基于毒性效应通路荧光细胞传感模型的T-2毒素毒性筛查

孙嘉笛，高 璐，张银志，孙秀兰*

（江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122）

摘要：为实现T-2毒素的可视化毒性筛查，利用T-2毒素毒性通路中*AP-1*的关键靶点应答元件*TRE*与红色荧光蛋白（mCherry）的启动子构建pcDNA3.1-*TRE*-mCherry荧光质粒，建立荧光HEK293细胞传感筛查模型；同时，为验证该细胞传感模型的适用性，对实际样品中残留的T-2毒素和T-2毒素的主要代谢产物HT-2毒素进行了毒性监测。结果表明，T-2毒素刺激模式细胞8 h时，细胞内的红色荧光强度达到最高值并趋于稳定。当T-2毒素质量浓度在1~25 ng/mL时，其与荧光强度呈线性相关，线性方程为y=1.149 38x+64.72，R^2=0.969。根据剂量曲线得出T-2毒素的EC_{50}为16.27 ng/mL，检测限为0.691 ng/mL。该细胞传感模型用于样品加标实验，平均加标回收率为86.13%~126.20%，对HT-2毒素进行毒性筛查得到EC_{50}为27.65 ng/mL。

关键词：T-2毒素；毒性筛查；细胞传感；荧光

中图分类号：TS 201.6　**文章编号：**1673-1689(2021)12-0035-09　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.12.005

T-2 Toxicity Screening Based on Fluorescence Cell Sensing Model via Toxic Effect Pathway

SUN Jiadi，*GAO Lu*，*ZHANG Yinzhi*，*SUN Xiulan**

（School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract: To realize the visual toxicity screening of T-2 toxin, the fluorescent plasmid pcDNA 3.1-*TRE*-mCherry was constructed using the key *AP-1* target response element *TRE* and red fluorescent protein (mCherry) in the toxicity pathway of T-2 toxin and the sensing screening model of fluorescent HEK293 cells was established. To verify the applicability of the cell sensing model, the toxicity detection of T-2 toxin residue in the actual samples and HT-2 toxin which was the main metabolite of T-2 toxin was conducted. The results showed that the intracellular red fluorescence intensity reached the maximum value and tended to be stable when the T-2 toxin stimulated the model cells for 8 h. When the concentration of T-2 toxin was in the range of 1~25 ng/mL, it was linearly correlated with fluorescence intensity, and the linear equation was y=1.149 38x+64.72, R^2= 0.969. According to the dose curve, the EC_{50} of T-2 toxin was 16.27 ng/mL, and the detection limit was 0.691 ng/mL. The cell sensing model was used in the standard addition test. The average recovery of standard addition was 86.13%~126.20%, and the EC_{50} of HT-2 toxin was 27.65 ng/mL after toxicity screening.

Keywords: T-2 toxin, toxicity screening, cell sensing, fluorescence

收稿日期：2021-05-07

基金项目：国家“十三五”重点研发计划项目(2021YFA0910200)；国家自然科学基金项目(31772069)；江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20190584)。

* **通信作者：**孙秀兰(1976—)，女，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品安全检测与主动防控研究。E-mail：sxlzzz@jiangnan.edu.cn

单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)是自然界中广泛分布的一类真菌毒素，由多种霉菌属产生,主要包括镰刀菌属(*Fusarium*)、单端孢属(*Trichothecium*)、头孢霉(*Cephalosporium*)等[1]。单端孢霉烯族毒素在多种谷类作物如大麦、小麦、燕麦、玉米、马铃薯[2-3],以及肉、蛋、奶,甚至动物饲料中都能被检测到[4-5]。T-2 毒素是由镰刀菌属代谢产生的一种 A 型单端孢霉烯族毒素,是毒性最强的真菌毒素之一[6]。1973 年,世界卫生组织将 T-2 毒素归类为农产品、人类食品和动物饲料中不可避免的污染物[7]。

T-2 毒素对人体健康和畜牧业有害，其通常在储存条件气候寒冷或潮湿的谷物中被发现,特别是在燕麦、大麦、小麦和动物饲料中[8-10]。T-2 毒素的毒性强、污染范围广、检出水平高。根据 Biomin 对全球饲料中真菌毒素含量进行的调查,有 19%的样品被 T-2 毒素污染,我国饲料样品中 T-2 毒素的污染率为 79.5%，这些样品中 T-2 毒素的水平最高可达 735 ng/g[11]。大骨节病(kashin-beck disease,KBD)流行地区(如青海省和四川省)的饮用水以及中药中也检测到 T-2 毒素[12]。此外,虽然大骨节病的病因尚不清楚,但有理由怀疑 T-2 毒素是导致该病症的主要因素之一，在 KBD 流行的地区,T-2 毒素的含量相对较高,小麦污染的平均水平为78.91 μg/kg,面粉污染的平均水平为 47.47 μg/kg[4,13-14]。

