

量子点与 Cu^{2+} 对 L02 细胞毒性的协同作用机制: 量子点可能的木马角色

赵宇侠, 林匡飞*, 张卫, 苗优娜, 刘莉莉

(华东理工大学资源与环境工程学院, 国家环境保护化工过程环境风险评估与控制重点实验室, 上海 200237)

摘要: 量子点由于其广泛应用及可能的对环境的危害而引起关注, 理解量子点对原有环境污染物诱导毒性的影响以及相关的机制对于控制量子点的环境风险具有重要意义. 用 $2 \mu\text{g/mL}$ (IC_{10}) 的 QDs 和 $2.5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ ($\text{IC}_{10} \sim \text{IC}_{40}$) 的 Cu^{2+} 以及人胚肝细胞 (L02) 作为研究对象, 通过 EDX 和量子点荧光光谱的变化确定了量子点和 Cu^{2+} 的结合, 量子点的存在提高了细胞内 Cu^{2+} 含量, 并进而由 MTT 和 HE 染色结果确定了相应的量子点存在下 Cu^{2+} 诱导的细胞毒性的增加: 细胞形态显著变化, 存活率最大降低了 3 倍. 由此推测量子点在此过程中可能扮演了木马角色, 吸附了 Cu^{2+} 并携带其进入细胞, 使得细胞内的 Cu^{2+} 含量增加进而导致毒性提高. 量子点在环境中的这种特征值得关注.

关键词: 量子点 CdTe; Cu^{2+} ; L02 细胞; 细胞毒性

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2010)09-2196-06

Mechanism of Quantum Dots Facilitating Cu^{2+} -Induced Hepatic L02 Cells Toxicity: Possible Trojan-Horse Role of QDs

ZHAO Yu-xia, LIN Kuang-fei, ZHANG Wei, MIAO You-na, LIU Li-li

(State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Concerns regarding the potential environmental impact of quantum dots (QDs) are raised for its extensive use. Understanding the influences of QDs on original environmental pollutants induced toxicity and obtaining information about the mechanism is crucial to evaluate potential ecological hazards posed by QDs. The effects of QDs on Cu^{2+} induced Hepatic L02 cells toxicity and the mechanisms were investigated. IC_{10} value of $2 \mu\text{g/mL}$ QDs and IC_{10} - IC_{50} value of $2.5 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ of Cu^{2+} was used in this study. Firstly Luminescence emission spectrum of QDs showed 10 nm red shifts with addition of Cu^{2+} provide the interaction possibility of QDs and Cu^{2+} , the further X-ray energy dispersive spectroscopy (EDX) analysis indicated binding of Cu^{2+} on QDs surface. Then the intracellular Cu^{2+} concentrations showed increase with addition of QDs, which is accompanied by loss of cell viability and morphology changes. The mechanism was therefore assumed as interaction of QDs- Cu^{2+} improved the intracellular Cu^{2+} level then cytotoxicity. QDs seemed to serve as Trojan-horse taking much more Cu^{2+} into cells via cheating cell membrane recognition, which imply the possible interactions with heavy metal ions will pose a significant influence on environment and human body.

Key words: quantum dots (QDs); Cu^{2+} ; L02 cell; toxicity;

人工纳米材料不同与生物的或者自然产生的纳米粒子, 通常人工纳米材料包括金属晶体核心和表面壳层, 这些壳层可以保护金属核心并且赋予量子点独特的荧光性质和表面活性^[1], 量子点的表面活性的获得是通过在合成时对表面涂层功能化. 然后壳层可以通过静电结合、吸附、螯合和共价结合等多种方式增加表面活性. 因此量子点可以用做分子探针和体内成像等. MPA 具有羧基, 该官能团提供了上述提到的结合的可能^[2,3]. 同样, 这些广泛的结合能力也带来与其他毒物结合的可能, 最终导致对环境或者人体的毒性的风险^[4].

