中国科学: 化学
SCIENTIA SINICA Chimica
chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS
评 述
环境化学与生态毒理学国家重点实验室专刊

基于荧光素酶报告基因的二噁英类生物检测法的发展与应用

马慧[1,2,3†], 宋博宇[4†], 张嵩岩[1,2†], 谢群慧[1,2], 徐丽[1,2], 曹征宇[3], 赵斌[1,2*]

1. 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085
2. 中国科学院大学, 北京 100049
3. 中国药科大学, 南京 211198
4. 环境保护部环境保护对外合作中心, 北京 100035
†同等贡献
*通讯作者, E-mail: binzhao@rcees.ac.cn

收稿日期: 2018-04-10; 接受日期: 2018-08-27; 网络版发表日期: 2018-09-27
国家自然科学基金(编号: 21525730、21527901)、中国科学院战略性先导项目(编号: XDB14030401)、环保部环保公益类项目(编号: 201309029)和全球环境基金“中国制浆造纸行业二噁英减排项目(ID:4441)” 资助

摘要 二噁英类生物检测法在大规模二噁英类筛查中具有重要的应用价值. 其中, 基于荧光素酶报告基因的二噁英类生物检测技术, 是依据二噁英类化合物通过结合芳香烃受体从而引发一系列毒理效应的生物过程而设计的, 具有灵敏度高、应用范围广、与毒理效应相关性强的特点. 最新研究进展表明, 该类技术可检测到的2,3,7,8-TCDD标准物质的最低浓度达到了0.1 pM, 可应用于农业、食品、环境等领域的多种样品中痕量二噁英类化合物的筛查, 在政府管理部门、第三方检测咨询机构及相关企业等方面具有广阔的应用和推广前景, 同时, 该方法在环境健康风险评估和相关基础研究中有更广阔的发展空间. 本文着重介绍了基于荧光素酶报告基因的二噁英类生物检测法——CALUX生物检测法的原理、发展进程、应用现状和标准化的方法体系并对CALUX法的优缺点进行总结及之后的发展进行展望.

关键词 二噁英, 芳香烃受体, 生物检测法, 荧光素酶报告基因(CALUX)

1 引言

多氯二苯并对二噁英(PCDDs)及多氯二苯并呋喃(PCDFs)通常统称为二噁英类化合物. 这类物质具有高脂溶性、化学稳定性、生物累积性, 可以进行远距离传输, 并具有明显的毒性效应, 是典型的持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs). 二噁英类化合物不仅广泛分布于土壤、水体、空气颗粒物等各种环境介质中, 还存在于各种动植物和人体当中. 由于二噁英类化合物的难降解特性及食物链的累积和放大效应, 这类化合物对人类健康的威胁是长期的[1]. 不仅如此, 这类化合物可以通过激活细胞内的芳香烃受体

引用格式: Ma H, Song B, Zhang S, Xie Q, Xu L, Cao Z, Zhao B. Development and application of luciferase reporter gene-based bioassay system for dioxin determination. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: doi: 10.1360/N032018-00091

© 2018 《中国科学》杂志社

(AhR), 调控下游基因转录, 引起细胞内一系列的毒性效应[2,3], 最终引发广泛的毒理与健康效应, 包括皮肤毒性[4]、免疫毒性[5]、生殖缺陷[6]、致畸性[7]、内分泌毒性[8]和致癌性[9,10]等. 因此, 针对二噁英类化合物的环境监测及环境健康研究受到了广泛的重视. 针对多种环境介质及生物样品的二噁英类化合物的检测技术与分析方法也由此得到了蓬勃发展.

二噁英类化合物的检测方法主要有两大类: 化学分析法和生物检测法. 其中高分辨气相色谱-高分辨质谱联用法(high resolution gas chromatography-High resolution mass spectrometry, HRGC/HRMS)的化学分析方法是二噁英类化合物分析的"金标准". 但是金标准方法的检测过程复杂, 检测成本高, 检测周期长, 在大规模二噁英类化合物筛查方面存在局限性[11]. 因此, 相对快速简便的二噁英类生物检测法得到发展和应用. 随着现代生物技术与二噁英毒理研究的不断发展, 自20世纪90年代至今, 研究人员开发了一系列二噁英类生物检测技术. 尹雪娇等[12]对两大类二噁英类生物检测法, 即免疫类分析方法及基于AhR信号通路的检测方法进行了综述. 其中, 基于二噁英抗体的酶联免疫测定法(ELISA)和基于AhR信号通路的荧光素酶报告基因法, 如荧光素酶报告基因法(the chemical-activated luciferase expression, CALUX), 已在实际应用过程中得到了长足的发展, 并在美国、日本和欧盟建立了相应的标准方法. 与ELISA法相比, 基于细胞的荧光素酶报告基因法灵敏度更高, 并可反映样品的毒性效应, 在二噁英痕量样品大规模筛查和健康风险评估中更具有优势.

最新完成的二噁英排放清单调查报告显示, 我国二噁英排放量在已公开二噁英排放数据的国家中位列第一, 且排放源数量多、分布广泛[13]. 作为二噁英排放大国和《斯德哥尔摩公约》缔约国, 我国大规模样品的二噁英类污染物筛查的需求日益增加. 因此, 二噁英类污染物的生物筛查法无论在技术研发还是环境管理的层面, 都已开始得到各方重视并取得了重要的进展, 一些具有自主知识产权的二噁英类生物检测方法和技术也应运而生. 鉴于荧光素酶报告基因法在二噁英类筛查和健康风险评估中的优势, 而关于此方面内容的文献综述报告较少, 本文将着重介绍不同荧光素酶报告基因法的技术原理和特点, 并对该类方法在多种样品二噁英类筛查及在环境健康研究方面的应用进行了总结, 其中也包括我国在该领域的最新进展.