T-2 毒素的毒性包括神经毒性[15]、肝毒性[16]、生殖毒性[17]和肠毒性[18]。目前,对于 T-2 毒素毒性的评价方法主要有两种,一种是动物染毒实验(体内评价),另一种是细胞毒性评价(体外评价)。基于实验动物的体外评价模型已见报道,然而该方法操作复杂、实验周期长。传统的细胞毒性实验大多是通过测定细胞常规的生理生化指标来进行毒性评价,然而该方法取得的结果特异性差,不够直观。因此,亟需开发一种可以直接观察、实时监测、能真实筛查 T-2 毒素细胞毒性的方法。

作者建立了一种可视化的荧光细胞传感器并对 T-2 毒素的细胞毒性进行筛查。利用 T-2 毒素毒性通路中的关键靶点应答元件 *TRE* 与 mCherry 的启动子构建独立的质粒，通过转染将其导入 HEK293 细胞，成功建立了能稳定表达荧光的细胞株,当 T-2 毒素及其代谢产物刺激细胞后,细胞内特异性受体及其信号通路被激活,应答元件 *TRE* 通过信号通路启动所连接的荧光蛋白表达,可直接示踪细胞内部变化过程。使用该荧光细胞筛查 T-2 毒素的毒性,采用倒置荧光显微镜和宽场高内涵成像仪观察和记录细胞受到 T-2 毒素刺激后的荧光变化，建立毒素质量浓度与细胞荧光强度的剂量-效应关系,完成对 T-2 毒素的实时、精确、定量筛查。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

T-2 毒素标准品、HT-2 毒素标准品:Sigma 化学试剂有限公司产品;Lipofectamine 3000 (Invitrogen,CA):美国 Thermo fisher 公司产品;无内毒素质粒小提中量试剂盒:TIANGEN 生物科技公司产品;LB 培养基、琼脂粉:国药集团产品;氨苄霉素、G418 抗生素:Aladdin 公司产品。

1.2 材料与设备

GRP-9050 隔水式恒温培养箱：上海森信试验仪器公司产品;DMI8 倒置荧光显微镜:德国 LAICA 公司产品;THZ-D 台式恒温摇床：太仓市强乐试验仪器公司产品;宽场高内涵成像仪:美国 Molecular Devices 公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 细胞完全培养基的配制:人胚肾 HEK293 细胞完全培养基为含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 RPMI-1640 培养液(均为体积分数)。细胞常规培养:将细胞置于 37 ℃培养箱中培养,保持 95%湿度以及体积分数 5%的 CO_2。HEK293 细胞为贴壁生长,2 d 更换一次细胞培养液。当细胞密度达到 80%~90%时,除去培养皿中的完全培养基。加入 PBS 溶液清洗 3 次,以清洗残留的培养基,之后加入 1 mL 含质量分数 0.25% EDTA 的胰酶消化液,在培养箱中孵育 2~3 min,立即加入 1 mL 的完全培养基终止消化。收集细胞至无菌离心管中,800 r/min 离心 5 min,弃去培养液,按照 1:3 的传代比例加入相应的完全培养液重悬细胞,转移至新的细胞培养皿内进行培养。选择处于对数生长期的细胞用于后续实验。

1.3.2 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 荧光质粒的构建 载体 pcDNATM 3.1 (+) 包含一个多克隆位点(multiple cloning site,MCS)。将 *TRE* (5′-TGAC/GTCA-3′) 改造为 8 串联重复序列结构(5′-TGACTCATGACTCATGACTCATGACTCATGACTCATGACTCATGACTCATGAC-3′)[19-20]，将获得的串联

序列与 mCherry 的启动子连接以获得目标基因序列，将设计的靶基因序列插入 pcDNA3.1 的 MCS 中以构建重组 DNA，酶切位点为 *Sac* I-*Xho* I。AmpR 设计用于筛选原核生物抗性，NeoR 设计用于筛选真核生物抗性。

氨苄霉素用于筛选原核表达。配置固态和液态 LB 培养基，高压灭菌冷却至 50~60 ℃时，加入氨苄霉素用于抗性筛选，得到含 50 μg/mL 氨苄霉素的 LB 培养基。无菌状态下，挑取 *TRE*-mCherry 感受态菌种（菌种由天津卡酶德公司构建）划线，37 ℃倒置过夜培养。挑取单克隆菌落，接入上述培养基，摇床 37 ℃过夜培养。依据 EndoFree 质粒抽提手册，提取大量重组 DNA，保存于-20 ℃，避免反复冻融。

1.3.3 荧光质粒的细胞转染　细胞铺板于 6 孔板，当细胞融合度为 90%时，弃去培养基，细胞转染的主要试剂是阳离子脂质体 3000，根据说明书进行操作。以 6 孔板为例，取两支灭菌离心管，一管中加入 125 μL 无血清培养基、2.5 μg *TRE* 标记的 DNA 质粒和 5 μL P3000 试剂，另外一管中加入 7.5 μL Lipofectamine 3000 转染试剂，室温下静置 5 min 后，将第二管中混合试剂加入第一管中，轻轻混匀，室温静置 15 min，将得到的 DNA-脂质复合物均匀滴加到细胞培养板中，混匀后放回到培养箱中 2~4 d，传代培养并使用新霉素进行真核筛选，然后进行转染细胞分析[21-22]。