重要的是 Limbach 等^[5]发现相较其水溶液粒子形式, 某些过渡金属以氧化物的形式结合进纳米粒

子时更容易进入细胞, 所以他们认为在这个过程中纳米粒子执行了木马功能, 携带着过渡金属骗过细胞膜防御系统进入细胞, 从而造成细胞毒性的增加. 另有一些报道认为纳米粒子能提高过渡金属的毒性, 因为其巨大的比表面积能够促成与金属的结合^[2,6-8]. 同时量子点与铜离子的结合已被确认并

收稿日期: 2009-11-04; 修订日期: 2009-12-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40871223, 40901148, 20677015); 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA06Z331); 环保部公益性专项 (200909089); 中央高校基本科研业务费专项 (WB0911011, WB0914041); 上海市教育发展基金会—晨光计划 (2007CG39); 上海市自然科学基金项目 (09ZR1407700); 哈尔滨工业大学城市水资源与水环境国家重点实验室项目 (ES200902)

作者简介: 赵宇侠 (1974~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为环境微生物和环境毒理, E-mail: maryzyx@163.com

* 通讯联系人, E-mail: kflin@ecust.edu.cn

应用于检测痕量金属铜^[9]. 因此量子点可能结合金属铜并执行木马角色携带更多的铜离子进入细胞进而带来毒性的增加.

铜的主要暴露路径是饮食^[10,11]. 肝是铜离子蓄积的重要靶器官. 很多铜代谢相关的缺陷导致铜在肝脏内缓慢蓄积最后导致肝脏疾病^[12~14]. 另外铜浓度在儿童体内被发现(以干重计)为 6 mg/g ^[11,15]. 环境内的 Cu^{2+} 也被发现超过 1 mmol/mL ^[11,16] 以及在地表水中高达 90 mmol/mL . 另外基于量子点的广泛的应用,体内的肝蓄积和环境暴露同样也是量子点的重要来源^[17],同时文献[3,18]用 $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 的量子点标记 HeLa 细胞并且文献[3,19]也用 $4 \text{ }\mu\text{g/mL}$ 的量子点结合 Her2 抗原靶向乳腺癌细胞. 所以肝脏内蓄积这种 $\mu\text{g/mL}$ 水平的量子点和 Cu^{2+} 是可能的.

本研究的目标是确认量子点对 Cu^{2+} 诱导的 L02 细胞毒性的影响. 关注量子点可能的木马角色. 通过量子点荧光光谱和 EDX 分析确定 2 种物质的结合. 测定细胞内的 Cu^{2+} 含量确认量子点的木马角色. 最后通过 MTT 和 HE 染色观察细胞存活率和细胞形态变化确定细胞的毒性的变化.

1 材料与方法

1.1 量子点的制备和性质

除了特别指出外,所用的试剂包括 6-carboxy-2',7'-dichlorodihydrofluorescein (CDCFH), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 以及无水氯化铜都购自 Sigma 试剂公司 (St. Louis, MO, USA). 量子点 CdTe-MPA 由本校化工学院的钟教授合成. 量子点直径为 3.7 nm 发红光,摩尔浓度为 $5.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$,质量浓度为 0.64 mg/mL 在 pH 值 6~12 范围内稳定,合成方法参见文献[20]. 量子点合成后用收集离心用丙醇纯化以去除杂质.

1.2 细胞培养,量子点和铜离子处理

L02 人胚肝细胞购自中科院细胞库,细胞用 RPMI-1640 培养基 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 加入 10% 的胎牛血清 (FBS) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) 在 37°C 湿度是 95% 和 5% 的 CO_2 的条件下培养. 细胞在 96 孔板上以(细胞数) 10^4 个/mL 的初始浓度培养,用于分析细胞内 Cu^{2+} 浓度的实验使用的是 12 孔板和细胞初始浓度是 10^4 个/mL. 细胞处理前 1 h,含有血清的培养基吸出,细胞 PBS 缓冲液洗 2 遍后替换上新鲜的

无血清培养基^[21].

