

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160120002

刘振国, 王天慧, 王伟. 纳米氧化铜(CuO NPs)对紫花苜蓿幼苗根系活性氧(ROS)、抗氧化酶活性和根系活力的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 117-124

Liu Z G, Wang T H, Wang W. Effects of CuO NPs on ROS, antioxidant enzyme activity and root activity of the alfalfa seedlings [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 117-124 (in Chinese)

纳米氧化铜 (CuO NPs) 对紫花苜蓿幼苗根系活性氧 (ROS)、抗氧化酶活性和根系活力的影响

刘振国^{1,2,*}, 王天慧^{1,2}, 王伟^{1,2}

1. 上海大学生命科学学院 生命科学实验中心, 上海 200444

2. 上海市能源作物重点实验室, 上海 200444

收稿日期: 2016-01-20 录用日期: 2016-03-18

摘要: 根系通常是植物直接受到外界环境物质(如重金属离子和纳米金属氧化物)毒害的主要器官。本研究以紫花苜蓿的幼苗为实验材料,探讨了 CuO NPs 胁迫对紫花苜蓿幼苗根系的活性氧(ROS)积累、抗氧化酶活性和根系活力的影响。研究结果表明:(1)不同浓度的 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 含量具有显著影响。随 CuO NPs 浓度增大,紫花苜蓿幼苗根系中 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 整体上呈现先增大后减少的趋势,除了 $0.00125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 浓度下紫花苜蓿幼苗根系中 H_2O_2 含量比对照减少外,其他浓度下的 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的含量都比对照有所增加,并且 H_2O_2 和 $O_2^{\cdot-}$ 的含量都是在 $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 浓度下达到最大值。(2)不同浓度的 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系抗氧化酶活性具有显著影响。随 CuO NPs 浓度增大,紫花苜蓿幼苗根系中 SOD、POD、APX 和 CAT 酶的活性都呈现先增大后减少的趋势,其中, SOD 和 POD、APX、CAT 酶的活性分别是在 0.00625 、 0.0125 、 $0.0625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CuO NPs 处理下达到最大,表明这些抗氧化酶在清除根系中的活性氧方面表现出较强的协同性和补偿性。(3)不同浓度的 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系活力具有显著的影响。随着 CuO NPs 浓度的增加,紫花苜蓿幼苗根系活力逐步升高,这是一种生物适应性应激响应的体现。

关键词: CuO NPs; 紫花苜蓿; 活性氧; 抗氧化酶; 根系活力

文章编号: 1673-5897(2016)5-117-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of CuO NPs on ROS, Antioxidant Enzyme Activity and Root Activity of the Alfalfa Seedlings

Liu Zhengguo^{1,2,*}, Wang Tianhui^{1,2}, Wang Wei^{1,2}

1. Experimental Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Shanghai University, Shanghai 200444, China

2. Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops, Shanghai 200444, China

Received 20 January 2016 accepted 18 March 2016

Abstract: The root is usually the major organ directly contaminated by the environment pollutants such as heavy metal ions and metal oxide nanoparticles. This study explored the effects of CuO NPs on ROS, antioxidant enzyme activities and root activity of alfalfa seedling. The results showed that (1) CuO NPs had significant effects on H_2O_2

and $O_2^{\cdot-}$ content of the alfalfa seedling root (H_2O_2 , $P=0.003$; $O_2^{\cdot-}$, $P<0.001$). With the increase of CuO NPs concentration, H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents both firstly increased and then decreased as a whole. Except that H_2O_2 content of the alfalfa seedling root decreased under the $0.00125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuO NPs treatment, all H_2O_2 and $O_2^{\cdot-}$ contents increased under other CuO NPs treatments compared to the control. And these two indexes both reached the maximum under the $0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuO NPs treatment. (2) CuO NPs had significant effects on the antioxidant enzyme activity of the alfalfa seedling root ($P<0.001$ for all SOD, POD, APX and CAT). With the increase of CuO NPs concentration, the activities of SOD, POD, APX and CAT of the alfalfa seedling root all firstly increased and then decreased. The activities of SOD and POD both reached maximum under the $0.00625 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuO NPs treatment, while the maximum APX activity value was observed under the $0.0125 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuO NPs treatment and CAT activity maximum under the $0.0625 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuO NPs treatment. It is indicated that these antioxidant enzymes underwent a strong collaboration and compensation in clearing up reactive oxygen species of the alfalfa seedling root. (3) CuO NPs had significant effects on the root activity of the alfalfa seedling ($P<0.001$). With the increase of CuO NPs concentration, root activity of the alfalfa seedling gradually increased, which is a performance of biological adaptation to external stress.

