

环境内分泌干扰物快速筛选方法研究进展

康亦珂, 汝少国, 王 蔚

中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003

摘要 为了减少和避免自然界中日益增多的环境内分泌干扰物对生物体及人类的危害, 建立方便、有效、快捷的筛选方法, 以从环境污染物中检测出具有潜在的干扰内分泌系统的化学物质等已成为环境科学的热点研究方向。本文从 4 个研究层面分类综述了近年来环境内分泌干扰物快速筛选方法的研究进展, 分析了各类筛选方法的优缺点, 展望了其发展前景。

关键词 环境内分泌干扰物; 快速筛选; 生物筛选法

中图分类号 X171.5

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)12-0099-05

Progress in the Rapid Screening of Endocrine Disrupting Chemicals

KANG Yike, RU Shaoguo, WANG Wei

College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Abstract Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) are exogenous substances that act like hormones in the endocrine system and disrupt the physiologic functions of endogenous hormones. They are sometimes also referred to as endocrine disruptors, or hormonally active agents. EDCs encompass a variety of chemical classes, including hormones, plant constituents, pesticides, compounds used in the plastics industry and in consumer products, and other industrial by-products and pollutants. With the industrial development, more and more EDCs are pervaded and widely dispersed in the environment, and the exposure to EDCs poses ever greater threat. Therefore, it becomes a top priority to reduce or avoid the increasing exposure of organisms or even human beings to EDCs. In the research field of environmental sciences, the establishment of a most convenient, efficient and effective screening method to detect chemicals with the potential to interfere with the endocrine hormone levels from pollutants is a hot project. This paper reviews the recent progress on rapid methods for detecting EDCs in the environment, and these mature rapid screening methods are grouped into four categories. Advantages and disadvantages in theory and practice of these methods are analyzed. The development prospects and strategy are also discussed.

Keywords endocrine disrupting chemicals; rapid screening; biological screening

0 引言

环境内分泌干扰物 (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs) 是一类广泛存在于环境、食物以及消费品中的可以对生物体内激素水平产生影响的物质^[1-2]。近年来, 随着经济的发展和工业化程度的提高, EDCs 在自然界中的分布、含量及暴露途径也随之变广、增多^[3-5]。如何快速有效地筛选和检测出具有潜在的干扰内分泌系统的化学物质已成为生态毒理

学、环境科学等研究领域的当务之急^[4]。

目前, 已建立的较成熟的环境内分泌干扰物的快速筛选和检测方法主要有: 细胞培养检测法、子宫增重检测法、重组酵母系统检测法、免疫检测法和生物传感器检测法等^[6], 可以归为 4 大类研究方法: 模型动物筛选法、组织器官筛选法、细胞筛选法和分子筛选法。本文综述了国内外应用较广泛的环境内分泌干扰物生物快速筛选方法及其应用进展。

收稿日期: 2010-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671618)

作者简介: 康亦珂, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, 电子信箱: shmzly@yahoo.com.cn; 汝少国 (通信作者), 教授, 研究方向为污染生态学, 电子信箱: rusg@ouc.edu.cn

1 模型动物筛选法

1.1 大鼠子宫增重法

大鼠子宫增重法(The Rodent Uterotrophic Assay)选用未成熟的雌幼鼠或摘除卵巢的雌成鼠为研究对象,以口服或皮下注射的方式,将实验动物连续 3~4d 暴露于待测化学物质^[7-8],然后剥离受试对象的子宫并测定对照组与实验组子宫的脂肪、干重或湿重与体重的比值^[9],进而评价待测化学物质是否具有促进子宫生长的作用,判断其是否具有雌激素效应。

大鼠子宫增重法步骤固定,筛选程序简单,是最为成熟的筛选检测环境雌激素的体内实验方法之一^[10-11],可以方便地检测出壬基酚、双酚 A、甲氧滴滴涕、染料木黄酮、雌二醇、己烯雌酚、乙炔雌二醇等 7 种内分泌干扰物的混合物的性质^[12]。在动物模型和暴露途径的选择上,对未成熟的雌幼鼠进行皮下暴露待测物是最敏感的实验方法^[7],比采用摘除卵巢的雌成鼠口服暴露的检出限低,可用于检测小剂量(100mg/(kg·d))的弱雌激素活性的 p-壬基酚。