细胞用不同浓度的单独的或联合的量子点 ($2 \sim 20 \text{ }\mu\text{g/mL}$) 与 Cu^{2+} ($2 \sim 320 \text{ }\mu\text{g/mL}$) 处理细胞,培养 24 h 后用于各项分析. QDs 从 10 mg/mL 的无血清的培养基配制的母液稀释得到, CuCl_2 从无菌的超纯水配置的 30 mg/mL 的母液稀释得到.

1.3 MTT 法测定细胞存活率

活细胞线粒体可还原 MTT 为紫色的甲臞结晶,在一定范围内紫色深浅与活细胞浓度呈线性关系,通过测定甲臞 570nm 波长处的吸光值可反映活细胞活力的变化. 取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板 (1×10^4 个/mL),培养 24 h 使细胞贴壁,弃培养液,每孔加入含药的培养基稀释的浓度分别为 0、2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cu^{2+} 和 0、2.5、5、10、20、40、80、160 $\mu\text{g/mL}$ 的量子点 CdTe 溶液,每个剂量组设定 3 个复孔. 染毒 24 h 后弃去每孔中的培养液,加入含 10% MTT (5 mg/mL) 的 RPMI-1640 培养基(不含胎牛血清),继续培养 4 h 后,弃去 MTT 溶液,每孔加入 DMSO $150 \text{ }\mu\text{L}$ 后,于 37°C 振荡至紫色的甲臞结晶完全溶解后用酶标仪测定各孔在 570 nm 波长处的吸光度值. 确定量子点和 Cu^{2+} 对 L02 细胞的半致死浓度^[21].

对于联合毒性实验方法如上,量子点选择了 2 $\mu\text{g/mL}$ (24 h 细胞致死率 10%) 和 2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的 Cu^{2+} ,进行了 Cu^{2+} 单独处理和量子点- Cu^{2+} 联合处理的细胞存活率实验. 同样在无血清的培养基中处理 24h 后替换 MTT 在 570 nm 波长处测定了吸光度值. 确定量子点的存在对 Cu^{2+} 细胞存活率的影响.

1.4 细胞形态学观察

将待测试细胞接种于 6 孔板(内置盖玻片),培养 24 h,待细胞贴壁后,分别加入各种浓度受试物,处理 24 h,将盖玻片取出,用细胞固定液(甲醇:冰醋酸=3:1)固定 5 min,蒸馏水稍洗后加 HE (苏木精-伊红) 染色 10 min,洗片后风干,倒置显微镜 (IMT-2, Olympus, Tokyo) 下观察细胞形态学变化.

1.5 细胞内的铜离子含量测定

选择了 2 $\mu\text{g/mL}$ 的量子点 (24 h 细胞致死率 10%) 和 2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 Cu^{2+} 浓度来进行 QDs- Cu^{2+} 和 Cu^{2+} 处理的 L02 细胞实验,细胞如上述方法在 12 孔板上培养 24 h 后,离心 5 min (5000 r/min),细胞残留的上清液从孔中吸出,细胞用 PBS 缓冲液洗 2 次以去除细胞表面残留的 Cu^{2+} . $200 \text{ }\mu\text{L}$ 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°C 的冰箱中反复冻融直到完全裂解. Cu 或 Cd 的含量用 Varian SpectrAA 400 Zeeman 石墨炉原子吸收分光光度计 (GFAAS) 来测定. 每个实验平行 3 组^[22].

1.6 统计分析

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 Origin 7.5 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- Cu^{2+} 联合处理样品对单独 Cu^{2+} 处理的差异显著.