Keywords: CuO NPs; alfalfa; ROS; antioxidant enzyme activity; root activity

纳米科技的迅速发展引发了 21 世纪工业、农业和科学技术等领域革命性的变化。纳米粒子具有量子尺寸效应、表面效应和宏观量子隧道效应等特征^[1-2]。目前人工合成的纳米材料(engineered nanoparticles, ENPs)已经渗透到医药工业、染料、涂料、食品、化妆品、环境污染治理等传统或新兴产业中,人们在研究、生产以及生活中接触到纳米材料的机会越来越多^[3]。随着纳米技术的迅猛发展和纳米材料的广泛应用,其生态安全问题引起了世界范围的普遍关注。

作为最重要的纳米工程材料之一,纳米氧化铜(CuO NPs)因其独特的电、磁、催化特性,在高温超导、有机催化、传感器、电极材料等方面具有广泛的应用前景和巨大的发展潜力^[4],此外,在轮船的防腐油漆、墨水、塑料和抗菌涂层中也得到广泛应用^[5]。CuO NPs 在工业品生产、运输和消费过程中的大量使用,将不可避免地进入大气、水体和土壤而产生环境风险,从而对生物造成不可避免的危害^[6-7]。目前,国内外相关研究主要探讨 CuO NPs 对细胞(如呼吸道上皮细胞^[8]、非洲蟾蜍的上皮细胞^[9]、白血病细胞^[10])、微生物(如酿酒酵母^[11]、大肠杆菌^[12-13])、人/鼠等哺乳类动物^[14-15]、水生动植物(如原核藻类植物微囊藻^[16]、甲壳类动物如大型蚤和扇尾仙女虾^[17-18]、金鱼藻^[19]、浮萍^[20]、紫贻贝^[21]、海葵^[22])、蔬菜和农作物(如白菜^[23]、小麦^[24])等的毒性效应,而关于其对支持畜牧业生存的牧草的影响尚未引起足够重视,相关报道较少。

目前,畜牧养殖中较理想的紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)是豆科多年生牧草作物,因其粗蛋白含量高、质地柔软、味道清香、适口性好、利用周期长等特点,一直作为优质的饲草在国内外广泛种植,素有“牧草之王”的美誉^[25]。笔者前期的研究表明,不同浓度的 CuO NPs 对紫花苜蓿种子的发芽率和幼苗生长都表现出了显著的抑制作用,并随 CuO NPs 浓度增大抑制作用也增强^[26]。

根系通常是植物直接受到外界环境污染物质(如重金属离子和纳米金属氧化物)毒害的主要器官^[27],植物在受到这些胁迫时体内的活性氧(ROS)增加,产生氧化应激效应,使植物的细胞膜遭到破坏,植物生长受到影响^[28-29]。抗氧化酶体系是植物体内活性氧的主要清除系统之一,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)和过氧化氢酶(CAT)等,这些抗氧化酶可以作为植物受到胁迫的指示指标^[30]。本研究以紫花苜蓿幼苗为实验材料,通过探讨 CuO NPs 胁迫对紫花苜蓿幼苗根系的 ROS 积累、抗氧化酶活性和根系活力的影响,揭示 CuO NPs 对植物根系的毒害机理,为深入研究纳米 CuO NPs 毒害的分子机制奠定基础。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

选用紫花苜蓿“皇冠”品种(*M. sativa* ‘Crown’)的种子,购于江苏种子公司。CuO NPs 购自阿法埃莎(中

国)化学有限公司,粒径大小为 30~50 nm。DHP-9162 电热恒温培养箱,由上海慧泰仪器制造公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 CuO NPs 悬浊液的制备

将 CuO NPs 粉末加入超纯水中,于磁力搅拌器上充分搅拌,使之成为均匀的悬浊液。设置纯水对照组和 5 个 CuO NPs 悬浮液处理组,浓度分别为 0.00125、0.00625、0.0125、0.0625、0.125 mol·L⁻¹。每个处理设置 3 个重复。

1.2.2 紫花苜蓿幼苗的培育

实验采用种子培养皿滤纸法培育紫花苜蓿幼苗。选取籽粒饱满、大小均一的紫花苜蓿种子,洗净后用次氯酸钠浸泡 30 min 消毒。置于铺有滤纸的培养皿中,每个培养皿内放入 20 颗种子并加入 10 mL 的处理溶液,将培养皿置于(25±0.5)℃恒温培养箱内培养。培养期间及时统一补充相应的处理溶液。待幼苗培养 7 d 时剪取幼苗的根进行实验处理,测定相关指标。