2 基于荧光素酶报告基因的生物检测法的技术原理及特点

基于荧光素酶报告基因的生物检测法是利用二噁英类化合物通过作用于细胞内的AhR从而激活下游信号通路, 诱导细胞核内含有二噁英响应原件(DRE)启动子调控序列的报告基因表达的生物过程而设计的(图1). 二噁英类化合物将以一定的剂量依赖性方式诱导检测细胞中荧光素酶基因的表达, 即报告基因的表达量在一定的条件下与二噁英类化合物的含量呈现特定的对应关系, 从而通过检测报告基因可以实现对所暴露的二噁英类化合物的半定量[14~16]. 其核心技术是构建含有DRE的启动子调控序列的报告基因质粒和稳定转染该质粒并含有内源性AhR的细胞株. 检测质粒及细胞株的构建主要是通过基因重组和细胞基因工程改造来实现的. 而活化的AhR与重组启动子中DRE的结合并使其启动的能力是检测质粒乃至重组细胞株检测能力的决定因素之一.

基于荧光素酶报告基因的生物检测法(CALUX法)由美国加州大学Denison研究组于1996年首先提出. 他们选取了经典的AhR信号通路下游调控基因小鼠CYP1A1基因启动子上游富含DRE −1301~−819区域作为二噁英响应区段(dioxin responsive domain, DRD), 其中包含4个DRE, 将其插入小鼠乳腺癌病毒(MMTV)启动子中, 并将重组后的启动子DRE-MMTV基因序列整合到pGL2-basic质粒中, 构建了pGudluc1.1质粒, 再将pGudluc1.1质粒转染到小鼠肝癌细胞系(Hepa1c1c7)中, 最终得到了H1L1.1c2细胞株, 以此形成了第一代CALUX生物检测系统(G1)[17](图2). 与此同时, pGudluc1.1质粒也被转染到不同类型的宿主细胞, 如人永生化胶质细胞RHEK-1[18](表1). 当待测样品与细胞株共同孵育时, 其中的二噁英类化合物将进入细胞, 激活细胞内的AhR信号通路, 从而激活上游含DRD的报告基因的启动子, 诱导荧光素酶的转录表达. 利用一系列浓度的毒性最强的二噁英标准物质(2,3,7,8-TCDD)暴露所获得的荧光素酶报告基因检测值绘制标准曲线, 从而确定二噁英类物质的毒性当量与荧光素酶检测值之间的对应关系[27]. 在随后的几年时间中, Denison实验室不断完善报告基因质粒, 优化DRE插入序列

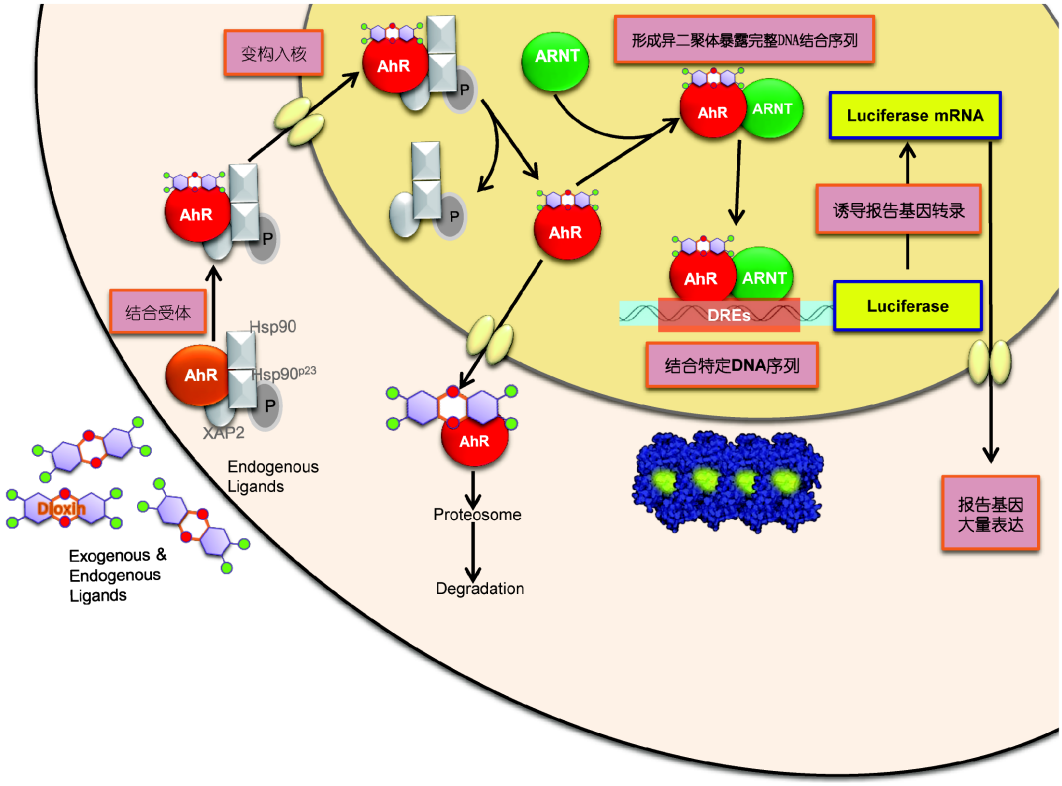


图 1 CALUX生物检测法原理(网络版彩图)
Figure 1 Principle of CALUX bioassay (color online).

