

SEM 和 TEM 图像显示 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 呈不规则形状的颗粒(图 1(a) ~ (d)), CuO NPs 呈棒 状,而 Cu₂O NPs 呈球状。Zeta 电位测定结果表明, CuO NPs 的 Zeta 电位为(19.97±5.98) mV, Cu₂O NPs 的 Zeta 电位为(25.5±6.55) mV。DLS 结果显示 CuO NPs 的水合粒径为 403 nm, Cu₂O NPs 的水合粒径 为 432 nm(图 1(e)和(f)),在水溶液中分散比较均匀, 有部分团聚。

2.2 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 对 A549 细胞活性的影响

如图 2 所示, 无酚红 DMEM 配制的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 呈均匀分散溶液, 其中 CuO NPs 呈灰 黑色, 而 Cu₂O NPs 呈浅黄色。如图 3(a)所示, CuO NPs 和 Cu₂O NPs 均对 A549 细胞产生了明显的毒





注:(a) CuO NPs 的扫描电镜图;(b) Cu₂O NPs 的扫描电镜图;(c) CuO NPs 的透射电镜图;(d) Cu₂O NPs 的透射电镜图; (e) 动态光散射测定 CuO NPs 的水合半径;(f) 动态光散射测定 Cu₂O NPs 的水合半径。

Fig. 1 Morphology and particle size characterization of nano-copper oxide (CuO NPs) and nano-cuprous oxide (Cu₂O NPs) Note: (a) Scanning electron microscopy photograph of CuO NPs; (b) Scanning electron microscopy photograph of Cu₂O NPs;
(c) Transmiss on electron microscopy photograph of CuO NPs; (d) Transmission electron microscopy photograph of Cu₂O NPs;
(e) Hydrated radius of CuO NPs determined by dynamic light scattering; (f) Hydrated radius of Cu₂O NPs determined by dynamic light scattering.



Fig. 2 Solution of nano-copper oxide (CuO NPs) and nano-cuprous oxide (Cu₂O NPs)



图 3 纳米颗粒(NPs)(a)及铜离子(Cu²⁺)(b)对 A549 细胞的活性影响 注:Ctrl 组表示等量稀释纳米材料的培养基处理,*表示与对照组相比差异显著(P<0.05)。 Fig. 3 Effects of nanoparticles (NPs) (a) and copper ion (Cu²⁺) (b) on A549 cell viability Note: Ctrl group represents treatment with equal volume medium used to dilute nanomaterials; * represents significant difference compared with the control (P<0.05).

性,并且呈剂量依赖效应,观察到的最低效应浓度分 别为 20 mg·L⁻¹和 5 mg·L⁻¹。并且不同浓度的细胞 毒性对比也表明 Cu₂O NPs 的 A549 细胞毒性效应 明显强于 CuO NPs。

同时,考察了铜离子的细胞毒性以便作为对比。 如图 3(b)所示,A549 细胞暴露在低浓度 Cu²⁺溶液中 时,活细胞数量与对照组相比有所增加,说明低浓度 的 Cu²⁺可以促进细胞增殖,这可能与 Cu 是人体生 长的必需元素有关。当 Cu²⁺浓度达到 50 mg·L⁻¹时 表现出细胞毒性作用,但是与 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 相比,Cu²⁺细胞毒性相对较小。

2.3 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 对 A549 细胞胞内活性 氧生成的影响

前面我们发现了 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 的肺细胞毒性差异,为了进一步探讨细胞毒性差异的分子机理,对两者诱导活性氧生成进行了测定。NPs 在细胞中与细胞器的相互作用促进活性氧的产生是其产生细胞毒性作用的典型分子机制之一。由图 4 可知,CuO NPs 和 Cu₂O NPs 暴露 A549 肺细胞3、6、12及 24 h 均可导致 ROS 过量生成,随着暴露时间增加明显出现了 ROS 的积累,并呈现剂量依赖关系。此外,Cu₂O NPs 诱导 ROS 生成效应明显强于 CuO NPs。这一现象与它们的细胞毒性是一致的。因此,我们推断 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 的细胞毒性差异与两者诱导氧化应激效应有关。