1.2.3 各项指标的测定方法

H₂O₂ 含量测定参照李忠光等^[31]的二甲酚橙法。O₂^{·-} 含量的测定参照李忠光等^[32]的盐酸羟胺法。SOD 酶(NBT 法)、POD 酶(愈创木酚法)和 CAT 酶(高锰酸钾滴定法)活性、根系活力(TTC 法)测定参照李合生的方法^[33]。APX 酶活测定参考 Nakano 和 Asada 的方法^[34]。

1.2.4 数据计算及处理

所有数据用 SPSS13.0 进行 ANOVA 方差分析比较处理之间的差异显著性。

2 结果 (Results)

2.1 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 ROS 积累的影响

2.1.1 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 H₂O₂ 含量的影响

在 CuO NPs 浓度为 0.0125 mol·L⁻¹ 时,紫花苜蓿幼苗根系 H₂O₂ 含量达到最大值 9.18 μg·g⁻¹,在 CuO NPs 浓度为 0.00125 mol·L⁻¹ 时,紫花苜蓿幼苗根系 H₂O₂ 含量具有最小值 3.88 μg·g⁻¹,和对照相比,只有这 2 个处理浓度下紫花苜蓿幼苗根系 H₂O₂ 的含量达到了显著性差异(图 1)。

2.1.2 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 O₂^{·-} 含量的影响

不同浓度的 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 O₂^{·-} 含量具有显著的影响(P<0.001)。随着 CuO NPs 浓度的增加,紫花苜蓿幼苗根系 O₂^{·-} 含量先升高后下降:在 CuO NPs 浓度为 0.0125 mol·L⁻¹ 时,O₂^{·-} 含量具

有最大值(28.116 nmol·g⁻¹)。和对照相比较,不同浓度的 CuO NPs 处理都导致了紫花苜蓿幼苗根系 O₂^{·-} 含量的升高,并且都达到了显著性差异(图 2)。

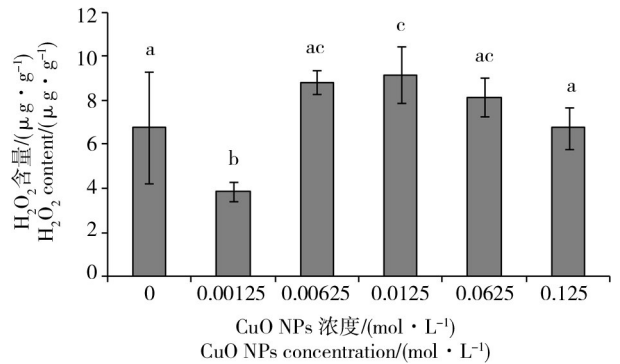


图 1 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 H₂O₂ 含量的影响

注:标注不同字母者表明不同处理和对照之间在 P=0.05 水平上存在显著性差异,下同。

Fig. 1 Effects of CuO NPs on H₂O₂ content of the alfalfa seedling root

Note: The different lowercase letters meant significant differences between different CuO NPs treatments and the control at the P=0.05 level, the same below.

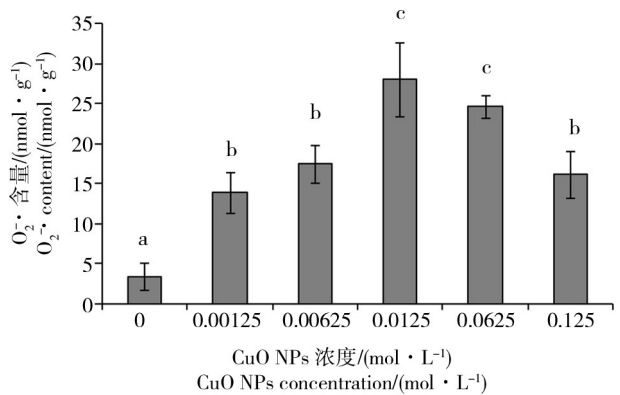


图 2 NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 O₂^{·-} 含量的影响

Fig. 2 Effects of CuO NPs on O₂^{·-} content of the alfalfa seedling root

2.2 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系抗氧化酶活性的影响

2.2.1 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 SOD 酶活性的影响

随着 CuO NPs 浓度的增加,SOD 酶活性先升高后降低。在 CuO NPs 浓度为 0.00625 mol·L⁻¹ 时,SOD 具有最大的酶活性(318.356 U·g⁻¹);在 CuO NPs 浓度为 0.125 mol·L⁻¹ 时,SOD 具有最小的酶活