以及启动子和载体的选择，并向不同宿主细胞内稳定转染改造质粒，相继发展了三代CALUX检测系统. 2004年，Han等[22]将DRD-MMTV基因序列重组到改良的荧光素酶报告基因载体pGL3-basic中，构建了pGudluc6.1质粒，再将其稳转到Hepa1c1c7中得到了G2检测系统. 两个重组细胞株G1与G2相比，检测灵敏度相当，检测2,3,7,8-TCDD标准物质的最低检出限均为1 pM. G1的特点是细胞株对二噁英类化合物的响应时间短，可以在4~6 h内进行检测，而G2细胞株的最佳相应时间为24 h. 因此G1细胞株更适用于二噁英类化合物的快速检测. 而G2细胞株选择了更新的报告基因载体，其优点是荧光素酶的表达不会受到细胞质内其他物质的影响，所以整个检测系统更加稳定，因此G2系统也得到了广泛应用与推广. 2004年, Besselink等[23]使用第二代质粒转染的大鼠肝癌细胞H4IIE作为检测系统(表1)，并将该系统命名为DR-CALUX. 为了进一步提高CALUX系统的稳定性、特异性和灵敏度，2011年，He等[20]筛选获得了更敏感的CALUX检测质粒pGudLuc7.5F，其中应用了5个DRD拷贝，并正向插入到MMTVΔ94启动子上游，报告基因载体仍为pGL3-basic (图2). 2015年，Brennan等[19]将该质粒稳定转染到小鼠肝癌细胞Hepa1c1c7中得到了第三代(G3)重组细胞株H1L7.5c3，其检测2,3,7,8-TCDD标准物质的最低检出限达到了0.1 pM，半最大效应浓度(EC_{50})为16 pM；同时他们也将该质粒转染到大鼠肝癌细胞系H4IIE中，得到的细胞株H4L7.5c2，其检测最低检出限与H1L7.5c3相当，EC_{50}略高于H1L7.5c3 (表1)，但在实际样品检测中，系统的背景值相对较低.

除了CALUX法以外，北海道大学Kojima实验室也发展了类似的荧光素酶报告基因检测方法. 2008年，Takeuchi等[24,25]通过优化DRE序列与启动子序列，构建了新型报告基因检测质粒pIND-DCDR7，其中使用了果蝇热休克蛋白启动子，DRE富集序列同样来自小鼠CYP1A1基因启动子上游的DRE富集区域，所插入的DRD由两部分组成，分别为−1334~−962与−1334~−844，前者DRD中包含3个DRE，后者包含4个DRE，

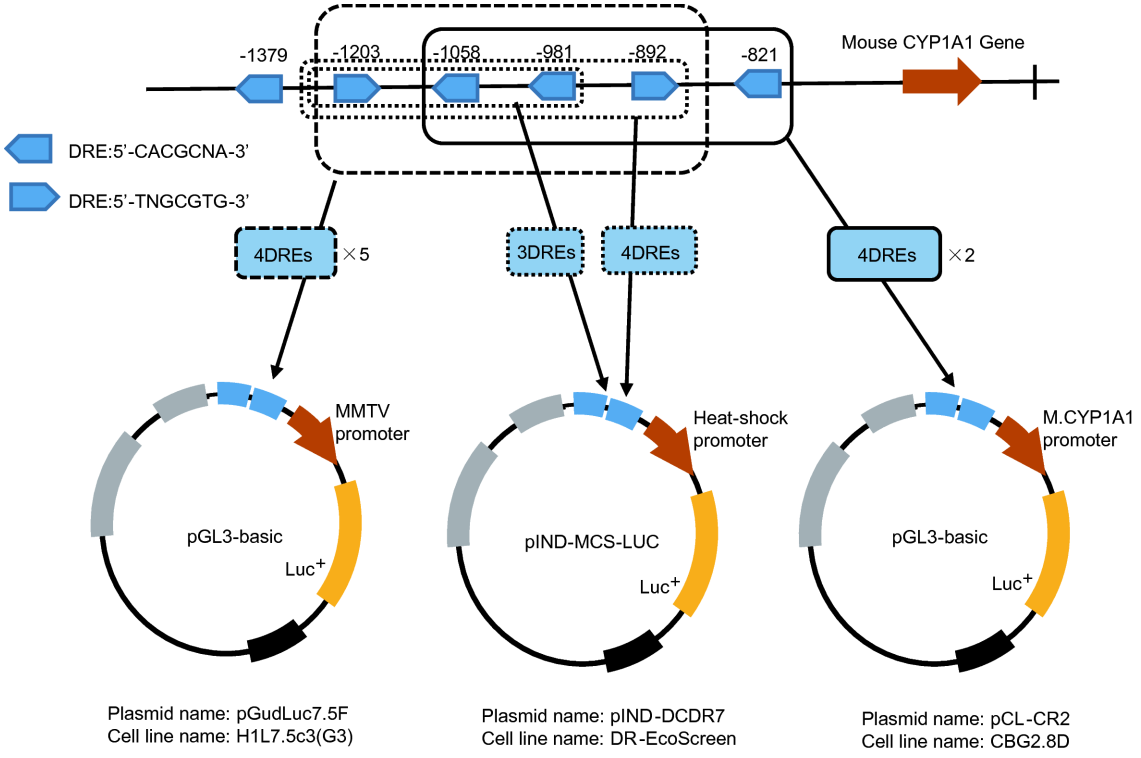


图 2 报告基因检测系统中质粒构建图的比较(网络版彩图)

Figure 2 Comparison of plasmid construction based on reporter gene systems (color online).