随着实际应用的进展,Markey 等^[8]观察到子宫内膜上皮细胞的厚度和阴道开口(Vaginal Opening,VO)等指标比子宫湿重更为敏感,因此建议在传统子宫增重试验的基础上增设其他敏感的指标。同时,试验中所得的血液及其他器官,也可以被合理利用于检测急性暴露对生殖轴线上其他内分泌腺体的作用,或者作为其他检测内分泌干扰物的离体方法的实验对象。

1.2 水生生物形态学变化观察法

除了选用哺乳动物为模型生物,食蚊鱼(*Gambusia affinis holbrooki*)形态特征的改变也可用于筛选具有雌激素活性^[13]及雄激素活性^[14]的化学物质的指标。甲壳类动物 *Mollusk genitalia* 也被用于污水中 EDCs 的检测,且其形态改变指标的敏感性要较食蚊鱼更优^[15]。相对而言,形态学指标能更直接表征污染物对生物体的影响,然而不如细胞或分子水平上的指标精确度高。

2 组织器官筛选法

组织器官筛选法主要有雌激素受体结合法(Competitive Estrogen Receptor Binding Assays)。具有雌激素效应的内分泌干扰物可以在特定器官内(如肝脏)与雌激素受体结合,启动信号传导途径,诱导产生细胞应答^[16],并最终表现为卵黄原蛋白(Vitellogenin,VTG,产卵动物所特有的生物标志物)等终端产物的生成。利用这一性质,既可以通过测量受体结合力^[17],又可以通过检测终端产物的产量^[16,18],较为灵敏地检测出待测物对生物体造成的内分泌干扰影响。

美国环境保护局(The Environmental Protection Agency, EPA)已经将雌激素受体结合法广泛应用于环境内分泌干扰物的前期快速筛选(High Throughput Pre-screening,HTPS)步骤中^[19]。EPA 选取了几种不同的人乳腺癌细胞系,构建了可以产生雌激素受体的 T47D 细胞系、可以产生雄激素受体的

MDA453 细胞系和可以产生甲状腺激素受体的 HeLa 细胞系,以它们产生的反应受体应用于快速筛选^[20],可进行大量样品的初步检测,省时省力。这种筛选方法不仅简单易行,还有一个其他方法所不具备的突出优点:由于受体应答反应的差异,可以有效区分开激素激动剂和激素拮抗剂^[4]。

3 细胞筛选法

3.1 细胞培养检测法

除了能够通过特定器官内的细胞应答诱导生成生物标志物以外,具有雌激素效应的内分泌干扰物还可以对含有雌激素受体^[21-22]的人乳腺癌细胞系产生细胞应答^[18]。其中,应用最广泛的即为 MCF-7 细胞增殖实验(MCF-7 cell proliferation bioassay),在低浓度(2.5%)下也能接收到雌二醇(E₂)、活性炭/葡聚糖处理胎牛血清(CDFBS)、活性炭/葡聚糖处理的女性血清(CDFHS)等物质的类/抗雌激素刺激信号并大量生长增殖^[23-24]。Soto 等^[25]利用 MCF-7 细胞的这个性质,设计了 E-SCREEN 实验,该实验被应用到处理后污水中烷基酚、邻苯二甲酸盐、多氯联苯及多种杀虫剂等类雌激素的含量检测^[17],检出限可低至 pg/L 数量级^[25]。Rasmussen 和 Nielsen^[26]又对 E-SCREEN 实验进行了优化,对 MCF-7 细胞的生长条件、初始密度、培养基以及内分泌干扰物质的助溶剂等一系列参数进行了规范和界定,使暴露后的 MCF-7 细胞的增殖量由原来的 2~10 倍不等提高到 11 倍,同时还提出了通过细胞计数方法或 MTT 荧光染色法测定相对增殖力的改良方案。