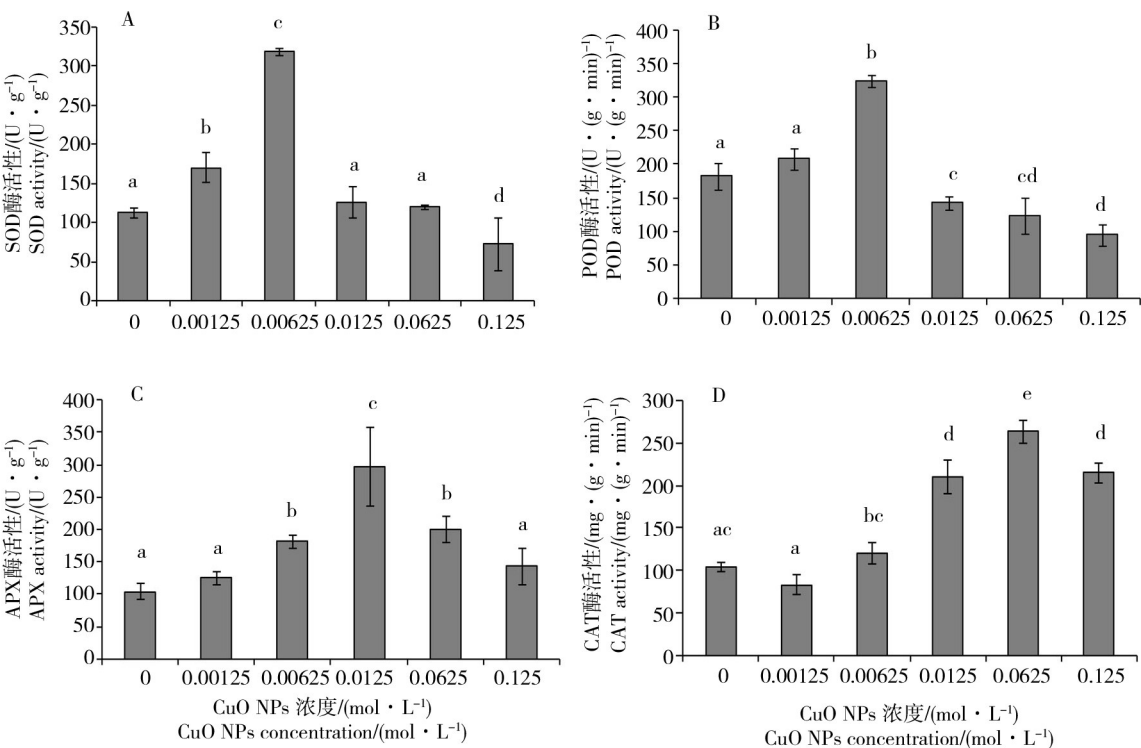


图 3 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系抗氧化酶活性的影响

Fig. 3 Effects of CuO NPs on activity of antioxidant enzymes of the alfalfa seedling root

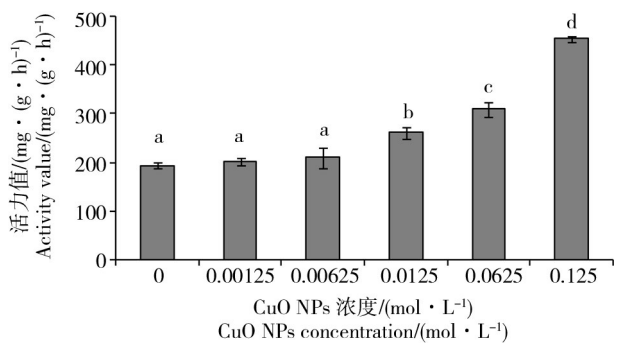


图 4 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系活力的影响

Fig. 4 Effects of CuO NPs on root activity of the alfalfa seedling

性(72.425 U · g⁻¹)。和对照相比较,只有 0.00125、0.00625 和 0.125 mol · L⁻¹ 的 CuO NPs 处理导致了紫花苜蓿幼苗根系中 SOD 酶活性的显著性变化(图 3A)。

2.2.2 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 POD 酶活性的影响

随着 CuO NPs 浓度的增加,POD 酶活性变化和 SOD 酶活性一致,都是先升高后降低。在 CuO NPs 浓度为 0.00625 mol · L⁻¹ 时,POD 具有最大的酶活性(324.553 U · (g · min)⁻¹);在 CuO NPs 浓度为 0.125 mol · L⁻¹ 时,POD 具有最小的酶活性(95.430 U · (g · min)⁻¹)。和对照相比较,除了 0.00125 mol · L⁻¹ 的

CuO NPs 处理外,其他处理都导致了紫花苜蓿幼苗根系中 POD 酶活性的显著性变化(图 3B)。

2.2.3 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 APX 酶活性的影响

随着 CuO NPs 浓度的增加,APX 酶活性变化和 SOD、POD 酶活性一致,都是先升高后降低。在 CuO NPs 浓度为 0.0125 mol · L⁻¹ 时,APX 具有最大的酶活性(297.467 U · g⁻¹)。和对照相比较,不同浓度的 CuO NPs 处理后,紫花苜蓿幼苗根系 APX 酶活性都有不同程度的升高,在 0.00625、0.0125 和 0.0625 mol · L⁻¹ 处理下达到显著性差异(图 3C)。