表 1 各种报告基因生物检测法中质粒与细胞株构建信息

Table 1 Construction information of plasmids and cell lines in various reporter gene bioassays

质粒类型	细胞	重组细胞系名称	DRE个数	启动子来源	EC_{50} (pM)	MDL (pM) [a)]	参考文献
pGudLuc7.5 (G3)	大鼠	H4L7.5c2	20	MMTV	43	0.1	[19]
	小鼠	H1L7.5c3	20	MMTV	16	0.1	[20]
	小鼠	H1L7.5c1	20	MMTV	6.9	0.1~1	[21]
pGudLuc6.1	小鼠	H1L6.1c2	4	MMTV	12~50	1	[22]
(G2)	大鼠	DRCALUX	4	MMTV	29	1	[23]
pGudLuc1.1	小鼠	H1L1.1c2	4	MMTV	70	1	[17]
(G1)	人类	HKY1.7	4	MMTV	200	10	[18]
pIND-DCDR7	小鼠	DR-EcoScreen	7	Heat-shock	2.8	0.1	[24,25]
pCL-CR2	小鼠	CBG2.8D	8	小鼠CPY1A1基因	14.9	0.1	[26]

a) MDL指最低检出限(minimal detection limit)

虽然最终插入序列的实际长度与CALUX系统的DRD有差别, 但是DRE来自相同的位置(图2). 他们将pIND-DCDR7检测质粒稳定转染到小鼠肝癌细胞中, 所获得的重组细胞株命名为DR-EcoScreen. 该系统对于2,3,7,8-TCDD标准物质的最低检出限可达0.1 pM, EC_{50}为2.8 pM.

相比于欧美国家和日本, 我国二噁英生物检测技术的研发起步较晚, 但也已形成了若干自主知识产权

的生物检测技术. 在荧光素酶报告基因二噁英生物检测技术方面, 已从引进国外现有的技术方法开展应用研究过渡到应用自主知识产权的技术方法开展应用研究的阶段. 2014年, Li等[28]对小鼠CPY1A1基因启动子上游富含DRE的区域进行了深入研究. 研究发现, 在小鼠CPY1A1启动子上游局域包含8个DRE序列, 这些DRE序列以及与序列左右两端不同长度的区域对下游基因转录调控能力各不相同, 其中位于−821处的DRE序列在人、大鼠、小鼠中都具有高度的保守性, 并且转录活性高于其他各处的DRE. 该DRE序列在美国和日本所研发的系统中并未使用. 在此基础上, 赵斌等[29]在2014年发明了新型高灵敏的检测质粒及相应的细胞株, 并于2016年获得授权. 该质粒有两个特点, 一是在插入DRE序列的选择方面, 检测质粒选择了小鼠CYP1A1基因上游−1099~−802作为DRD (包含4个DRE系列), 并将该DRD的双倍拷贝插入到pGL3-basic载体中构建了新型重组质粒pCR-CR2 (图2). 该质粒的另一个特点是在基础启动子的选择方面. CALUX法的检测质粒和pIND-DCDR7在这方面均使用了外源性的强启动子提高转录效率, 如CALUX法中使用的MMTV启动子. 而pGL-CR2质粒直接选择小鼠CPY1A1基因的启动子的部分序列作为重组质粒的基础启动子, 以提高筛查数据在毒性风险评估中的适用性. 将pGL-CR2质粒稳定转染到小鼠肝癌细胞系中, 得到重组细胞株命名为CBG2.8D, 该系统对2,3,7,8-TCDD标准物质的最低检出限能达到0.1 pM, EC_{50}约为15 pM, 最高浓度TCDD相对于对照组的激活效率可达100倍以上, 检测能力达到了其他荧光素酶报告基因二噁英类生物检测技术的水平, 也是目前国内授权的3项同类发明中灵敏度最高的技术. 2018年, Zhang等[26]详细报道了该系统的系统检测参数, 数据表明该系统对于标准物质的检测稳定性好, 响应范围为0.15~1000 pM.

3 基于荧光素酶报告基因的生物检测法的应用

基于报告基因的生物检测方法在多个国家和地区得到了很好的发展, 研究单位和政府部门将此类方法不仅应用到多种环境介质样品的二噁英含量的检测, 而且应用到其他类型的污染物如部分多环芳烃以及AhR激动剂的筛选等方面. 与此同时, 该方法在一些国家和地区也形成了一系列标准方法.

3.1 在环境样品检测中的应用

垃圾焚烧厂、化工厂、固体废物填埋区等是二噁英点源污染的重要发生地, 这类地区周围产生的废气、废水、废物中二噁英含量往往很高, 采集区域样品并经过合适的前处理后, 可以对荧光素酶报告基因检测细胞株进行染毒测试, 从而进行二噁英类的半定量检测. Zhou等[30]使用日本的DR-EcoSrceen对垃圾焚烧炉周围采集的78个废气样品进行二噁英检测, 并将生物检测结果与仪器分析结果进行对比, 结果显示使用DR-EcoSrceen检测得到的毒性当量与仪器分析法得到的数值之间有良好的相关性, 相关系数R^2达到0.98.

Behnisch等[31]应用以PCDD/Fs/多氯联苯检测为基础的化学分析方法和荧光素酶报告基因生物检测法, 评估了来自6个不同焚烧厂的不同煤粉样品中二噁英毒性物质的毒性, 结果表明, 生物检测法的毒性当量值与化学分析法所获得的国际毒性当量(I-TEQ)值相当; 另外, 许利等[32]对我国四川省内两个地区的固体废物焚化炉(MSWIs)周围的粉煤灰和土壤样本进行采样并使用CALUX法(G2)对样品中的二噁英类物质含量进行测定.