3.2 酵母雌激素筛选测试法

Routledge 和 Sumpter^[27]使用基因重组技术,在酵母细胞中构建了可以表达人雌激素受体的酵母表达载体和由雌激素效应元件(Estrogen Response Elements,ERE)控制的 *Lac-Z* 的酵母报告载体,建立了重组酵母筛选系统(Recombinant Yeast Cell Bioassay,RCBA)^[27]。将转基因酵母作为生物模型,利用受体-配体之间的相互作用进行内分泌干扰物的检测。人雌激素受体基因被整合于酵母基因组中并成功表达:①与类雌激素相互作用形成融合蛋白,可与报告载体上的 ERE 相结合;②受体(ERE)激活;③与配体(融合蛋白)相结合,引导报告基因 *Lac-Z* 表达;④使产生 β -半乳糖苷酶,并分泌到培养基中;⑤分解显色底物氯酚红- β -D-半乳糖苷(CPRG),使其由黄色变为红色;⑥可用比色法检测酶活性^[27]。Sumpter 等^[28]1997 年使用重组酵母筛选系统对环境污染物邻苯二甲酸盐和壬基酚进行了雌激素活性检测,该方法操作简便、耗时短、灵敏度极高,一般比 MCF-7 细胞增殖实验和子宫增重方法高出 2~5 个数量级^[29-30]。然而,一些由 MCF-7 细胞增殖实验判断为具有弱雌激素活性的化学物质,如儿茶酚、表儿茶酚、毛地黄黄酮等,在重组酵母系统的检测中没有表现出任何雌激素活性;相反,杨梅酮和橙皮素等在重组酵母筛选中有微弱的雌激素活性的化合物,对 MCF-7 细胞系没有任何增殖促进作用^[31]。此外,与子宫增重试验相比,重组酵

母筛选系统也并未能够成功检测出壬基酚的二胺衍生物 (NPB) 的雌激素活性^[30]。不同筛选方法所得到的筛选结果并不相符可能是由于酵母细胞和哺乳动物细胞中生物代谢途径不同而造成的^[31], 因此, 在方法应用中, 应根据实际目的和暴露浓度等的不同选择合适的检测手段。

根据重组酵母筛选系统的原理, Bovee 等^[32]选用绿色荧光蛋白 (yeast Enhanced Green Fluorescence Protein, yEGFP) 作为报告蛋白, 且将其基因序列整合在了酵母基因组质粒上。相比于以前使用 *Lac-Z* 作为报告基因的两质粒重组酵母细胞, 得到了较大的简化, 获得了高通量筛选雌激素活性化学物质的重组绿色荧光蛋白酵母雌激素筛选体系, 它为今后重组酵母筛选方法的发展指明了方向, 可根据不同需要构建不同的表达载体和报告载体, 甚至进一步应用在整体水平的活体筛选上。如可选择鱼类或线虫的卵黄原蛋白等生物标志物的基因构建表达载体, 通过基因重组得到转基因动物进行 EDCs 的筛选。

4 分子筛选法

4.1 免疫检测法

环境内分泌干扰物的免疫检测筛选方法 (Immunoassays) 的基本原理是生物分子 (受体) 与相应的特异性抗体 (单克隆抗体或多克隆抗体) 结合, 然后采用同位素、酶、荧光或化学发光底物等标记技术加以放大和显示, 根据生物分子被诱导产生的水平判断化学物质是否具有内分泌干扰特性^[33]。免疫检测方法主要包括放射免疫分析法 (Radioimmunoassay, RIA)、酶免疫测定法 (Enzyme Immunoassay, EIA)、荧光免疫分析法 (Fluoroimmunoassay, FIA)、时间分辨荧光免疫分析法 (Time-resolved Fluoroimmunoassay, TrFIA) 和化学发光免疫测定法 (Chemiluminescent Immunoassay, CLIA), 其中以 EIA 和 RIA 最为常用^[33-34]。