2.2.4 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 CAT 酶活性的影响

随着 CuO NPs 浓度的增加,CAT 酶活性先降低,再升高,然后又降低。在 CuO NPs 浓度为 0.0625 mol · L⁻¹ 时,CAT 具有最大的酶活性(263.268 mg · (g · min)⁻¹),在 CuO NPs 浓度为 0.00125 mol · L⁻¹ 时,CAT 具有最小的酶活性(83.245 mg · (g · min)⁻¹)。和对照相比较,除了浓度为 0.00125 mol · L⁻¹ 的 CuO NPs 处理,其他处理下紫花苜蓿幼苗根系 CAT 酶活性都有不同程度的升高,在 0.0125、0.0625 和 0.125 mol · L⁻¹ 处理下达到显著性差异(图 3D)。

2.3 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系活力的影响

随着 CuO NPs 浓度的增加,紫花苜蓿幼苗根系活力逐渐升高。在 CuO NPs 浓度为 $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,根系活力具有最大值($454.632 \text{ mg} \cdot (\text{g} \cdot \text{h})^{-1}$)。和对照相比较,不同浓度的 CuO NPs 处理都导致了紫花苜蓿幼苗根系活力的升高,并且在 0.0125 、 0.0625 和 $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下达到显著性差异(图 4)。

3 讨论 (Discussion)

3.1 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系 ROS 的影响

活性氧作为有氧代谢的副产物不断在植物体内产生。在正常的生长环境条件下,植物将产生活性氧作为信号代谢分子以调控不同的代谢反应,例如病毒防御、细胞程序性死亡和气孔开闭等^[35]。当受到环境胁迫时,植物体内的 H_2O_2 、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 等活性氧水平通常会上升,打破植物体内活性氧的动态平衡状态,过量的活性氧对植株造成不同程度的伤害,降低植物对于不良环境的耐受力,甚至引起植株死亡^[36]。已有研究表明,随着颗粒尺度变小,CuO NPs 表面晶格破损程度更高,产生活性位点更多,形成 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 及其他活性氧化物质更多,氧化压力提高,导致生物体脂质过氧化,细胞膜受到破坏^[37-38]。本研究表明,紫花苜蓿幼苗在 CuO NPs 处理下,随着 CuO NPs 浓度增大,根系中 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的变化趋势整体上呈现先升高后降低的趋势,除了在 CuO NPs 浓度为 $0.00125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时紫花苜蓿幼苗根系 H_2O_2 含量比对照小外,其他浓度下的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量都比对照有所增加,这说明 CuO NPs 的胁迫确实破坏了二者在紫花苜蓿幼苗根系中的动态平衡状态,导致了紫花苜蓿幼苗根系中 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的增加。而且,不管是 H_2O_2 还是 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量都是在 CuO NPs 浓度为 $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值,说明紫花苜蓿幼苗根系所能承受的 CuO NPs 的最大胁迫浓度在 $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右。当 CuO NPs 的浓度为 $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,紫花苜蓿幼苗的长度显著缩短,当 CuO NPs 的浓度大于 $0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对紫花苜蓿幼苗的抑制作用更强^[26],导致幼苗长势更差,所以相应的幼苗根系中的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量都会有所下降。