2 结果与讨论

如前所述, 本研究的关键是确定量子点在与 Cu^{2+} 共存时是否存在木马效应, 从而提高 Cu^{2+} 所诱导的毒性. Limbach 等^[5]认为过渡金属包裹进纳米粒子中比其水溶液离子形式更容易穿过细胞膜屏障进入细胞, 纳米材料载带的金属进入细胞后成功地释放出离子使得细胞内离子含量增加, 进而毒性增强. 对与在地球上存在了千百年的过渡金属而言, 细胞膜在与其长期共存的过程中已经发展出了对它的抗性, 而纳米材料作为新兴的异生物质, 细胞膜防御系统还没有进化出对其毒性的抵抗能力, 或者这种能力相对较弱. 这就使得纳米粒子更容易进入细胞, 而其强表面活性有赋予它结合各种离子的能力, 所以量子点扮演木马角色, 携带 Cu^{2+} 进入细胞并增加对细胞的毒性具有现实可能.

在本研究中, 为了评估是否量子点扮演木马角色, 先需要确定量子点和 Cu^{2+} 的结合: 通过加入 Cu^{2+} 后量子点的荧光光谱的红移和 EDX 结果来确认. 再比较量子点的加入前后细胞内 Cu^{2+} 浓度的变化确定量子点是否扮演木马角色. 最后通过 MTT 和 HE 染色实验确定细胞存活率和细胞形态的变化来确定细胞毒性的增加.

2.1 QDs- Cu^{2+} 结合

2.1.1 量子点荧光光谱的红移

实验用的 MPA-CdTe 中含有羧基, 该官能团能够与 Cu^{2+} 结合, 进而使量子点的粒径发生变化. 这时量子点的荧光光谱会发生红移. 所以量子点的荧光光谱的变化可以从侧面证明量子点和 Cu^{2+} 之间的结合. 用实验选用浓度范围内的量子点和 Cu^{2+} 在用无血清培养基中测定量子点荧光信号立刻淬灭, 为了得到可以捕捉的信号笔者把量子点浓度加大到 $50 \mu\text{g/mL}$, 测得的量子点的荧光光谱在加入不同浓度的 Cu^{2+} 后发生了大约 15 nm 左右的红移, 证明了

量子点和 Cu^{2+} 之间的结合 (图 1). 量子点的表面化学性质主要取决于官能团^[2,3], 考虑到量子点的荧光是由导带和价带间激发的电子再复合的过程产生的, 所以由环境中的离子或小分子结合导致的表面电性和表面成分的变化进而影响电子-空穴再复合的效率, 可能最终导致荧光的变化^[23]. 表面官能团的与 Cu^{2+} 结合也可能影响其跨膜转运导致细胞内的 Cu^{2+} 含量的变化进而影响其诱导的细胞毒性.