2.4 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 对线粒体膜电位的影响 NPs 可以侵入细胞并粘附在线粒体膜上,从而

破坏线粒体膜并导致其去极化。如图 5 所示,不同 浓度 CuO NPs、Cu₂O NPs 暴露 A549 细胞 12 h 后, 均可在≥40 mg·L⁻¹浓度下导致线粒体膜电位降低, 导致线粒体去极化作用。同时,发现 Cu₂O NPs 对 肺细胞 A549 线粒体去极化作用明显大于 CuO NPs,这与两者细胞毒性实验结果吻合。因此,CuO NPs、Cu₂O NPs 的不同细胞毒性可能与两者对线粒 体损伤程度不同也有一定关系。

2.5 培养基中 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 释放的铜离 子浓度

金属离子的溶出是金属 NPs 产生细胞毒性的 重要来源。CuO NPs 和 Cu₂O NPs 产生的细胞毒性 差异也可能与它们溶出的铜离子浓度不同有关。因 此,进一步对培养基中溶出的铜离子浓度进行了考 察。但是由图 6 可知,CuO NPs 和 Cu₂O NPs 在培 养基中释放的铜离子浓度没有明显差别,所释放的 最大铜离子浓度均<16 mg·L⁻¹,说明两者的毒性差 异可能并不是由于其在培养基中所释放的铜离子总 量不同所导致。

3 讨论(Discussion)

随着农业纳米技术研发支出的迅速增加,中国 有可能成为全球最大的纳米农药生产国和消费国。 因此,纳米农药的调控和科学评价迫在眉睫。纳米 材料通过呼吸进入肺部是其产生毒害作用的主要途 径之一。本研究选用人源肺细胞 A549 作为细胞模 型,以 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 为研究对象,首次对比



图 4 纳米氧化铜(CuO NPs)和纳米氧化亚铜(Cu₂O NPs)对 A549 细胞活性氧(ROS)生成的影响(不同暴露时间)

注:(a) 3 h;(b) 6 h;(c) 12 h;(d) 24 h;Ctrl 组表示等量稀释纳米材料的培养基处理。

Fig. 4 Effects of nano-copper oxide (CuO NPs) and nano-cuprous oxide (Cu₂O NPs) on reactive oxygen species (ROS) generation in A549 cells (different exposure time)

Note: (a) 3 h; (b) 6 h; (c) 12 h; (d) 24 h; Ctrl group represents treatment with equal volume medium used to dilute nanomaterials.



图 5 纳米氧化铜(CuO NPs)和纳米氧化亚铜 (Cu,O NPs)对 A549 细胞线粒体膜电位(MMP)的影响

注:Ctrl 组表示等量稀释纳米材料的培养基处理, *表示与对照组相比差异显著(P<0.05)。

Fig. 5 Effects of nano-copper oxide (CuO NPs) and nano-cuprous oxide (Cu₂O NPs) on mitochondrial membrane potential (MMP) of A549 cells Note: Ctrl group represents treatment with equal volume medium used to dilute nanomaterials; * represents significant difference compared with the control (P<0.05).



图 6 纳米氧化铜(CuO NPs)和纳米氧化亚铜(Cu₂O NPs) 在细胞培养基中铜离子的释放



研究两者的肺细胞毒性差异,并从氧化应激和线粒 体损伤等角度探索两者导致细胞毒性差异的潜在分 子机制,并对比了游离态铜离子的影响。 本研究发现纳米农药中 2 种主要成分 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 具有明显的肺细胞毒性作用。尤其是 高浓度的 CuO NPs 和 Cu₂O NPs(\geq 50 mg·L⁻¹)表现 出极高的毒性,细胞存活率急剧下降。Cu₂O NPs 和 CuO NPs 短期染毒造成 A549 细胞毒性的临界浓度 约为 5 mg·L⁻¹和 20 mg·L⁻¹。Cu₂O NPs 可在比 CuO NPs 浓度低得多的情况下对细胞产生毒性,说 明 Cu₂O NPs 比 CuO NPs 毒性更大。其中 CuO NPs 的研究结果与文献报道的细胞毒性效应结果基本一 致^[14-16]。同时,我们首次发现 Cu₂O NPs 的细胞毒 性作用较 CuO NPs 明显更强,其毒性效应值得更多 关注。