在各种免疫检测法中, 依据生物应答的机制和途径 (无论是分子、细胞还是生理水平上), 选取方便高效的生物标志物是方法构建成败的关键^[35]。卵黄原蛋白是应用最早也是最为广泛的筛选类雌激素化合物的生物标志物^[36-37], 其中卵黄原蛋白的酶联免疫吸附方法最为简便, 检出限可达 2~6 ng/mL^[38-39]。卵黄原蛋白侧流免疫法和单向放射免疫法的检出限较高, 分别为 80 μ g/mL^[40]和 12.5 mg/mL^[39]; 顺序注射化学发光法耗时短、敏感度高, 可在 40 min 内完成检测, 检出限低至 2 ng/mL^[41], 改良后耗时可缩短为 15 min^[42]。

此外, 卵壳前体蛋白 (choriogenin, CHG) 也是鱼类中研究得较多的一种生物标志物^[43-45]。随着内分泌干扰分子机制研究的进展, 芳香化酶 mRNA^[46]、ER β mRNA^[47]等越来越多的分子标志物被发现可用于内分泌干扰物质筛选。

4.2 生物传感器检测法

生物传感器检测法是一种根植于免疫技术的仪器测定方法, 由一个能与 EDCs 特异性反应的生物分子 (生物识别元件) 和一个换能器 (传感元件) 构成。生物识别产生的物理化

学性质的改变, 可以通过换能器转化变为可识别的信号^[48]。常用的生物识别元件多为免疫化学的抗体或抗原、酶、非酶受体、完整细胞以及核酸, 常用的转换器包括电化学传感器、光学传感器、质量敏传感器和热敏传感器 4 大类^[49]。

生物传感器以其灵敏度高、可大批量检测、价格便宜、可现场检测和自动在线检测等优点, 在实践中得到广泛应用^[50]。目前, 针对不同环境中不同种类的 EDCs 的检测, 各式各样的生物传感器已被设计出来, 并已出现多种成熟的商业产品。如: 测定水体中甾固醇激素的光学免疫传感器^[51]; 检测氯化物的一种使用表面等离子共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 技术的竞争性免疫分析方法^[52]; 针对挥发酚的酪氨酸酶电化学生物传感器检测方法^[53]; 检测土壤中的污染物萘的电化学生物传感器^[54]; 使用抗体作为生物识别元件, 基于碱性磷酸酶抑制剂设计出的一种电化学免疫传感器^[55]; 已在实践中成功检测过水体中的阿特拉津、西玛津、异丙隆、2,4-D、百草枯等除草剂的商用免疫传感器产品 RIANA^[56-57]等。此外, 卵黄原蛋白生物传感器^[58]以及基于雌激素受体的 SPR 生物传感器^[59-60]也已被广泛投入到筛选类雌激素内分泌干扰物的实践中。毋庸置疑, 生物传感器在各个领域对多种化学物质的定性和定量检测中都展现出其巨大的潜力。但就目前而言, 这一方法仍存在着生物分子的稳定性低、物理化学参数设置和结果中出现干扰数据等问题, 亟需后续研究解决^[50]。

5 展望

5.1 快速筛选技术的优劣势分析

动物模型整体、组织与器官、细胞和分子这 4 种不同研究水平的检测方法各有其优缺点。整体水平的检测法可以较为真实可靠地反映出一种化学物质是否能够作为环境内分泌干扰物对生物体造成危害, 但耗时耗材、精确度低; 组织与器官水平的检测法较动物活体检测要方便, 并能在一定程度上检测出某些需要经过体内代谢活化才会发挥性激素作用的化学物质; 细胞检测法同样采用宏观指标, 但更为快速、便捷, 应用较广泛; 分子检测法敏感度最高、耗时最短, 可大大提高检测效率, 并越来越多地向实际应用方向发展。