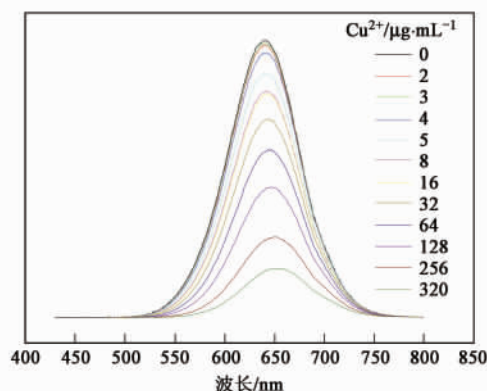


图 1 加入 Cu^{2+} 后的 MPA-CdTe QDs 的荧光光谱变化

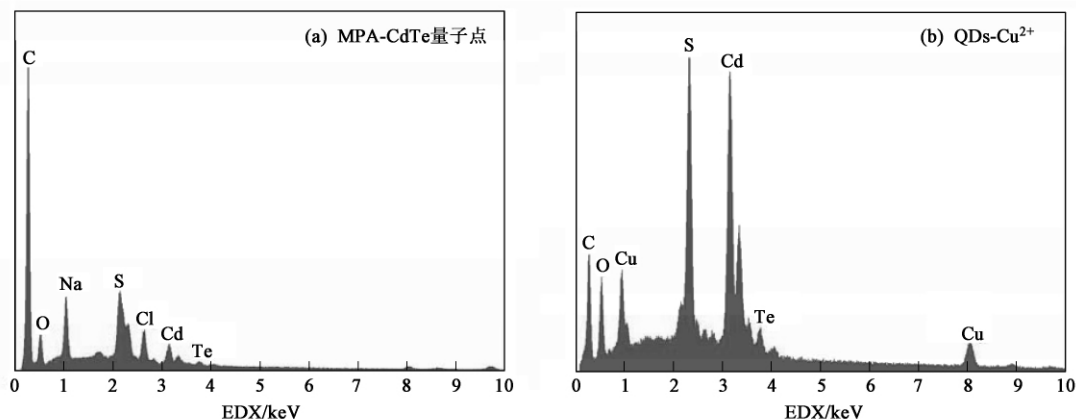
Fig. 1 Changes of MPA-CdTe QDs PL spectra with addition of Cu^{2+}

2.1.2 EDX 结果

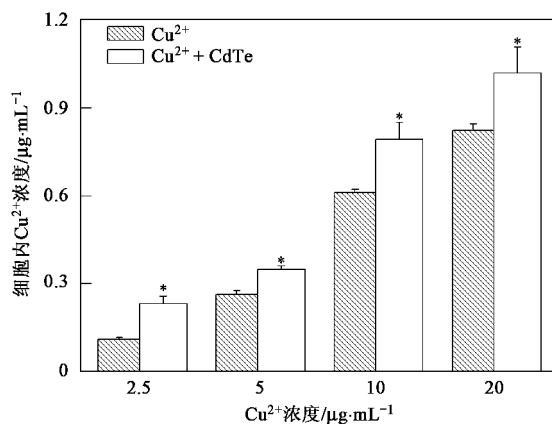
笔者采用了 X 射线能量散射光谱 (EDX) 进一步分析以确定量子点与 Cu^{2+} 的结合. 研究了 2 个样品, 单独的量子点和量子点与 Cu^{2+} 的复合物, 后者在量子点中加入 Cu^{2+} 后, 样品离心 15 min ($10\,000 \text{ r/min}$), PBS 缓冲液洗 2 次以去除表面黏附的 Cu^{2+} , 然后 70°C 烘干. 结果见图 2, 铜元素出现在量子点样品中, 证明了 Cu^{2+} 确实结合在量子点的表面. 结合前面量子点光谱红移的结果说明了量子点与 Cu^{2+} 在无血清培养基中确实发生了某种非物理方式的结合, 可能是与羧基的静电结合, 该结合的发生导致了量子点荧光性的变化.

2.2 细胞内的 Cu^{2+} 含量的增加

木马效应的第二方面是证明量子点促进了 Cu^{2+} 进入细胞, 因为量子点可以与细胞表面的糖蛋白和糖脂结合并被吸收进入细胞^[18,24-26], 并且细胞与具不同表面修饰的量子点共存会导致不同毒性源自细胞内的铜水平的差异而非物质的毒性^[22,27]. 所以笔者要检测的 L02 细胞的不同的毒性结果可能来自细胞内的不同的铜水平. 为了验证这个假设, 进行了单独 Cu^{2+} 处理和量子点- Cu^{2+} 联合处理的 2 组实验, 测定细胞内的铜含量. 选择了 $2 \mu\text{g/mL}$ 的量子点

图2 EDX 分析的 MPA-CdTe 量子点以及量子点- Cu^{2+} 样品结果Fig.2 EDX results of QDs and QDs- Cu^{2+}

(24 h 细胞致死率 10 %) 和 2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 浓度来进行 QDs- Cu^{2+} 和 Cu^{2+} 处理的 L02 细胞实验,细胞如上述方法在 12 孔板上培养 24 h 后离心裂解并测定细胞内的铜和镉含量.结果如图 3.量子点加入前后 Cu^{2+} 都能够进入细胞,相对与 Cu^{2+} 单独处理的样品来说,量子点的存在导致了 Cu^{2+} 进入细胞量的略微显著增加,在实验室测定条件下, Cu^{2+} 进入细胞的浓度大约相当于初始 Cu^{2+} 浓度的 1/10 ~ 1/20,而镉含量则大约是量子点原初浓度的 1/2 左右(数据省略).这也从侧面说明了量子点的跨膜转运能力要远大于 Cu^{2+} ,也暗示了其木马角色的可能性.量子点携带的 Cu^{2+} 增量没有表现出剂量-依赖效应,可能是由于量子点表面的结合位有限,一旦达到饱和就不会有明显增加^[28].