除了点源污染地环境样本的检测, 荧光素酶报告基因生物检测法在其他环境样品的筛查与鉴定, 包括低浓度二噁英样品, 也得到了很好的应用. Sciuto等[33]通过CALUX法对两种野生鱼类鲈鱼和斜齿鳊以及养殖物种虹鳟中的二噁英和二噁英类多氯联苯污染物进行了定量, 以此评估了意大利西北部的两个湖泊马焦雷湖和科莫湖以及附近地区的二噁英和二噁英类多氯联苯污染水平. Stronkhorst等[34]先用CALUX法筛查了荷兰沿海港口沉积物中二噁英类化合物, 再用HRGC/HRMS法测定了20种含有多氯联苯类化合物(PCBs)且具有CALUX活性的沉淀物, 最后将CALUX-TEQ值与HRGC/HRMS-TEQ值进行比较, 发现CALUX-TEQ具有更高的TEQ值, 且两种方法测得的TEQ值得到的线性关系R^2=0.48, 相关性小, 说明沉淀物种可能含有未识别的二噁英类化合物, 证明CALUX法可有效地补充标准二噁英类化合物分析; 在土壤样品检测方面, Lin等[35]曾使用G2方法对800个来自台湾的土壤样品中二噁英含量进行分析, 实现了使用生物检测法大批量

监察环境中二噁英含量的目标. Asari等[36]将CALUX法应用在废旧木材回收过程中的风险评估中，证实了在废物木材样品中存在POPs和无机有毒化合物，且垃圾粉尘中的二噁英类化合物表现出高浓度水平，表明拆除废物可能造成污染. Suzuki等[37]基于CALUX法和XDS-CALUX (异种生物检测系统-化学活化的萤光素酶表达)开发了一种分离检测废物和环境样品中溴化二噁英和氯化二噁英的方法，并将该方法用于筛选现场样品(烟气、粉煤灰、底灰、废水、表土、河流沉积物、工作场所室内空气和房屋灰尘). Vandermarken等[38]用CALUX法对比利时家用供暖系统的木灰样品进行了二噁英类活性分析，并将最终结果与关于使用肥料的法规和使用限制值进行比较，以评估木灰用于施肥的安全性；Wong等[39]应用该方法研究了5个国家收集的有机阻燃剂的浓度和尘埃中的类二噁英活性，分析了不同有机阻燃剂组浓度与类二噁英活性之间的相关性.

目前，最低检出限为0.1 pM的检测系统在环境介质中二噁英含量较低的大气样本中得到了广泛应用. Khedidji等[40]使用G3 CALUX检测系统对阿尔及利亚地区大气颗粒物PM_{10}中的二噁英进行定量，生物检测得到的数据(BEQs)与全球其他国际工业基地相似；Anezaki等[25]使用EcoScreen对大气样本中的PCDD/Fs和DL-PCBs进行定量，与仪器分析结果进行比较，结果显示，该系统可以很好地应用在大气样本中二噁英类化合物的检测方面. Zhang等[26]应用CBG2.8D系统对北京大气样品中二噁英含量也进行过检测，并与仪器分析法进行比较，结果显示，生物检测法得到的结果与仪器分析结果之间相关系数高达0.97. 这些应用实例都说明，该类方法适用于大气等样品痕量二噁英类的筛查.

3.2 在生物样品检测中的应用

人体内二噁英的摄入途径来自环境与食物两个方面，有效地监测食品中与人体内二噁英的含量对于人群健康风险评估意义重大. 将荧光素酶报告基因生物检测法应用于食品、人体样品的检测中，不仅可以实现对二噁英的定量，还可以评估样品中的活性物质对AhR的激活效率.

金一和等[41]应用CALUX法和高分辨气相色谱-高分辨质谱联用检测方法分别测定了4例母乳、21例血液和21例脂肪样品的二噁英毒性当量，发现这两种方法的检测结果具有良好的相关性，说明CALUX法适用于血样、脂肪组织和乳汁在内的二噁英类污染物测定；Sciuto等[42]也用CALUX法和传统的HRGC/HRMS法分别检测了从西米谷市获得的13个原料奶样品，以及从皮埃蒙特地区当地市场获得的30个奶样品，发现两种方法具有很好的相关性，说明CALUX方法可以作为监测牛奶中二噁英的筛选工具；Pauwels等[43]用气相色谱和电子捕获检测的化学分析法对在比利时生殖医学中心收集的来自不孕妇女的共106份血清和9份卵泡液样品中的多氯联苯(PCB)同系物进行了定量，之后用CALUX法测定血清和卵泡液的总毒性当量，发现两种方法所获得的总毒性当量具有很好的相关性；Nelson等[44]用CALUX法对各个人群的母乳进行了流行病调查，发现随着母亲年龄的增加，母乳中二噁英含量也会增加，而且沿海地区人群母乳中二噁英浓度要高于内陆. Dorneles等[45]用CALUX法分析了28个圭亚那海豚的肝脏样品，用于评估巴西各个海口的二噁英类化合物含量，发现其高生物分析当量(BEQ)浓度范围为1.94~15.6 pg BEQ/g脂肪. Pizzochero等[46]也用CALUX法对巴西里约热内卢州的白口鱼类中二噁英类化合物水平进行了检测. van Overmeire等[47]用CALUX法对牛奶样品中多氯二苯并对二噁英(PCDD)/F TEQ测定的方法进行了验证，决定限额达到4.53 pg TEQ/g脂肪，与3 pg TEQ/g脂肪的最高限值没有显著差异；Hoogenboom等[48]用CALUX法对面包、动物脂肪、动物饲料中的二噁英进行了筛查. Gizzi等[16]应用CALUX法对鱼油和饲料中的二噁英和类二噁英PCB(DL-PCBs)进行了检测. Tsutsumi等[49]用CALUX测定法筛查了零售鱼类中的PCDD/Fs和DL-PCBs，研究发现，CALUX分析与化学分析金标准方法之间有很强的相关性，用于测定PCDD/Fs的相关系数R^2为0.89，测定DL-PCBs的相关系数R^2为0.91. Laier等[50]对16个丹麦人乳样品中的总二噁英类化合物活性进行了测定，其浓度范围为20.5~55.8 pg TEQ/g脂肪，总体略高于仪器分析获得的TEQ值(14.8~43.6 pg TEQ/g脂肪).