1.3.4 HEK293 细胞转染后细胞增殖活性分析　T-2 毒素质量浓度为：0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 ng/mL，计算增殖抑制率，根据抑制率分析 HEK293 细胞转染前后增殖活性。

$$Y=1-\left(\frac{A_2/A_1-A_0}{A_3/A_1-A_0}\right)$$

式中：Y 为细胞增殖抑制率，%；A_0 为空白组吸光度；A_1 为对照组吸光度；A_2 为转染组吸光度；A_3 为无毒素添加转染组吸光度。

1.3.5 转染 HEK293 细胞活性氧检测　多功能荧光酶标仪测定细胞内荧光相对强度，根据荧光强度值分析 HEK293 细胞转染前后活性氧含量。

1.3.6 转染 HEK293 细胞凋亡检测　用流式细胞仪检测，采用 Cell Quest 软件对检测结果进行分析。

1.3.7 荧光 HEK293 细胞传感器筛查 T-2 毒素的毒性　基于 T-2 毒素的细胞毒性通路作用，通过 HEK293 细胞荧光传感器所表达的荧光强度对 T-2 毒素进行毒性筛查。经过质粒转染并稳定表达的 HEK293 细胞收集后接种于无菌 96 孔板中，培养箱中过夜，待细胞贴壁后弃去培养基，加入 100 μL 含有 10 ng/mL T-2 毒素的细胞培养液，同时设置不含毒素的对照组以及未进行质粒转染的空白组。处理完成后立即置于酒精擦拭过的宽场高内涵成像仪中，连续进行 12 h 实时荧光监测 mCherry 表达，每 1 h 进行细胞荧光成像拍摄及荧光强度检测，分析得到关于时间响应的 T-2 毒素毒性。

将稳定转染的 HEK293 细胞收集，接种于 96 孔板中，培养箱中过夜，待细胞贴壁后弃去培养基，加入 100 μL 含不同质量浓度的 T-2 毒素的培养液，分别为：0.5、1、2、5、10、15、20、25、30 ng/mL。适宜时间后对 mCherry 表达进行检测，在倒置荧光显微镜下进行荧光成像拍摄，并通过多功能酶标仪检测荧光强度。根据荧光强度值与 T-2 毒素关系进行线性拟合，计算检测限（LOD）。

1.3.8 样品加标实验

用三氯甲烷-无水乙醇溶液（体积比为 4:1）提取面粉样品，使用中性氧化铝/活性炭柱纯化，然后制成样品溶液[23]。对处理后的面粉样品进行加标实验，T-2 毒素的终质量浓度为 0、2、5、10、20 ng/mL，对该溶液进行无菌过滤并用于细胞荧光传感分析。

1.3.9 荧光 HEK293 细胞对 T-2 毒素代谢产物的毒性筛查　研究表明，真菌毒素的代谢产物与原毒素结构相似，并且同样有极高的毒性作用[24-25]。T-2 毒素是单端孢霉烯家族中毒性最强的一种。T-2 毒素发生去乙酰化后代谢成 HT-2 毒素，两者的结构十分相似，且在体内主要以 HT-2 形式存在[26]。为了对 T-2 毒素的代谢衍生物进行毒性检测，利用不同质量浓度的 HT-2 毒素（0.2、0.5、1、5、10、20、30、40、50 ng/mL）与稳定转染的 HEK293 细胞孵育 8 h，拍摄细胞荧光成像，监测细胞荧光强度。

2 结果与分析

2.1 HEK293 细胞荧光传感器原理

mCherry 是常用的示踪剂之一，其颜色和单体分子的光稳定性优于其他荧光蛋白标记[27]。HEK-293 细胞易于转染，是表达异源基因的常用细胞模型[28-29]。研究发现，HEK293 细胞构建的生物模型具有更好的荧光响应，因此将 mCherry 和 HEK293 细胞应用于生物模型的构建。

由图 1 所示，在生物模型的构建中，以 pcDNA3.1 为质粒载体，mCherry 的启动子序列与 *AP-1* 识别元件 *TRE* 相连，*TRE* 相当于级联信号的“启动子”，mCherry 荧光蛋白报告基因作为模型中的输出信号。利用脂质体可以和细胞膜融合的特点，将 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 质粒转染导入 HEK293 细胞。当 T-2 毒素刺激细胞，激活细胞内 *AP-1* 信号因子，引起识别元件 *TRE* 启动和荧光蛋白表达。