氧化损伤是 NPs 产生细胞毒性的公认分子机 制之一^[9,12-13]。因此,首先探讨了 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 的细胞毒性差异是否与氧化应激诱导能力不同 有关。通过 ROS 检测,发现 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 均能诱导 ROS 的过量生成,并呈剂量依赖关系。但 是 Cu₂O NPs 的 ROS 诱导效应明显强于 CuO NPs。 由此,我们推断 Cu₂O NPs 具有更强的细胞毒性作 用很可能与其氧化损伤能力更强有关。ROS 的大 量积累使得细胞处于氧化应激状态,可导致 DNA 等生物大分子氧化损伤,进而导致细胞损伤和死亡。

线粒体是 ROS 生成的主要场所,而 NPs 导致线 粒体等细胞器的损伤也是其产生细胞毒性效应的主 要分子机制^[22]。因此,进一步探讨了 CuO NPs 和 Cu₂O NPs 对线粒体的损伤效应。CuO NPs 和 Cu₂O NPs 均能以剂量依赖的方式导致 A549 细胞线粒体 膜电位的降低。CuO NPs 和 Cu₂O NPs 可通过诱导 线粒体去极化作用,进而导致细胞凋亡,这也是两者 产生细胞毒性的原因之一。同时,发现 Cu₂O NPs 诱导 A549 细胞线粒体去极化的作用明显强于 CuO NPs,这很可能也是 Cu₂O NPs 具有更强细胞毒性作 用的重要原因。

影响金属 NPs 毒性的主要因素有尺寸、形貌、 组分、氧化态以及释放的重金属含量等^[22-23]。从 SEM 可以看到 Cu₂O NPs 更接近球形,而 CuO NPs 呈棒状,两者形貌差异可能进一步影响它们进入细 胞的量。一般来说, NPs 粒径越小,细胞毒性越大。 从水合粒径来看, Cu₂O NPs 与 CuO NPs 没有很大 差别,这可能不是导致毒性差异的主要原因。金属 NPs 毒性与游离态铜离子的关系并无确切结论, 仍 存在一定争议。本研究的结果显示 Cu₂O NPs 与 CuO NPs 在细胞培养基中所释放的游离态铜离子 浓度并无显著差别,并且均低于 16 mg·L⁻¹,在该浓 度范围,铜离子并无显著细胞毒性。但是纳米颗粒 进入细胞后颗粒表面的金属离子以及胞内溶解释放 的铜离子的性质和毒性如何尚不清楚。此外,水和 粒径检测表明我们所采用的纳米颗粒在水溶液中的 水合半径达到 400 nm,可能通过胞噬作用摄取进入 细胞然后再次溶解产生毒性作用^[24]。因此,后续工 作需重点考察纳米颗粒进入细胞后的状态以及胞内 游离态铜离子的浓度及价态,对于阐明两者毒性差 异的影响因素非常关键。

综上所述,所研究的 Cu₂O NPs 对 A549 细胞毒 性作用远大于 CuO NPs,并且与氧化应激和线粒体 功能损伤有关,但是具体是何种因素导致两者毒性 差异仍需进一步深入探究。

通信作者简介:曹林英(1988—),女,博士,副教授,主要研究 方向为环境毒理学。

共同通信作者简介:罗琳(1969—),男,博士,教授,主要研究 方向为污染处理处置与生态学。

参考文献(References):

- [1] Li L, Xu Z L, Kah M, et al. Nanopesticides: A comprehensive assessment of environmental risk is needed before widespread agricultural application [J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(14): 7923-7924
- Usman M, Farooq M, Wakeel A, et al. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 721: 137778
- [3] Kumar S, Nehra M, Dilbaghi N, et al. Nano-based smart pesticide formulations: Emerging opportunities for agriculture [J]. Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2019, 294: 131-153
- [4] 谢婷, 谭辉. 无机铜氧化物在农药领域的应用专利技术综述[J]. 科技创新与应用, 2019(19): 23-24
- [5] 陈朗,姜辉,周艳明,等. 纳米农药的环境安全性浅析
 [J]. 农药科学与管理, 2018, 39(5): 30-38
 Chen L, Jiang H, Zhou Y M, et al. A brief analysis on the environmental safety of nano-enabled pesticides [J]. Pesticide Science and Administration, 2018, 39(5): 30-38 (in Chinese)
- [6] 范文宏, 刘通, 史志伟, 等. 立方体和八面体微/纳米氧 化亚铜对大型水蚤(*Daphnia magna*)的氧化胁迫和生理 损伤[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 40-48
 Fan W H, Liu T, Shi Z W, et al. Oxidative stress and

physiological damage of cubic and octahedral Cu₂O micro/nanocrystals to *Daphnia magna* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 40-48 (in Chinese)