3.3 方法的标准化及应用

日本环境省于2003年5月召开了二噁英简易测定法探讨会，以二噁英生物检测法为核心开始对二噁英简易测定法进行了验证和技术评价. 2004年5月，日本

环境省二噁英简易测定法探讨会公布了关于简易测定法的技术评价报告, 并明确指出用简易测定法对废物焚烧炉排放的烟气、飞灰和炉渣进行测定是适宜的. 与此同时, 环境省明确了国家不仅要推进简易测定法的技术开发, 而且要促进其成果的采用和普及的方针. 同年7月, 日本国土交通省于2004年7月首次公布了"河流、湖泊底泥中的二噁英简易测定法(草案)", 从而第一次把简易测定法(GC/LRMS)和二噁英生物检测法两种方法定为标准方法, 随后将CALUX法认定为用于对废气、灰渣中二噁英类化合物检测的国家标准(No. 92-1-1).

欧盟于2006年规定了食品中二噁英类7月1日开始实施的《食品、饲料的二噁英类标准》, 于2002年7月26日颁布的EC指令(2002/69/EC)中规定, 把二噁英生物检测法作为筛选方法来使用. 此处的筛选方法是指利用细胞的二噁英生物检测法(cell-based bioassay)和利用试剂盒的二噁英生物检测法(kit-based bioassay). 2007年, 美国国家环境保护局于EPA发布了EPA Method 4435, 报告中将CALUX G2报告基因法指定为土壤/底泥/生物组织和水中二噁英的检测法.

我国自加入斯德哥尔摩公约以来, 针对二噁英的排放监测工作不断加强, 2007年国务院批准的《中华人民共和国履行关于持久性有机污染物的斯德哥尔摩公约国家实施计划》中明确提出发展二噁英生物检测技术, 制订二噁英生物检测国家标准. 原环保部科技标准司在2013年启动了环保公益行业专项"超高灵敏二噁英类生物检测方法的开发与应用"项目的研究工作, 由中国科学院生态环境研究中心、中国环境监测总站、中日友好环境保护中心等单位联合承担. 在该项目的基础上, 建立了我国自主知识产权的荧光素酶报告基因生物检测系统, 开展了焚烧飞灰及土壤样品的二噁英类筛查的应用研究, 并提出了基于报告基因的二噁英类生物检测标准方法的建议稿. 同时, 国家环境保护标准"固体废物二噁英类的筛查报告基因法"正在公开征集意见.

3.4 在环境与健康评估方面的应用

报告基因生物检测法的原理是基于AhR信号通路设计的, AhR与二噁英类化合物结合之后通过调控转录因子, 介导下游基因转录. AhR参与调节细胞色素P-450酶家族成员和与许多关键的生理过程有关的其他基因的表达, 如细胞周期和增殖以及免疫反应[3,51,52]. 除二噁英外, AhR还可以感知、响应和防御其他持久性有毒物污染物, 如DL-PCBs和与二噁英结构相似的多环芳烃(如苯并芘、荧蒽). 据报道, 空气中的PAHs可能导致呼吸系统和心血管疾病[53,54]. 因此, 关注样品中其他类型的芳香烃类污染物(多环芳烃PAHs)对于全面评价样品的毒性效应非常重要. Zhang等[26]近期发表的关于CBG2.8D检测系统应用于大气样品二噁英类筛查的研究中, 应用该系统评价了AhR的激活效率, 从而评估了大气样品中AhR活性物质的总的毒性效应, 并应用样品总AhR激活效率(total AhR activation, TAA)的概念, 对不同二噁英类污染物在其中的贡献进行了探讨. 他们发现, 大气颗粒物中PAHs的含量占有很大比重, 其毒性当量与大气样品的TAA之间存在相关性, 相关系数达到0.9. Pieterse等[21]基于CALUX的原理改进了一种PAH-CALUX报告细胞系, 专门用于类二噁英的PAHs的筛选, 尤其是致癌性的PAHs.

此外, 报告基因检测法也可用于环境健康效应的评估, 通过对人体样本中AhR的激活效应的检测, 评估了人体内源性代谢产物与疾病发生发展的关系. 例如, 在慢性肾病(CDK)的研究中, 病人体内蓄积的尿毒素硫酸吲哚酚是一种色氨酸代谢物, 同时也是AhR的激动剂. Dou等[55]用CALUX系统(G3)测定了CKD患者和CKD小鼠模型血清中AhR的激活率, 提出了AhR活化能(AhR-activation potency, AhR-AP)的概念, 并作为评价指标, 与一系列病理指标进行了相关性研究. 通过与健康对照血清相比发现, CKD患者血清显示出强烈的AhR-AP, 且AhR-AP与肾小球清除率和吲哚酚硫酸盐浓度密切相关. 此项应用也预示报告基因检测法可以作为一些疾病进展的评价手段.

4 总结与展望

本文总结了基于荧光素酶报告基因的二噁英生物检测法的设计原理、发展进程以及应用情况. 报告基因生物检测法以其高通量、低成本、灵敏快捷等特点逐渐成为二噁英类污染物检测筛查的有效手段. 该方法已被应用于多种介质中二噁英类化合物的检测. 将报告基因生物检测法与仪器分析法结合使用, 两者能够互相补充, 以生物检测作为初筛, 为仪器分析法提供更加有效特异的筛选数据, 提高检测效率, 降低成

本消耗.

报告基因生物检测法的设计原理与细胞毒性通路之间有着密切联系, 保证了该方法在污染物毒性与环境健康风险评估中的明显优势. 目前最新构建的几种高灵敏报告基因检测系统的最低检出限均可达到0.1 pM, 在痕量二噁英样品的检测与筛查中显示了很好的应用前景, 已在多种环境及食品样品中实现了广泛应用. 该方法特有的高通量、低成本等优势, 适用于大规模环境介质的监测监管、农业领域的二噁英筛查、食品生产企业的过程预警及质量监控. 此外, 该方法在环境和健康评估方面有潜在的应用价值. 目前, 该方法在生物样本检测中的应用数据还比较少, 在未来的实践当中, 应不断扩充在生物样本中的应用数据, 为污染物毒性效应评估和环境健康风险评估提供更多有价值的参考数据. 与欧美发达国家相比, 我国的二噁英报告基因检测法起步较晚, 各种介质中二噁英生物检测数据积累相对较少, 今后还需不断扩大检测系统的应用研究范围.