5.2 快速筛选模式生物的选择

在环境内分泌干扰物筛选方法的应用中, 选择的实验动物种类不但包括啮齿类和灵长类, 还涉及到鱼类、鸟类和两栖类、爬行类等。模式生物的选取应遵循一定的原则, 如: ① 实验动物易于获得并易于在实验室培养; ② 生长迅速, 生活周期短; ③ 基础生物学研究比较深入, 前期研究实验数据较丰富。线虫动物门 (Nematoda) 种类丰富, 物种多样性仅次于昆虫, 个体数量也是动物界之最。其中秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 成虫细胞为定数, 并已在 1998 年底完成了基因组全序列的测定, 研究极为透彻。线虫不失为活体检测方法研究的理想模式生物。

5.3 快速筛选技术的甄选

目前环境内分泌干扰物的筛选方法很多, 并且日趋丰富,

但对于每种化合物对不同种类动物的内分泌干扰作用机制的研究并不透彻,所以在今后的研究上应重点加深对干扰的作用机制的探讨。针对不同结构类别的化学物质,根据 EDCs 干扰内分泌系统的不同途径,选择不同种类的实验动物以及合适的筛选方式,并结合使用其他方法来辅助其筛选功能。在各种检测方法中,成熟、成型的试剂盒所占比例并不大。要进行快速筛选,易于获得、使用便利、检测迅速的试剂盒会带给使用者带来极大的方便。开发出适合实验室和实际使用的试剂盒,并进行批量化生产和商业推广,是今后技术发展的一个重要方向。

5.4 快速筛选试剂盒的研制

已建立的多种检测技术的原理各不相同,应依据不同的内分泌干扰途径和机制对 EDCs 进行检测。因此,可以在不同机制领域内选择其代表性的成熟技术,设计开发出相应的快速筛选试剂盒。在面对不熟悉的化学物质时,同时使用多种不同机制试剂盒对其进行检测,既可尽可能准确地判断出该化学物质是否具有内分泌干扰特性,又可推测出其可能的作用途径和干扰机制。

参考文献 (References)