- [7] Gurianov Y, Nakonechny F, Albo Y, et al. Antibacterial composites of cuprous oxide nanoparticles and polyethylene [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(2): 439
- [8] Rodríguez-Llamazares S, Mondaca M A, Badilla C, et al. PVC/copper oxide composites and their effect on bacterial adherence [J]. Journal of the Chilean Chemical Society, 2012, 57(2): 1163-1165
- [9] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles [J]. Environmental Health Perspectives, 2005, 113(7): 823-839
- [10] Weichenthal S, Dufresne A, Infante-Rivard C. Indoor ultrafine particles and childhood asthma: Exploring a potential public health concern [J]. Indoor Air, 2007, 17(2): 81-91
- [11] Jain A, Ranjan S, Dasgupta N, et al. Nanomaterials in food and agriculture: An overview on their safety concerns and regulatory issues [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2018, 58(2): 297-317
- [12] Manke A, Wang L Y, Rojanasakul Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity [J]. BioMed Research International, 2013, 2013: 942916
- [13] Bhabra G, Sood A, Fisher B, et al. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier [J]. Nature Nanotechnology, 2009, 4(12): 876-883
- [14] 孙婷婷, 蒋澄宇. 纳米氧化铜导致小鼠急性肺损伤[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(4): 386-389
 Sun T T, Jiang C Y. Copper oxide nanoparticles induce acute pulmonary injury in mice [J]. Basic & Clinical Medicine, 2012, 32(4): 386-389 (in Chinese)
- [15] Fahmy B, Cormier S A. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells [J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23(7): 1365-1371
- [16] Fu X. Oxidative stress induced by CuO nanoparticles

(CuO NPs) to human hepatocarcinoma (HepG2) cells [J]. Journal of Cancer Therapy, 2015, 6(10): 889-895

- [17] Zhao L J, Ortiz C, Adeleye A S, et al. Metabolomics to detect response of lettuce (*Lactuca sativa*) to Cu(OH)₂ nanopesticides: Oxidative stress response and detoxification mechanisms [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(17): 9697-9707
- [18] 王淑玲,张玉喜,刘汉柱,等.氧化铜纳米颗粒对水稻 幼苗根系代谢毒性的研究[J].环境科学,2014,35(5): 1968-1973
 Wang S L, Zhang Y X, Liu H Z, et al. Phytotoxicity of copper oxide nanoparticles to metabolic activity in the roots of rice [J]. Environmental Science, 2014, 35(5): 1968-1973 (in Chinese)
- [19] Vignardi C P, Muller E B, Tran K, et al. Conventional and nano-copper pesticides are equally toxic to the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* [J]. Aquatic Toxicology, 2020, 224: 105481
- [20] Zhang X X, Xu Z L, Qian X T, et al. Assessing the impacts of Cu(OH)₂ nanopesticide and ionic copper on the soil enzyme activity and bacterial community [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(11): 3372-3381
- [21] Carley L N, Panchagavi R, Song X, et al. Long-term effects of copper nanopesticides on soil and sediment community diversity in two outdoor mesocosm experiments [J]. Environmental Science & Technology, 2020, 54 (14): 8878-8889
- [22] Sengul A B, Asmatulu E. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: A review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2020, 18(5): 1659-1683
- [23] García-Torra V, Cano A, Espina M, et al. State of the art on toxicological mechanisms of metal and metal oxide nanoparticles and strategies to reduce toxicological risks [J]. Toxics, 2021, 9(8): 195
- [24] Manzanares D, Ceña V. Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell [J]. Pharmaceutics, 2020, 12(4): 371