参考文献

1 Weber R, Gaus C, Tysklind M, Johnston P, Forter M, Hollert H, Heinisch E, Holoubek I, Lloyd-Smith M, Masunaga S, Moccarelli P, Santillo D, Seike N, Symons R, Torres JPM, Verta M, Varbelow G, Vijgen J, Watson A, Costner P, Woelz J, Wycisk P, Zennegg M. *Environ Sci Pollut Res*, 2008, 15: 363–393

2 Denison MS, Nagy SR. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2003, 43: 309–334

3 Puga A, Ma C, Marlowe JL. *Biochem Pharmacol*, 2009, 77: 713–722

4 Bock KW, Köhle C. *Biol Chem*, 2009, 390: 1225–1253

5 Harper N, Connor K, Safe S. *Toxicology*, 1993, 80: 217–227

6 Chaffin CL, Peterson RE, Hutz RJ. *Biol Reprod*, 1996, 55: 62–67

7 McNulty WP. *Am J Primatol*, 1984, 6: 41–47

8 Sobolewski M, Conrad K, Allen JL, Weston H, Martin K, Lawrence BP, Cory-Slechta DA. *Neurotoxicology*, 2014, 45: 121–130

9 Stinchcombe S, Buchmann A, Bock KW, Schwarz M. *Carcinogenesis*, 1995, 16: 1271–1275

10 Kennedy GD, Nukaya M, Moran SM, Glover E, Weinberg S, Balbo S, Hecht SS, Pitot HC, Drinkwater NR, Bradfield CA. *Toxicol Sci*, 2014, 140: 135–143

11 Schmidt JV, Bradfield CA. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12: 55–89

12 Yin XJ, Zhou ZG, Xie QH, Xu T, Li SZ, Xu L, Zhao B. *Environ Chem*, 2014, 1: 1700–1709 (in Chinese) [尹雪娇, 周志广, 谢群慧, 徐团, 李帅章, 徐丽, 赵斌. 环境化学, 2014, 1: 1700–1709]

13 Zheng MH, Sun YZ, Liu WB. *Study on Dioxin-like POPs Emission Inventory in China*. Beijing: China Environmental Science Press, 2008 (in Chinese) [郑明辉, 孙阳昭, 刘文彬. 中国二噁英类持久性有机污染物排放清单研究. 北京: 中国环境科学出版社, 2008]

14 Postlind H, Vu TP, Tukey RH, Quattrochi LC. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 118: 255–262

15 Aarts JMMJG, Denison M S, de Haan LHJ, Schalk JAC, Cox MA, Brouwer A. *Organohalogen Compd*, 1993, 13: 361–364

16 Gizzi G, Hoogenboom LAP, Von Holst C, Rose M, Anklam E. *Food Addit Contam*, 2005, 22: 472–481

17 Garrison P. *Fund Appl Toxicol*, 1996, 30: 194–203

18 Yang JH, Lee HG, Park KY. *Chemosphere*, 2008, 72: 1188–1192

19 Brennan JC, He G, Tsutsumi T, Zhao J, Wirth E, Fulton MH, Denison MS. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 11903–11912

20 He G, Tsutsumi T, Zhao B, Baston DS, Zhao J, Heath-Pagliuso S, Denison MS. *Toxicol Sci*, 2011, 123: 511–522

21 Pieterse B, Felzel E, Winter R, van der Burg B, Brouwer A. *Environ Sci Technol*, 2013, 47: 11651–11659

22 Han D, Nagy SR, Denison MS. *Biofactors*, 2004, 20: 11–22

23 Besselink HT, Schipper C, Klamer H, Leonards P, Verhaar H, Felzel E, Murk AJ, Thain J, Hosoe K, Schoeters G, Legler J, Brouwer B. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23: 2781–2789

24 Takeuchi S, Iida M, Yabushita H, Matsuda T, Kojima H. *Chemosphere*, 2008, 74: 155–165

25 Anezaki K, Yamaguchi K, Takeuchi S, Iida M, Jin K, Kojima H. *Environ Sci Technol*, 2009, 43: 7478–7483

26 Zhang S, Li S, Zhou Z, Fu H, Xu L, Xie HQ, Zhao B. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 2926–2933

27 Elfouly MH, Richter C, Giesy JP, Denison MS. *Environ Toxicol Chem*, 1994, 13: 1581-1588

28 Li S, Pei X, Zhang W, Xie HQ, Zhao B. *Int J Mol Sci*, 2014, 15: 6475–6487

29 Zhao B, Li SZ, Xie QH, Pei XH, Zhou ZG. China Patent, 201410100654.1, 2016-08-08 [赵斌, 李帅章, 谢群慧, 裴新辉, 周志广. 中国专利, 201410100654.1, 2016-08-08]

30 Zhou Z, Zhao B, Kojima H, Takeuchi S, Takagi Y, Tateishi N, Iida M, Shiozaki T, Xu P, Qi L, Ren Y, Li N, Zheng S, Zhao H, Fan S, Zhang T, Liu A, Huang Y. *Chemosphere*, 2014, 102: 24–30

31 Behnisch PA, Hosoe K, Shiozaki K, Ozaki H, Nakamura K, Sakai SI. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 5211–5217

32 Xu L, Zhang SY, Wang W, Tian QH, Zhang Y, Liu Y. *Sichuan Environ*, 2016, 35: 7–12 (in Chinese) [许利, 张嵩岩, 王维, 田庆华, 张悦, 刘彦. 四川环境, 2016, 35: 7–12]