3.2 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系抗氧化酶活性的影响

植物在受到氧化逆境胁迫时,ROS 水平的动态平衡被打破的同时,自身的调节系统在一定限度内能够避免或降低氧化逆境诱导的细胞伤害和防止胞

内氧化还原状态的紊乱^[35]。在植物体内,ROS 清除是由酶促和非酶促抗氧化系统共同完成的^[39]。酶促抗氧化系统中的 SOD、POD、CAT 和 APX 等抗氧化酶能清除细胞内过量的活性氧,保护膜结构,使植物在一定程度上忍耐、减缓或抵抗氧化胁迫,它们的水平可作为植物逆境生理和衰老生理指标^[40-41]。同时,各种 ROS 抗氧化酶的平衡改变后将诱导这些清除酶之间的补偿机制,例如,当 CAT 活性在植物中降低,APX 清除酶活性上调^[42]。本研究表明,对应于不同浓度 CuO NPs 胁迫下紫花苜蓿幼苗根系中的 H_2O_2 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量都表现为先升高后下降,紫花苜蓿幼苗根系中的 SOD、POD、APX 和 CAT 的活性相应地也都表现为先增大后减小的趋势,这和金盛杨等^[24]和崔静等^[19]分别对暴露于 CuO NPs 的小麦根系和金鱼藻的研究结果是一致的。另外,SOD、POD、APX 和 CAT 的最大活性出现在不同的 CuO NPs 浓度胁迫下,表明这些抗氧化酶在清除活性氧方面表现出较强的协同性和补偿性,来共同清除紫花苜蓿幼苗根系中的活性氧。在较低浓度的 CuO NPs ($0.00625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)胁迫下,在清除活性氧方面 SOD 和 POD 的活性发挥出最大作用;在稍高浓度的 CuO NPs ($0.0125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)胁迫下,在清除活性氧方面 APX 的活性发挥出最大作用;在较高浓度的 CuO NPs ($0.0625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)下,在清除活性氧方面 CAT 的活性发挥出最大作用。CuO NPs 胁迫下这些抗氧化酶表现出不同的响应方式,可能与 CuO NPs 悬浮液中离子的浓度、紫花苜蓿幼苗根系中的各种活性氧的种类和浓度、迁移性、在植物体内的存在状态等有关,也可能与不同抗氧化酶有着不同的氨基酸序列及空间结构等有关^[41]。这一结果表明植物在受到毒害时,并不只是某一种酶的平衡被打破,而是植物整个的生理活动和生化反应受到整体影响^[43]。关于这些抗氧化酶是如何协同一致地清除根系中的活性氧以及互相之间的补偿表达,需要进一步进行深入地研究。

3.3 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系活力的影响

植物的根系活力反映了根系代谢强度的大小。活力越高,则根系组织的代谢活动就越旺盛^[24]。本研究发现,随着 CuO NPs 浓度的增加,紫花苜蓿幼苗根系活力逐渐升高,这与金盛杨等^[24]对小麦根系的研究结果是一致的,小麦根系活力随着 CuO NPs 暴露浓度的升高而升高。说明植物都能通过提高根系活力对 CuO NPs 暴露作出适应性以减少纳米材料的毒害。在这一过程中,SOD、POD、APX、CAT

等抗氧化酶系统的保护作用可能对提高紫花苜蓿幼苗根系的新陈代谢的能力起到了一定的作用。从纯水对照到 $0.00625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 处理,紫花苜蓿幼苗根系活力没有显著性变化;从 $0.00625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $0.0625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 处理下,紫花苜蓿幼苗根系活力显著性增大,但增加的幅度较小;从 $0.0625 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $0.125 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CuO NPs 处理,紫花苜蓿幼苗根系活力也显著性增大,增加的幅度最大。这说明植物面对胁迫的加剧可以通过逐步加快自身新陈代谢的速率,加速有毒物质在自身体内外的转运来抵御 CuO NPs 暴露带来的毒性伤害,这是一种生物适应性应激响应的体现。

3.4 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系生理生态影响的可能机制分析

目前,CuO NPs 对生物的毒性机制还没有完全的定论。已有的研究表明,CuO NPs 颗粒的毒性可能来源于从 CuO NPs 颗粒中溶出的 Cu^{2+} ,也可能来源于 CuO NPs 颗粒固有的纳米特性,还可能是它和生物体内的其他物质相互作用后产生的二次毒性。金盛杨等^[24]研究发现 CuO NPs 对小麦的毒性主要是由 CuO NPs 颗粒释放出的 Cu^{2+} 引起的。陆其聪等^[11]以模式生物酿酒酵母 BY4741 为对象,研究了不同粒径的 CuO NPs 对酿酒酵母的细胞毒性效应,结果发现,CuO NPs 对酵母的细胞毒性主要是由可溶性 Cu^{2+} 引起的,团聚作用和尺寸效应对 CuO NPs 的毒性影响不明显。向垒等^[23]研究揭示 CuO NPs 对白菜种子的毒害是由纳米效应决定而非溶出的 Cu^{2+} 所致。Griffitt 等^[44]指出溶出的可溶性铜不足以解释 CuO NPs 的毒性,可能是由于 CuO NPs 所处介质不同引起的。Gunawan^[12]的研究表明,CuO NPs 在 H_2O 、NaCl、酵母提取物、蛋白胨及 LB 培养基中溶出的 Cu^{2+} 的含量是不同的,介质和含量的不同决定了溶出的 Cu^{2+} 是以络合物的形式或者通过特洛伊效应产生毒性,因而在不同研究体系下 CuO NPs 表现出不同的毒性机制。

这些研究结果表明,CuO NPs 的生物毒性机制随着生物种类和生物组织水平的不同而有所不同。具体到 CuO NPs 对紫花苜蓿幼苗根系生理生态过程的毒性机制是否和溶出的 Cu^{2+} 有关,还是由于其自身具有的纳米效应引起的,或者是其他原因引起的,需要接下来和微米氧化铜以及可溶性 Cu^{2+} 作对照实验进行深入地研究。