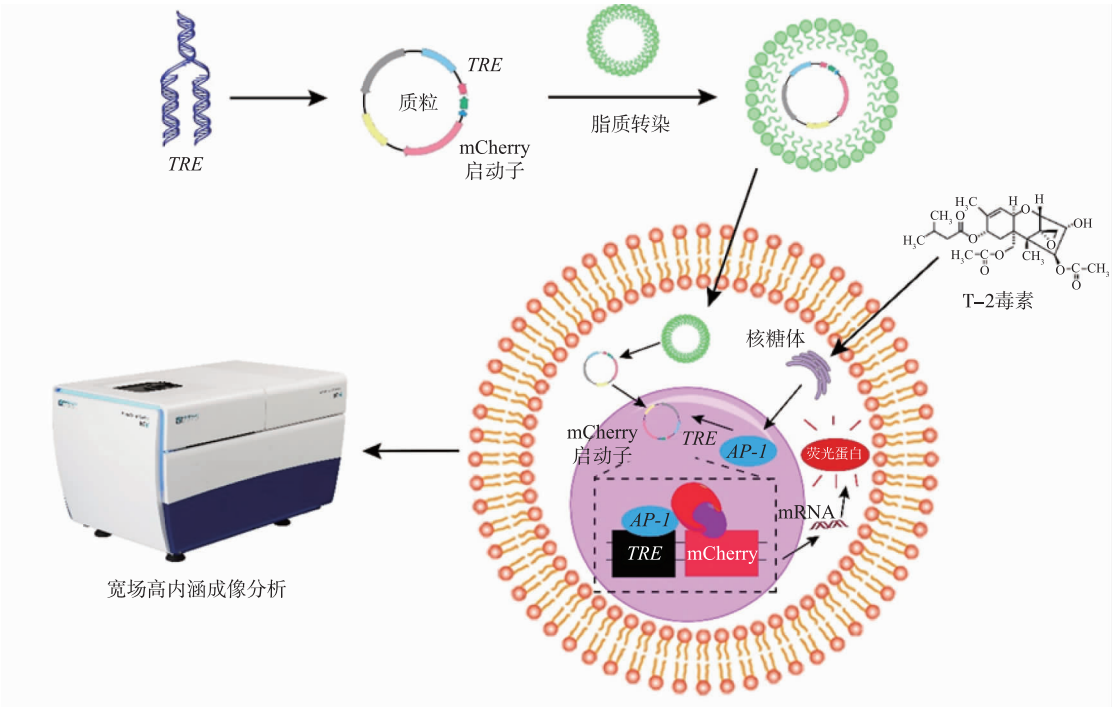


图 1　HEK293 细胞荧光传感器工作原理

Fig. 1　A schematic illustration of the working principle of a HEK293 cell sensor

2.2　pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 荧光质粒的构建

如图 2(a)所示，通过克隆 *TRE* 序列得到串联序列，以提升信号的响应速度，将串联序列与 mCherry 的启动子连接以获得目标基因序列 *TRE*-mCherry，将其插入空载质粒 pcDNA3.1 的 MCS 多克隆位点中，从而构建 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 质粒。如图 2(b)所示，最终获得 4 719 bp 的重组质粒，证明了 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 质粒的成功构建。

2.3　荧光质粒转染对细胞活性的影响

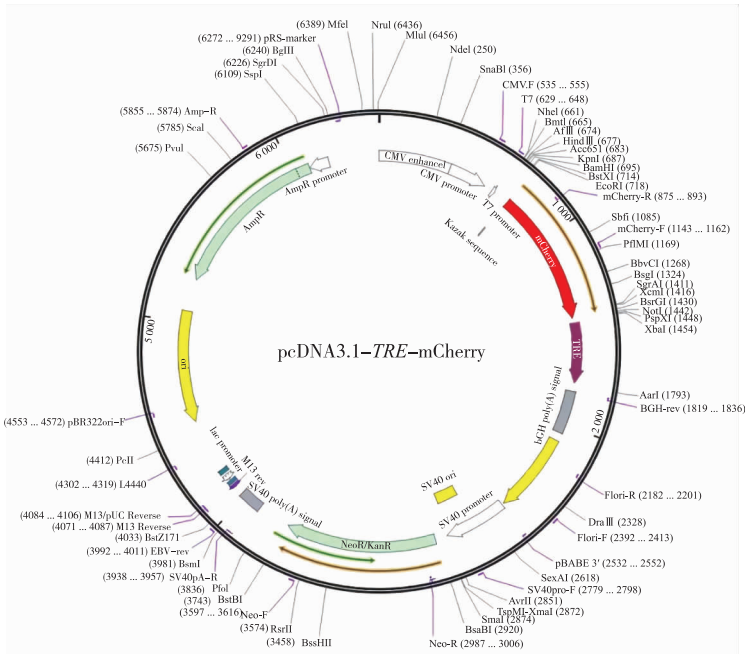
2.3.1　荧光质粒转染对细胞生长活性的影响　将转染前后的细胞置于光学显微镜中拍照观察细胞形态，如图 3(a)所示，对照组与转染组中细胞生长状况正常，细胞形状完整，从形态上可以满足实验要求。

为确保转染后的 HEK293 细胞能维持正常的细胞活性，用 CCK-8 法对转染细胞的活性进行检测。如图 3(b)所示，转染 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry 质粒的转染组细胞相对活性 97.87%，与对照组细胞相对活性基本一致。不同质量浓度 T-2 毒素刺激细胞后，转染前后 HEK293 细胞增殖抑制率大致相同，见表 1。说明转染后细胞活性基本保持不变，未对细胞的正常生理生长产生明显影响。