33 Sciuto S, Prearo M, Desiato R, Bulfon C, Burioli EAV, Esposito G, Guglielmetti C, Dell'atti L, Ru G, Volpatti D, Acutis PL, Martucci F. *J Food Prot*, 2018, 81: 842–847

34 Stronkhorst J, Leonards P, Murk AJ. *Environ Toxicol Chem*, 2002, 21: 2552–2561

35 Lin DY, Lee YP, Li CP, Chi KH, Liang BWP, Liu WY, Wang CC, Lin S, Chen TC, Yeh KJC, Hsu PC, Hsu YC, Chao HR, Tsou TC. *Int J Environ Res Public Health*, 2014, 11: 4886–4904

36 Asari M, Takatsuki H, Yamazaki M, Azuma T, Takigami H, Sakai SI. *Environ Int*, 2004, 30: 639–649

37 Suzuki G, Nakamura M, Michinaka C, Tue NM, Handa H, Takigami H. *Anal Chim Acta*, 2017, 984: 232–235

38 Vandermarken IB, Langenhove KV, Goeyens L, Denison MS. *In vitro* reporter gene activity of PCDD/Fs and dl-PCBs in wood ash from domestic heating systems (Belgium) using the H1L7.5c1 CALUX Bioassay. In: 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Florence, 2016

39 Wong F, Suzuki G, Michinaka C, Yuan B, Takigami H, de Wit CA. *Chemosphere*, 2017, 168: 1248–1256

40 Khedidji S, Croes K, Yassaa N, Ladji R, Denison MS, Baeyens W, Elskens M. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24: 11868–11877

41 金一和, 秦慧池, 唐慧君, Kayama F, Hamamatsu A, Sagisaka K, Brown D, Clark G, Nakamura M. CALUX生物学二噁英检测方法在环境流行病学调查中的应用价值. In: 新世纪预防医学面临的挑战——中华预防医学会首届学术年会论文摘要集. 济南, 中国, 2002

42 Sciuto S, Martucci F, Desiato R, Mazza M, Guglielmetti C, Dell'atti L, Ubaldi A, Ru G, Acutis PL, Caramelli M. *Large Anim Rev*, 2013, 19: 107–114

43 Pauwels A, Cenijn PH, Schepens PJC, Brouwer A. *Environ Health Perspect*, 2000, 108: 553–557

44 Nelson EAS, Hui LL, Wong TW, Hedley AJ. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 1432–1438

45 Dorneles PR, Lailson-Brito J, Bisi TL, Domit C, Barbosa LA, Meirelles ACO, Carvalho VL, Malm O, Azevedo AF, Brose F, Das K, Scippo ML. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2016, 71: 336–346

46 Pizzochero AC, Dorneles P, Brose F, Malm O, Das K. DR-CALUX® Bioassay response to screen PCDDs, PCDFs, and dioxin-like PCBs in whitemouth croakers (Micropogonias furnieri) from Rio de Janeiro state, Brazil. In: 36th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants. Florence, 2016

47 van Overmeire I, Van Loco J, Roos P, Carbonnelle S, Goeyens L. *Talanta*, 2004, 63: 1241–1247

48 Hoogenboom R, Bovee T, Portier L, Bor G, van der Weg G, Onstenk C, Traag W. *Talanta*, 2004, 63: 1249–1253

49 Tsutsumi T, Amakura Y, Nakamura M, Brown DJ, Clark GC, Sasaki K, Toyoda M, Maitani T. *Analyst*, 2003, 128: 486–492

50 Laier P, Cederberg T, Larsen JC, Vinggaard AM. *Food Addit Contam*, 2003, 20: 583–595

51 Hamouchene H, Arlt VM, Giddings I, Phillips DH. *BMC Genomics*, 2011, 12: 333

52 Hao N, Whitelaw ML. *Biochem Pharmacol*, 2013, 86: 561–570

53 Pape F, Stahlmann R. *Med Monatsschr Pharm*, 2007, 30: 206–212

54 Baccarelli A, Mocarelli P, Patterson DG, Bonzini M, Pesatori AC, Caporaso N, Landi MT. *Environ Health Perspect*, 2002, 110: 1169–1173

55 Dou L, Poitevin S, Sallée M, Addi T, Gondouin B, McKay N, Denison MS, Jourde-Chiche N, Duval-Sabatier A, Cerini C, Brunet P, Dignat-George F, Burtey S. *Kidney Int*, 2018, 93: 986–999

Development and application of luciferase reporter gene-based bioassay system for dioxin determination

Hui Ma[1,2,3†], Boyu Song[4†], Songyan Zhang[1,2†], Qunhui Xie[1,2], Li Xu[1,2], Zhengyu Cao[3], Bin Zhao[1,2*]

[1] *State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China*
[2] *University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China*
[3] *China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China*
[4] *Foreign Economic Cooperation Office, Ministry of Envionmental Protection, Beijing 100035*
†*These authors contributed equally to this work.*
**Corresponding author (Email: binzhao@rcees.ac.cn)*

Abstract: Bioassay systems have been widely applied in large-scale screening of dioxins. Among these systems, the luciferase reporter gene-based bioassay system is designed based on aryl hydrocarbon receptor signaling pathway which mediates a series of toxicological effects of dioxins. The advantages of this bioassay system include high sensitivity, wide application and strong correlation with toxicological effects. Based on recent research on several newly developed systems, the minimum detection limit of such analytical method can reach 0.1 pM. This system could be widely used in agricultural, food, environmental, government administration and the third party inspection agency. Furthermore, a broad application prospect of this bioassay system has been proposed recently in environmental health study and health risk assessment. This review describes the development, application, standardized methods and mechanism of CALUX assay, as well as the future perspective.

Keywords: dioxin, aromatic hydrocarbon receptor, bioassay, lchemical-activated luciferase expression (CALUX)

doi: 10.1360/N032018-00091