研究员,主要研究方向为纳米材料的生物安全性。

参考文献 (References):

- [1] 白春礼. 纳米科技及其发展前景[J]. 科学通报, 2001, 46(2): 89-92
Bai C L. Nano-technology and its developing prospect [J]. Chinese Science Bulletin (Chinese Version), 2001, 46(2): 89-92 (in Chinese)
- [2] 汪冰, 丰伟悦, 赵宇亮, 等. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展[J]. 中国科学 B 辑: 化学, 2005, 35(1): 1-10
Wang B, Feng W Y, Zhao Y L, et al. Biological effects and progress in toxicology of nanomaterials [J]. Science in China Series B: Chemistry, 2005, 35(1): 1-10 (in Chinese)
- [3] Masciangioli T, Zhang W X. Environmental technologies at the nanoscale [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(5): 102A-108A
- [4] Klaine S J, Alvarez P J J, Batley G E, et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27: 1825-1851
- [5] Saison C, Perreault F, Daigle J C, et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 96: 109-114
- [6] Bhatt I, Tripathi B N. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment [J]. Chemosphere, 2011, 82(3): 308-317
- [7] Scown T M, van Aerle R, Tyler C R. Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? [J] Critical Reviews in Toxicology, 2010, 40(7): 653-670
- [8] 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
- [9] Thit A, Selck H, Bjerregaard H F. Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): Effects on proliferation, cell cycle progression and cell death [J]. Toxicology in Vitro, 2013, 27: 1596-1601
- [10] Rodhe Y, Skoglund S, Wallinder I O, et al. Copper-based nanoparticles induce high toxicity in leukemic HL60 cells [J]. Toxicology in Vitro, 2015, 29(7): 1711-1719
- [11] 陆其聪, 方涛, 戴和平, 等. 纳米氧化铜对酿酒酵母的细胞毒性机制研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(8): 2341-2348

- Lu Q C, Fang T, Dai H P, et al. The cytotoxicity mechanism of CuO nanoparticles to yeast *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(8): 2341-2348 (in Chinese)
- [12] Gunawan C, Teoh W Y, Marquis C P, et al. Cytotoxic origin of copper (II) oxide nanoparticles: Comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts [J]. *ACS Nano*, 2011, 5(9): 7214-7225
- [13] Shang E X, Li Y, Niu J F, et al. Effect of aqueous media on the copper-ion-mediated phototoxicity of CuO nanoparticles toward green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 122: 238-244
- [14] Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 188: 112-118
- [15] Meng H, Chen Z, Xing G M, et al. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles [J]. *Toxicology Letters*, 2007, 175: 102-110
- [16] Wang Z, Li J, Zhao J, et al. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(14): 6032-6040
- [17] Blinova I, Ivask A, Heinlaan M, et al. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(1): 41-47
- [18] Aruoja V, Dubourgule H C, Kasemets K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407: 1461-1468
- [19] 崔静, 袁旭音, 刘泉, 等. 环境水体中纳米氧化铜对金鱼藻的毒性效应研究[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(5): 910-915
- Cui J, Yuan X Y, Liu Q, et al. Toxic effects of low concentration copper oxide nanoparticles on *Ceratophyllum demersum* in the aquatic environment [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(5): 910-915 (in Chinese)
- [20] Perreault F, Oukarroum A, Pirastru L, et al. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba* [J]. *Journal of Botany*, 2010.doi:10.1155/2010/763142.
- [21] Gomes T, Pereira C G, Cardoso C, et al. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 118-119: 72-79
- [22] Siddiqui S, Goddard R H, Bielmyer-Fraser G K. Comparative effects of dissolved copper and copper oxide nanoparticle exposure to the sea anemone, *Exaiptasia pallid* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 160: 205-213
- [23] 向垒, 莫测辉, 卢锡洪, 等. 纳米氧化铜对白菜种子发芽的毒害作用研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(9): 1830-1835
- Xiang L, Mo C H, Lu X H, et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles to the seed germination of Chinese cabbage [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9): 1830-1835 (in Chinese)
- [24] 金盛杨, 王玉军, 汪鹏, 等. 纳米氧化铜对小麦根系生理生化行为的影响[J]. *土壤*, 2011, 43(4): 605-610
- Jin S Y, Wang Y J, Wang P, et al. Effects of CuO nanoparticles on physiological and biochemical behaviors of wheat (*Triticum aestivum* L.) root [J]. *Soils*, 2011, 43(4): 605-610 (in Chinese)
- [25] 董宽虎. 苜蓿产业化生产与加工利用[M]. 北京: 金盾出版社, 2002
- Dong K H. The industrialization of alfalfa production and processing application [M]. Beijing: Jindun Publishing House, 2002 (in Chinese)
- [26] 刘振国, 王天慧, 王伟. 纳米氧化铜对紫花苜蓿种子发芽和幼苗生长的毒害作用[J]. *上海农业学报*, 2014, 30(4): 47-51
- Liu Z G, Wang T H, Wang W. Toxicity of nano-copper oxide on the seed germination and seedling growth of alfalfa [J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2014, 30(4): 47-51 (in Chinese)
- [27] 魏志琴, 陈志勇, 秦蓉, 等. Cu²⁺对拟南芥根的局部毒性及诱导 DNA 损伤和细胞死亡[J]. *植物学报*, 2013, 48(3): 303-312
- Wei Z Q, Chen Z Y, Qin R, et al. Cu²⁺ induced local toxicity and DNA damage, cell death in roots of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2013, 48(3): 303-312 (in Chinese)
- [28] Banerjee B D, Seth V, Bhattacharya A, et al. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers [J]. *Toxicology Letters*, 1999, 107: 33-47
- [29] Vale G, Mehennaoui K, Cambier S, et al. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 170: 162-174
- [30] He J, Ji Z X, Wang Q Z, et al. Effect of Cu and Pb pollution on the growth and antioxidant enzyme activity of *Suaeda heteroptera* [J]. *Ecological Engineering*, 2016, 87: 102-109