图3 L02 细胞内的 Cu^{2+} 含量Fig.3 Intracellular Cu^{2+} concentrations of L02 cells

2.3 量子点对铜离子诱导的细胞毒性的影响

从 2.1、2.2 节的结果看,量子点确实扮演了木

马角色携带 Cu^{2+} 骗过细胞膜防御系统,导致细胞内的 Cu^{2+} 含量增加.而这种增加的 Cu^{2+} 是否确实导致了细胞毒性的相应提高仍有待证明.本研究用 MTT 实验 HE 染色来确定细胞存活率和细胞形态的变化来评估细胞毒性的变化.同样选择了 2 $\mu\text{g/mL}$ 的量子点(24 h 细胞致死率 10 %)和 2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 浓度来进行 QDs- Cu^{2+} 和 Cu^{2+} 处理的 L02 细胞实验,细胞在 96 孔板上培养 24 h 后分别按照 MTT 和 HE 染色的步骤来处理 and 观察.前面的 MTT 实验确定了量子点和 Cu^{2+} 的半致死浓度 (IC_{50}) 分别为 20 $\mu\text{g/mL}$ 和 30 $\mu\text{g/mL}$;为避免细胞过度死亡导致的细胞数目太少影响检测,选用 IC_{10} 值(24 h 培养后,导致 10 % 细胞死亡的浓度)即 2 $\mu\text{g/mL}$ 的量子点和 $\text{IC}_{10} \sim \text{IC}_{40}$ 值(2.5、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$) 的 Cu^{2+} 浓度来进行实验.结果表明,2 $\mu\text{g/mL}$ 的量子点的加入显著提高了 Cu^{2+} 所诱导的细胞毒性(图 4).尽管量子点单独只能导致 10% 的

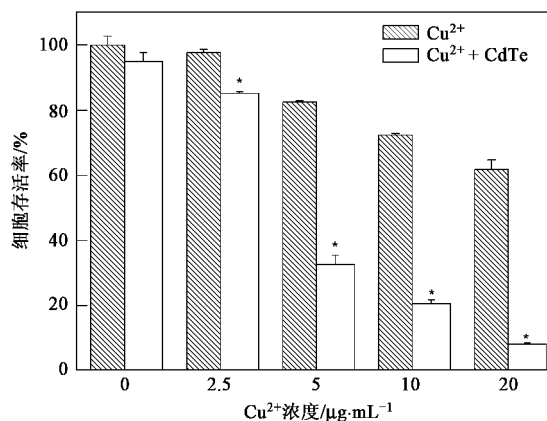


图4 L02 细胞存活率降低

Fig.4 Decrease of L02 cells viability

细胞死亡,与 Cu^{2+} 共存后却能使细胞存活率下降了最多 3 倍.表现出明显的协同作用.一方面结合上面研究的增加细胞内 Cu^{2+} 含量的结果,细胞内的 Cu^{2+} 含量增加确实导致了毒性的增加,证明了木马效应的存在.另一方面,也注意到增加的毒性与细胞内的增加的铜含量程度并不完全一致,也就是说除了木马效应之外可能还存在其他因素影响由于与量子点共存导致的毒性增加.