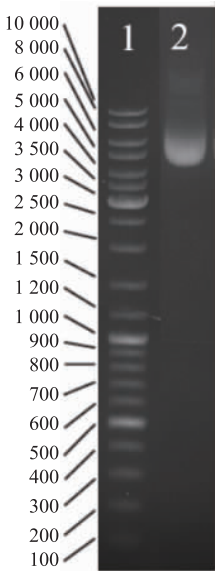
2.3.2　荧光质粒转染对细胞活性氧水平的影响　通过荧光相对强度变化可反映活性氧含量变化，HEK293 细胞转染前后荧光相对强度见图 4。与对照组相比，转染组的荧光相对强度并没有显著变化，此外，转染前与转染后细胞的荧光相对强度均与空白组相差 1 倍以内，由此说明荧光质粒转染 HEK293 细胞没有产生大量的活性氧物质，未造成氧化应激损伤，对细胞正常生理活性未造成影响。

2.3.3　荧光质粒转染对细胞凋亡的影响　通过细胞凋亡试剂盒测得转染前后细胞凋亡率，并通过流式细胞仪对早期凋亡和晚期凋亡细胞进行检测。由于 HEK293 细胞自身贴壁不牢，极易从细胞皿上脱落，造成细胞自噬，因此，图 5 中对照组细胞凋亡率在 17%左右，但转染前后细胞凋亡无明显差异，说明细胞转染对细胞凋亡未产生不良影响。

综合细胞活性、细胞内活性氧水平以及细胞凋



(a) pcDNA3.1-*TRE*-mCherry质粒构建的结构图

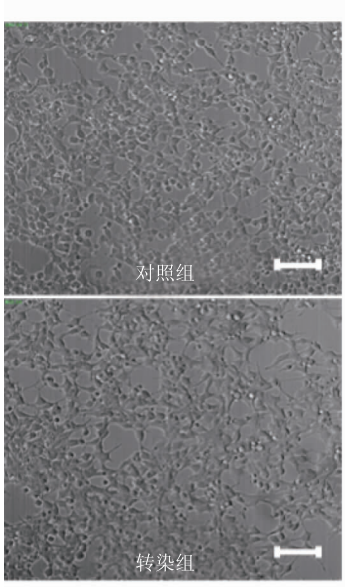


1：DNA marker；2：酶切电泳图。

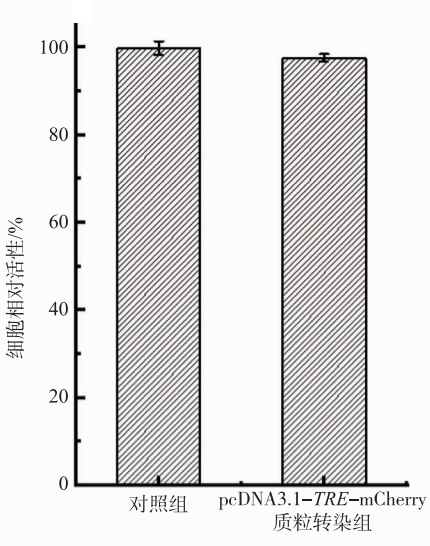
(b) pcDNA3.1-*TRE*-mCherry质粒的酶切凝胶电泳图

图 2　pcDNA3.1–*TRE*–mCherry 质粒的构建与酶切凝胶电泳图

Fig. 2　Construction of pcDNA3.1–*TRE*–mCherry plasmid and enzyme gel electrophoresis



(a) pcDNA3.1-*TRE*-mCherry质粒转染前后明场图



(b) 转染前后HEK293细胞活性

图 3　HEK293 细胞质粒转染效果图及其转染后细胞活性

Fig. 3　Effect of plasmid transfection on HEK293 cells and its effect on cell activity after transfection

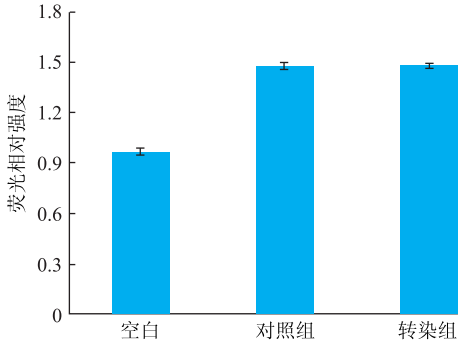
亡结果,发现转染 pcDNA3.1–*TRE*–mCherry 质粒后的 HEK293 细胞符合后续实验要求。

2.3.4　HEK293 细胞荧光传感器对 T-2 毒素毒性筛查　T-2 毒素刺激细胞后，引起 TNF 显著上调，并激活 MyD88、JNK 和 p38 信号因子，参与细胞应激反应,导致 *AP-1* 活化,在细胞增殖、凋亡、炎症等病理过程中起重要作用。基于 HEK293 细胞荧光传感模型,进行 T-2 毒素毒性作用与时间响应关系分析。用 10 ng/mL T-2 毒素刺激 HEK293 细胞,在宽场高内涵成像仪中进行 12 h 的实时荧光监测。如图 6(a)所示,转染后的 HEK293 细胞呈现荧光强度变化,说明该荧光传感模型可以对 T-2 毒素进行毒性

表 1 T-2 毒素暴露对转染前后 HEK293 细胞增殖抑制率的影响

Table 1 Effects of T-2 toxin exposure on proliferation inhibition rate of HEK293 cells before and after transfection