- [1] Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J P, Giudice L C, *et al.* Endocrine disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement [J]. *Endocrine Reviews*, 2009, 30(4): 293–342.
- [2] WHO/IPCS. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors [R]. World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2. http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_ch5.pdf, 2002.
- [3] Henley D V, Korach K S. Endocrine disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function [J]. *Endocrinology*, 2006, 147(6): s25–s32.
- [4] Falconer I R, Chapman H F, Moore M R, *et al.* Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse[J]. *Environmental Toxicology*, 2006, 21(2): 181–191.
- [5] Tabb M M, Blumberg B. New modes of action for endocrine-disrupting chemicals[J]. *Molecular Endocrinology*, 2006, 20(3): 475–482.
- [6] Cech J J, Wilson B W, Crosby D G. Multiple stressors in ecosystems[M]. New York: Lewis Publishers, 1998.
- [7] Kang K S, Kim H S, Ryu D Y, *et al.* Immature uterotrophic assay is more sensitive than ovariectomized uterotrophic assay for the detection of estrogenicity of p-nonylphenol in Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicology Letters*, 2000, 118: 109–115.
- [8] Markey C M, Michaelson C L, Veson E C, *et al.* The mouse uterotrophic assay: A reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(1): 55–60.
- [9] Branham W S, Leamons M L, Sheehan D M, *et al.* Estrogen and antiestrogen-induced ornithine decarboxylase activity and uterine growth in the rat [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1988, 29: 153–159.
- [10] Evans J S, Varney R F, Koch F C. The mouse uterine weight method for the assay of estrogens[J]. *Endocrinology*, 1941, 28: 747–752.
- [11] Gellert R J, Lewis J, Petra P H. Neonatal treatment with sex steroids: Relationship between the uterotrophic response and the estrogen "receptor" in prepubertal rats[J]. *Endocrinology*, 1977, 100(2): 520–528.
- [12] Tinwell H, Ashby J. Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(5): 575–582.
- [13] Batty J, Lim R. Morphological and reproductive characteristics of male mosquito fish (*Gambusia affinis holbrooki*) inhabiting sewage – contaminated waters in New South Wales, Australia [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 36: 301–307.
- [14] Leusch F D L, Chapman H F, Kay G W, *et al.* Anal fin morphology and gonadal histopathology in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to treated municipal sewage [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 50(4): 562–574.
- [15] Blaise C, Gagne F, Pellerin J, *et al.* Molluscan shellfish biomarker study of the Quebec, Canada, Saguenay Fjord with the soft-shelled clam, *Mya arenaria*[J]. *Environmental Toxicology*, 2002, 17: 170–186.
- [16] Stephensen E, Adolfsson M, Forlin L. Biochemical effects in primary cultured hepatocytes from rainbow trout after treatment with extracts of effluent from pulp mills [J]. *Marine Environmental Research*, 1998, 46: 395–396.
- [17] Leusch F D L, Chapman H F, Kornerv, *et al.* Efficacy of an advanced biological nutrient removal plant in Queensland (Australia) to remove estrogenic chemicals[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39: 5781–5786.
- [18] Körner W, Hanf V, Schuller W, *et al.* Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents [J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 225:33–48.
- [19] Ankley G T, Johnson R D, Detenbeck N E, *et al.* Development of a research strategy for assessing the ecological risk of endocrine disruptors [J]. *Rev Toxicol Ser B: Environ. Toxicol*, 1997: 1–78.
- [20] Gibson K. The endocrine disruptor screening program: How EPA plans to select an initial group of chemicals for screening [J]. *Environmental Quality Management*, 2003, 43–54.
- [21] Lippman M E, Bolan G. Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture[J]. *Nature*, 1975, 256: 592–593.
- [22] Horwitz K B, McGuire W L. Nuclear mechanisms of estrogen action: Effects of estradiol and anti-estrogens on estrogen receptors and nuclear receptor processing [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(22): 8185–8191.
- [23] Soule H D, McGrath C M. Estrogen responsive proliferation of clonal human breast carcinoma cells in athymic mice[J]. *Cancer Letters*, 1980, 10(2): 177–189.
- [24] Soto A M, Sonnenschein C. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF -7) [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 1985, 23(1): 87–94.
- [25] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, *et al.* The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1995, 103(S7): 113–122.
- [26] Rasmussen T H, Nielsen J B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassay (E-Screen)[J]. *Biomarkers*, 2002, 7(4): 322–336.
- [27] Routledge E J, Sumpter J P. Estrogenic activity of surfactants and some