2.4 细胞形态的变化

为了进一步确证量子点的加入带来的细胞毒性的增加,本研究用 HE 染色通过倒置显微镜观察细

胞的形态变化,如图 5 所示.正常的 L02 细胞为多边形,具有完整的细胞核,并且折光性和贴壁状态也很好.但是经过与 QDs- Cu^{2+} 和 Cu^{2+} 24 h 的共同培养后,细胞形态发生了不同程度的变化.对于低浓度组的 $2.5 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 处理的样品来说没有明显的变化,加入量子点后细胞数目减少,这与 MTT 实验的结果一致.对于中浓度组的 $5 \mu\text{g/mL}$ Cu^{2+} 来说,无论是对单独的 Cu^{2+} 还是 QDs- Cu^{2+} 联合处理组,都出现了明显的形态变化.尤其联合组出现了明显的细胞浆固缩等伤害.同样更加严重的形态变化出现在 10 、 $20 \mu\text{g/mL}$ 的高浓度组细胞:包括明显的细胞

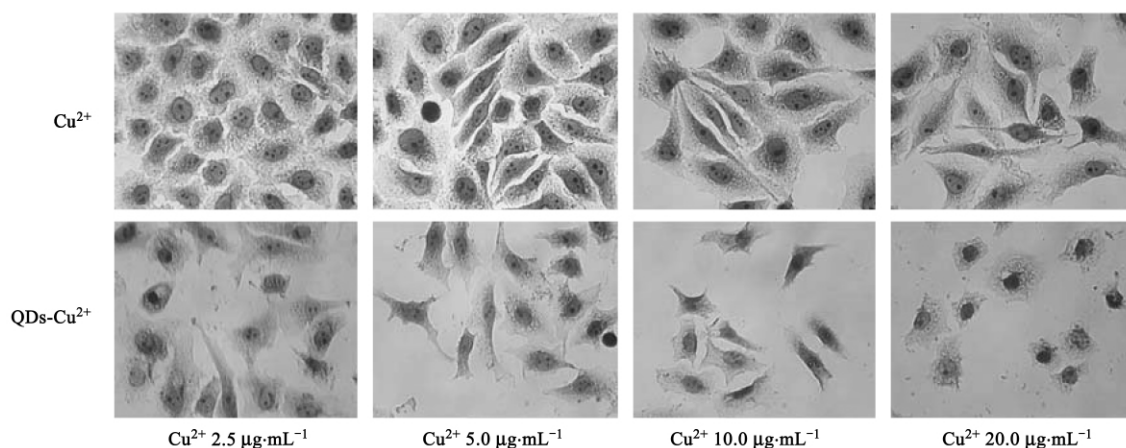


图 5 QDs- Cu^{2+} / Cu^{2+} 处理的 L02 细胞形态变化

Fig. 5 QDs- Cu^{2+} / Cu^{2+} treated L02 cells morphology changes

核直径变小和核收缩.

3 结论

(1) 量子点的加入提高了细胞内的铜离子的浓度并伴随细胞存活率的下降和细胞形态的变化.

(2) 尽管没有再增加毒性(以细胞死亡率考察)与增加的细胞内铜水平的程度不一致,但是增加的铜离子含量至少部分解释了增加的毒性,可以作为铜离子与量子点共存时增加的毒性的机制之一.

(3) 对于量子点毒性的评估和管理应充分考虑其所带来的附加的环境和人体风险.在复杂的环境污染物体系中木马效应值得考虑.

参考文献:

- [1] Hardman R A. Toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors [J]. Environ Health Perspect, 2006, **114**: 165-172.
- [2] Barlow P G, Clouter-Baker A, Donaldson K. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages [J]. Part Fibre Toxicol, 2005, **2**: 11-24.
- [3] Derfus A M, Chan W C, Bhatia S N. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots [J]. Nano Lett, 2004, **4**: 11-18.
- [4] Wilson M R, Foucaud L, Barlow P G, et al. Nanoparticle interactions with zinc and iron: Implications for toxicology and inflammation [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2007, **225**: 80-89.
- [5] Limbach L K, Wick P, Manser P, et al. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress [J]. Environ Sci Technol 2007, **41**: 4158-4163.
- [6] Beck-Speier I, Dayal N, Karg E, et al. Oxidative stress and lipid mediators induced in alveolar macrophages by ultrafine particles [J]. Free Radic Biol Med 2005, **38**: 1080-1092.
- [7] Wilson M R, Lightbody J H, Donaldson K, et al. Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro* [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2002, **184**: 172-179.
- [8] Duffin R, Tran C L, Clouter A, et al. The importance of surface area and specific reactivity in the acute pulmonary inflammatory response to particles [J]. Ann Occup Hyg 2002, **46** (Suppl 1): 242-245.
- [9] Fernández-Argüelles M T, Jin W J, Costa-Fernández J M, et al. Surface-modified CdSe quantum dots for the sensitive and

- selective determination of $\text{Cu}(\text{II})$ in aqueous solutions by luminescent measurements [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, **549**: 20-25.
- [10] Singh-Rana S V. Metals and apoptosis: Recent developments [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2008, **22**: 262-284.
- [11] Mattie M D, McElwee M K, Freedman J H. Mechanism of copper-activated transcription: activation of AP-1, and the JNK/SAPK and p38 signal transduction pathways [J]. *J Mol Biol*, 2008, **38**: 1008-1018.
- [12] Pourahmad J, O'Brien P J. A Comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{2+} and Cd^{2+} [J]. *Toxicology* 2000, **143**: 263-273.
- [13] Britton R S. Metal-induced hepatotoxicity [J]. *Semin Liver Dis*, 1996, **16**: 3-12.
- [14] Luza S C, Speisky H C. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity [J]. *Am J Clin Nutr*, 1996, **63**: 812-820.
- [15] Bhawe S A, Pandit A N, Pradhan A M, *et al.* Liver disease in India [J]. *Arch Dis Child*, 1982, **57**: 922-928.
- [16] Rösner U. Effects of historical mining activities on surface water and groundwater—an example from northwest Arizona [J]. *Environ Geol*, 1998, **33**: 224-230.
- [17] Yang R S H, 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]. *Environ Health Perspect*, 2007, **115**: 1339-1343.
- [18] Jaiswal J K, Mattoussi H, Mauro J M, *et al.* Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 47-51.
- [19] Wu X, Liu H, Liu J, *et al.* Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, **21**: 41-46.
- [20] Zou L, Gu Z Y, Zhang N, *et al.* Ultrafast synthesis of highly luminescent green-to near infrared-emitting CdTe nanocrystals in aqueous phase [J]. *J Mater Chem* 2008, **18**: 2807-2815.
- [21] 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]. *Chem Biol*, 2005, **12**: 1227-1234.
- [22] Cho S J, Maysinger D, Jain M, *et al.* Long-term exposure to CdTe quantum dots causes functional impairments in live cells [J]. *Langmuir* 2007, **23**: 1974-1980.
- [23] Jin W J, Fernández-Argüelles M T, Costa-Fernández J M, *et al.* Photoactivated luminescent CdSe quantum dots as sensitive cyanide probes in aqueous solutions [J]. *Chem Commun*, 2005, doi:10.1039/b414858d 883-885.
- [24] Lovric J, Bazzi H S, Cuie Y, *et al.* Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots [J]. *J Mol Med*, 2005, **83**: 377-385.
- [25] Parak W J, Boudreau R, Legros M, *et al.* Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks [J]. *Adv Mater* 2002, **14**: 882-885.
- [26] Hanaki K, Momo A, Oku T, *et al.* Semiconductor quantum dot/albumin complex is a long-life and highly photostable endosome marker [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **302**: 496-501.
- [27] Chang E, Thekkekk N, Yu W W, *et al.* Evaluation of quantum dot cytotoxicity based on intracellular uptake [J]. *Small*, 2006, **2**: 1412-1417.
- [28] Liang J G, Huang S, Zeng D Y, *et al.* CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination [J]. *Talanta*, 2006, **69**: 126-130.