T-2 毒素质量浓度/(ng/mL)	对照组		转染组	
	抑制率/%	标准偏差	抑制率/%	标准偏差
0	0.00	4.98	0.00	4.40
0.2	6.79	8.87	3.65	2.50
0.5	10.01	7.06	12.16	3.09
1	14.71	9.72	16.15	3.04
2	32.33	8.91	27.00	3.81
5	42.58	2.51	37.52	3.08
10	45.09	4.27	48.08	3.84
20	51.70	3.58	57.39	6.33
50	71.38	4.42	75.52	5.66



空白为无细胞组,对照组为转染前,转染组为转染后。

图 4 荧光检测转染对细胞活性氧水平的影响

Fig. 4 Effect of transfection on reactive oxygen species level detected by fluorescence

检测。HEK293 细胞荧光相对强度随时间延长而升高，在 4 h 时开始出现红色荧光,4 h 后荧光逐渐增强,8 h 时荧光接近最大值，之后荧光值趋于稳定，说明该荧光传感模型对 T-2 毒素毒性作用呈现时间响应正相关(见图 6(b)),为接下来使用 HEK293 细胞荧光传感模型进行不同质量浓度 T-2 毒素和 HT-2 毒素的毒性筛查提供支撑。

基于 HEK293 细胞荧光传感模型,进行 T-2 毒素毒性作用与剂量响应关系分析。配制不同质量浓度的 T-2 毒素暴露于转染后的细胞,T-2 毒素质量浓度为 0.5、1、2、5、10、15、20、25、30 ng/mL,8 h 后将细胞置于倒置荧光显微镜下,对细胞荧光表达和强度进行检测。由图 7(a)可知,在 T-2 毒素质量浓度为 0.5 ng/mL 时,细胞内仅有微弱的荧光,随着 T-2 毒素质量浓度的不断升高,细胞呈现的荧光不断增强;当 T-2 毒素质量浓度达到 25 ng/mL 时,荧光强度最大,且荧光值增长速度随着质量浓度的增加而

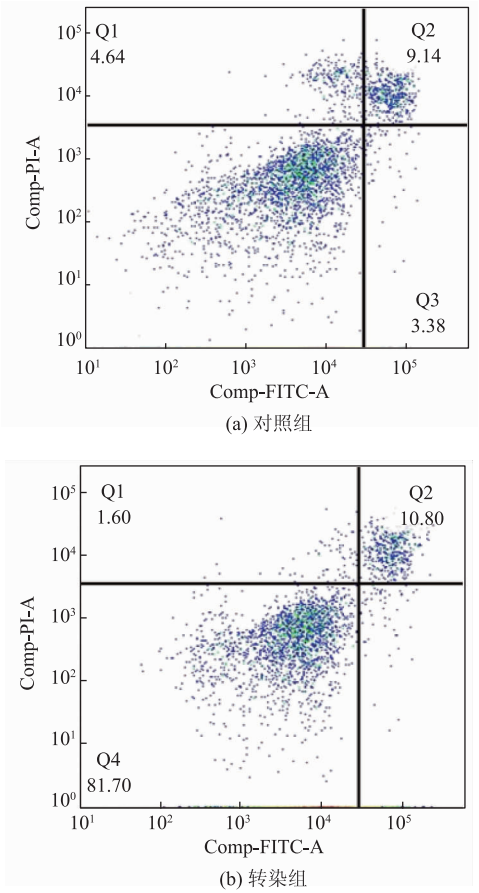
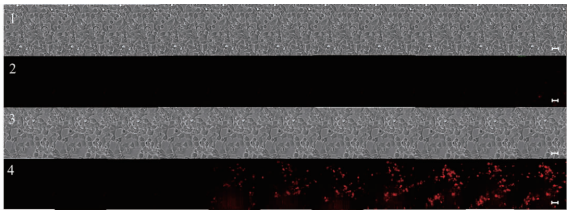


图 5 转染对细胞凋亡影响的流式细胞仪检测图

Fig. 5 Flow cytometry analysis of the effect of transfection on apoptosis

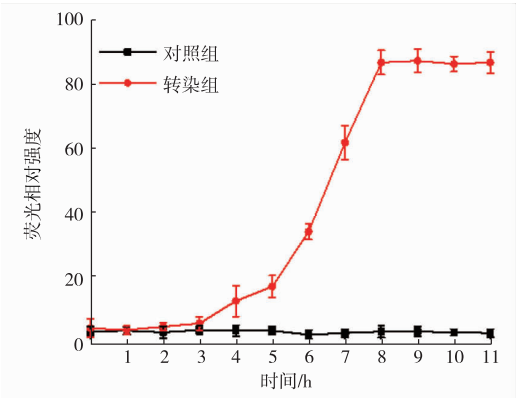
变缓慢。此外,根据 T-2 毒素质量浓度-荧光相对强度曲线,计算得出 T-2 毒素的 EC_{50} 为 16.27 ng/mL。将 T-2 毒素的质量浓度(1~25 ng/mL)与对应的荧光强度进行线性拟合,得到线性方程:

y=1.149 38x+64.72,R^2=0.969,LOD 为 0.691 ng/mL。



1、2分别为对照组明场、暗场；3、4分别为转染组明场、红色荧光场。

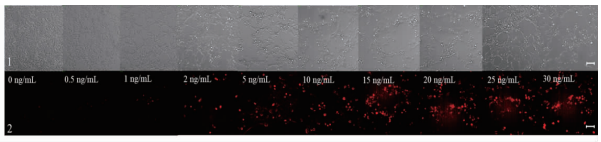
(a) HEK293细胞受T-2毒素作用后随时间变化的荧光强度



(b) HEK293细胞传感器受T-2毒素(10 ng/mL)刺激后荧光相对强度随时间的变化

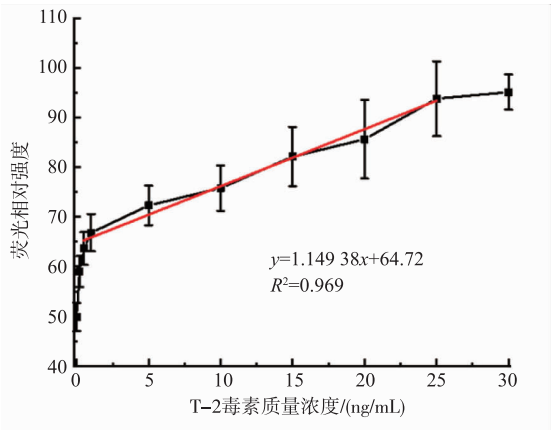
图 6　10 ng/mL T-2 毒素刺激 HEK293 细胞后荧光强度变化

Fig. 6　Fluorescence intensity changes of HEK293 cells stimulated by T-2 toxin of 10 ng/mL



1为明场，2为红色荧光场。

(a) 不同质量浓度的T-2毒素刺激HEK293细胞后荧光成像图



(b) 不同质量浓度的T-2毒素刺激HEK293细胞后荧光相对强度与质量浓度剂量曲线图

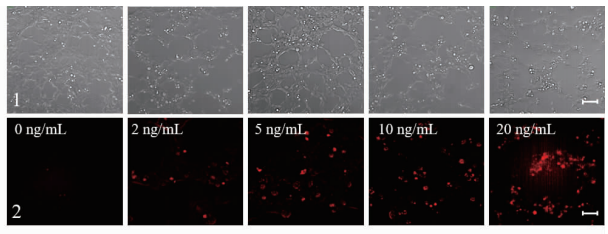
实验结果均在相同条件下重复 3 次，并以均数±标准差表示。

图 7　HEK293 荧光细胞传感器对 T-2 毒素的毒性筛查

Fig. 7　Toxicity screening of T-2 toxin by HEK293 cell-based sensor

2.4　实际样品实验

进行样品添加标准品实验，将 0、2、5、10、20 ng/mL 的 T-2 毒素添加到提取后的面粉样品中，经过无菌处理后用细胞荧光传感器进行毒素毒性筛查，结果见图 8。



比例尺=50 μm；1：明场，2：红色荧光场。

图 8　样品添加 T-2 毒素刺激 HEK293 细胞后的荧光成像图

Fig. 8　Fluorescence imaging of HEK293 cells stimulated by T-2 toxin

基于 HEK293 细胞荧光传感器，可通过测得的荧光相对强度对应 T-2 毒素质量浓度。样品平均加标回收率是 86.13%~126.20%，见表 2。结果表明该方法具有较高的准确性，可用于实际样品中的 T-2 毒素可视化筛查。

表 2　样品加标实验回收率

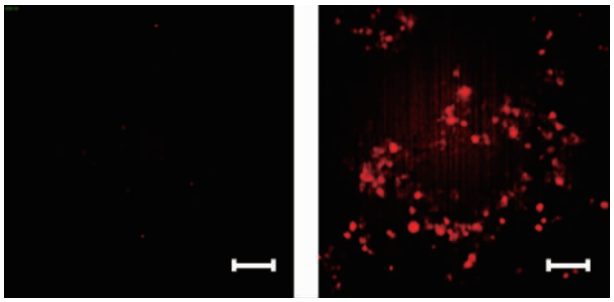
Table 2　Result of recovery rate of spiked sample

T-2 毒素加标质量浓度/(ng/mL)	荧光相对强度	T-2 毒素检测质量浓度/(ng/mL)	回收率/%
0	2.56±1.21	–	–
2	67.12±0.51	2.09	104.50
5	71.98±0.59	6.31	126.20
10	76.82±1.02	10.53	105.30
20	84.52±0.85	17.23	86.13

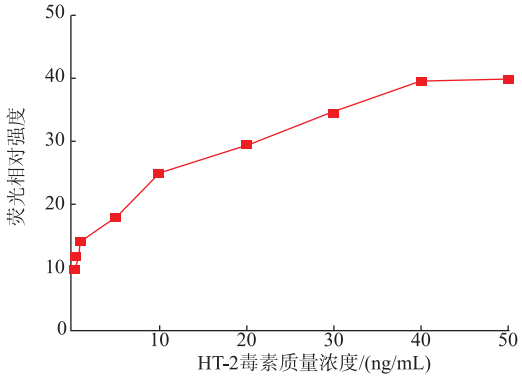
2.5　HEK293 细胞荧光传感器对 T-2 毒素代谢产物毒性筛查

T-2 毒素代谢产物 HT-2 毒素的化学结构和理化特性与 T-2 毒素极为相似，仅有 C-4 位置处的官能团不同，推测可以使用 HEK293 细胞荧光传感模型进行 HT-2 毒素的毒性筛查。分别用 0.2、0.5、1、5、10、20、30、40、50 ng/mL 的 HT-2 毒素刺激转染后的 HEK293 细胞，8 h 后将细胞置于倒置荧光显微镜下，对细胞荧光强度进行监测。由图 9(a)所示，HT-2 毒素刺激后，细胞内 mCherry 表达，说明该荧光传感模型可以进行 HT-2 毒素的毒性筛查。随着 HT-2 毒素质量浓度增加，细胞内荧光相对强度不