- [31] 李忠光, 宋玉泉, 龚明. 二甲酚橙法用于测定植物组织中的过氧化氢[J]. 云南师范大学学报, 2007, 27(3): 50-54
Li Z G, Song Y Q, Gong M. Xylenol orange method used for the measurement of hydrogen peroxide in plant tissue [J]. Journal of Yunnan Normal University, 2007, 27(3): 50-54 (in Chinese)
- [32] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进[J]. 云南植物研究, 2005, 27(2): 211-216
Li Z G, Gong M. Improvement of measurement method for superoxide anion radical in plant [J]. Acta Botanica Yunnanica, 2005, 27(2): 211-216 (in Chinese)
- [33] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006
Li H S. Principles and Techniques of Plant Physiology and Biochemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006 (in Chinese)
- [34] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts [J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22: 867-880
- [35] 张怡, 路铁刚. 植物中的活性氧研究概述[J]. 生物技术进展, 2011, 1(4): 242-248
Zhang Y, Lu T G. The research of reactive oxygen species (ROS) in plants [J]. Current Biotechnology, 2011, 1(4): 242-248 (in Chinese)
- [36] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. Trends in Plant Sciences, 2002, 7(9): 405-410
- [37] 林道辉, 冀静, 田小利, 等. 纳米材料的环境行为与生物毒性[J]. 科学通报, 2009, 54: 3590-3604
Lin D H, Ji J, Tian X L, et al. Environmental behavior and toxicity of engineered nanomaterials [J]. Chinese Science Bulletin (Chinese Version), 2009, 54: 3590-3604 (in Chinese)
- [38] Nel A, Xia T, Mädler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. Science, 2006, 311(5761): 622-627
- [39] Ahmad P, Jaleel C A, Salem M A, et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2010, 30(3): 161-175
- [40] Patra J, Lenka M, Panda B B. Tolerance and co-tolerance of the grass *Chloris barbata* Sw. to mercury, cadmium and zinc [J]. New Phytologist, 1994, 128: 165-171
- [41] 胡金朝, 施国新, 丁秉中, 等. Cd^{2+} 和 Cr^{6+} 对慈姑(*Sagittaria sagittifolia* L.)的毒害效应[J]. 湖泊科学, 2006, 18(2): 157-162
Hu J C, Shi G X, Ding B Z, et al. The toxic effects of Cd^{2+} and Cd^{6+} on *Sagittaria sagittifolia* L. [J]. Journal of Lake Sciences, 2006, 18(2): 157-162 (in Chinese)
- [42] Rizhsky L, Hallak-Herr E, van Breusegem F, et al. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase [J]. The Plant Journal, 2002, 32(3): 329-342
- [43] 施国新, 杜开和, 解凯彬, 等. 汞、镉污染对黑藻叶细胞伤害的超微结构研究[J]. 植物学报, 2000, 42(4): 373-378
Shi G X, Du K H, Xie K B. Ultrastructural study of leaf cells damaged from Hg^{2+} and Cd^{2+} pollution in *Hydrilla verticillata* [J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(4): 373-378 (in Chinese)
- [44] Griffitt R J, Weil R, Hyndman K A, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(23): 8178-8186 ◆