- of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15(3): 241–248.
- [28] Henttu P, Parker M G, Sumpter J P, *et al.* The estrogenic activity of phthalate esters in vitro [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105(8): 802–811.
- [29] Coldham N G, Dave M, Sivapathasundaram S, *et al.* Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105(7): 734–742.
- [30] Odum J, Lefevre P A, Tittensor S, *et al.* The rodent uterotrophic assay critical protocol features, Studies with nonyl phenols, and comparison with a Yeast Estrogenicity Assay [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1997, 25: 176–188.
- [31] Breinholt V, Larsen J C. Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 1998, 11: 622–629.
- [32] Bovee T F H, Helsdingen R J R, Koks P D, *et al.* Development of a rapid yeast estrogen bioassay, based on the expression of green fluorescent protein[J]. *Gene*, 2004, 325: 187–200.
- [33] Estévez-Alberola M C, Marco M P. Immunochemical determination of xenobiotics with endocrine disrupting effects [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378(3): 563–575.
- [34] Zhao M, Zhou S, Yan J, *et al.* Immunochemical analysis of endogenous and exogenous estrogens [J]. *Current Pharmaceutical Analysis*, 2007, 3 (1): 25–38.
- [35] Peakall D B. Biomarkers: The way forward in environmental assessment [J]. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 1994, 1: 55–60.
- [36] Jones P D, De Coen W M, Tremblay L, *et al.* Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens [J]. *Water Science & Technology*, 2000, 6: 45–58.
- [37] Hiramatsu N, Matsubara T, Fujita T, *et al.* Multiple piscine vitellogenins: biomarkers of fish exposure to estrogenic endocrine disruptors in aquatic environments[J]. *Marine Biology*, 2006, 149(1): 35–47.
- [38] Ebrahimi M. Vitellogenin assay by enzyme-linked immunosorbent assay as a biomarker of endocrine disruptor chemicals pollution [J]. *Indian Journal of Occupational and Environmental*, 2005, 9(2): 65–70.
- [39] Hara A, Hirano K, Shimizu M, *et al.* Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: Characterization of yolk proteins, development of immunoassays and use as biomarker of exposure to environmental estrogens [J]. *Environmental Science*, 2007, 14(2): 95–108.
- [40] Maltais D, Roy R L. A lateral flow immunoassay for rapid evaluation of vitellogenin levels in plasma and surface mucus of the copper redhorse (*Moxostoma Hubbsi*), environmental toxicology and chemistry[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2007, 26(8): 1672–1676.
- [41] Soh N, Nishiyama H, Asano Y, *et al.* Chemiluminescence sequential injection immunoassay for vitellogenin using magnetic microbeads[J]. *Talanta*, 2004, 64(5): 1160–1168.
- [42] Hirakawa K, Katayama M, Soh N, *et al.* Electrochemical immunoassay for vitellogenin based on sequential injection using antigen-immobilized magnetic microbeads[J]. *Analytical Sciences*, 2006, 22(1): 81.
- [43] Tom M, Auslander M. Transcript and protein environmental biomarkers in fish—a review[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(2): 155–162.
- [44] Ferraz N, Carnevia D, Nande G, *et al.* Specific immunoassays for endocrine disruptor monitoring using recombinant antigens cloned by degenerated primer PCR [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389(7–8): 2195–2202.
- [45] Hong L, Fujita T, Wada T, *et al.* Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): Purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009, 194(1): 9–17.
- [46] Fenske M, Segner H. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 67: 105–126.
- [47] Flouriot G, Pakdel F, Valotaire Y. Transcriptional and posttranscriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 124: 173–183.
- [48] Rodriguez-Mozaz S, Alda M J, Marco M P, *et al.* Biosensors for environmental monitoring: A global perspective [J]. *Talanta*, 2005, 65: 291–297.
- [49] Rodriguez-Mozaz S, Marco M P, Lopez M J, *et al.* Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2004, 378: 588–598.
- [50] Andreescu S, Sadik O A. Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring [J]. *Pure and Applied Chemistry*, 2004, 76(4): 861–878.
- [51] Rodriguez-Mozaz S, Reder S, Lopez M, *et al.* Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the River ANALyser (RIANA), an optical immunosensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(7): 633–640.
- [52] Shimomura M, Nomura Y, Zhang W, *et al.* Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenyls and atrazine [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 434(2): 223–230.
- [53] Parellada J, Narvaez A, Lopez M A, *et al.* Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 362(1): 47–57.
- [54] Zaborosch A K C, Spener F. Microbial sensors for PAH in aqueous solution using solubilizers [M]. The Netherlands: Field screening Europe, 1997: 203–206.
- [55] Wilmer M, Trau D, Renneberg R, *et al.* Amperometric immunosensor for the detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in water [J]. *Analytical Letters*, 1997, 30(3): 515–525.
- [56] Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, *et al.* Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 426(2): 209–216.
- [57] Mallat E, Barzen C, Klotz A, *et al.* River analyzer for chlorotriazines with a direct optical immunosensor [J]. *Environmental Science and Technology*, 1999, 33(6): 965–971.
- [58] Krüger S, Piletsky S, Turner A P F. Biosensors for marine pollution research, monitoring and control [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 45 (1–12): 24–34.
- [59] Usami M, Mitsunaga K, Ohno Y. Estrogen receptor binding assay of chemicals with a surface plasmon resonance biosensor [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 81(1): 47–55.
- [60] Hock B, Seifert M, Kramer K. Engineering receptors and antibodies for biosensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17(3): 239–249.

(责任编辑 王芷)