断升高,根据 HT-2 毒素质量浓度-荧光相对强度曲线，计算得出 HT-2 毒素的 EC_{50} 为 27.65 ng/mL,说明 HT-2 毒素的细胞毒性小于 T-2 毒素，与之前相关报道基本一致[30-31]。



比例尺=50 μm；左图为对照组，右图为HT-2毒素刺激组。
(a) HT-2毒素刺激HEK293细胞荧光成像图



(b) 不同质量浓度HT-2毒素刺激HEK293细胞后荧光相对强度与质量浓度曲线

图 9 HEK293 细胞荧光传感器对 T-2 毒素代谢产物 HT-2 的毒性筛查

Fig. 9 Toxicity screening of T-2 toxin metabolite HT-2 by HEK293 cell-based fluorescence sensor

3 结 语

基于 T-2 毒素的毒性特定信号通路,选取毒性关键靶点基因 *AP-1* 识别元件 *TRE* 以及 mCherry,构建原核表达载体质粒 pcDNA3.1-*TRE*-mCherry,建立细胞荧光传感模型用于筛查 T-2 毒素的毒性。T-2 毒素可以诱导 HEK293 细胞传感器的红色荧光蛋白表达,根据实时荧光强度结果显示,8 h 时红色荧光蛋白表达稳定，根据质量浓度-荧光相对强度曲线得出 T-2 毒素的 EC_{50} 为 16.27 ng/mL,T-2 毒素质量浓度在 1~25 ng/mL 进行线性拟合,线性方程为 y=1.149 38x+64.72,R^2=0.969,LOD 为 0.691 ng/mL。进行实际样品加标实验，样品平均加标回收率是 86.13%~126.20%。由于 T-2 毒素的代谢产物是 HT-2 毒素,与 T-2 毒素具有相同的毒性官能团,因此,也对 HT-2 毒素进行了毒性筛查。HT-2 毒素的 EC_{50} 为 27.65 ng/mL,与已有研究结论一致。以上结果表明,该荧光细胞传感器可实现对 T-2 毒素及其代谢产物毒性的准确筛查,为食品中其他真菌毒素及其代谢产物安全、可靠的毒性筛查提供了新的手段和思路。

参考文献:

[1] YANG R,WANG Y,ZHANG L,et al. Prepubertal exposure to T-2 toxin advances pubertal onset and development in female rats via promoting the onset of hypothalamic-pituitary-gonadal axis function[J]. **Human & Experimental Toxicology**,2016,35(12):1276-1285.

[2] LEMOS A C,DEBORBA V S,BADIALE-FURLONG E. The impact of wheat-based food processing on the level of trichothecenes and their modified forms[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2021,111:89-99.

[3] KHANEGHAH A M,FARHADI A,NEMATOLLAHI A,et al. A systematic review and meta-analysis to investigate the concentration and prevalence of trichothecenes in the cereal-based food[J]. **Trends in Food Science & Technology**,2020,102:193-202.

[4] XU H,DONG Y,GUO J,et al. Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening T-2 toxin in milk[J]. **Toxicon**,2018,156:1-6.

[5] AHAD R,ZHOU T,LEPP D,et al. Microbial detoxification of eleven food and feed contaminating trichothecene mycotoxins[J]. **BMC Biotechnology**,2017,17(1):1-11.

[6] JANIK E,NIEMCEWICZ M,CEREMUGA M,et al. Molecular aspects of mycotoxins a serious problem for human health[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2020,21(21):1-21.

[7] FOROUD N A,BAINES D,GAGKAEVA T Y,et al. Trichothecenes in cereal grains an update[J]. **Toxins**,2019,11(11):634.

[8] XU L，ZHANG Z，ZHANG Q，et al. An on-site simultaneous semi-quantification of aflatoxin B1，zearalenone，and T-2 toxin in maize-and cereal-based feed via multicolor immunochromatographic assay[J]. **Toxins**，2018，10(2)：1-10.
[9] WANG Y，ZHANG L，PENG D，et al. Construction of electrochemical immunosensor based on gold-nanoparticles/carbon nanotubes/chitosan for sensitive determination of T-2 toxin in feed and swine meat[J]. **International Journal of Molecular Sciences**，2018，19(12)：1-12.
[10] SUN Y，LI S，CHEN R，et al. Ultrasensitive and rapid detection of T-2 toxin using a target-responsive DNA hydrogel[J]. **Sensors and Actuators B：Chemical**，2020，311：1-8.
[11] ZHOU L H，WANG Y L，QIU M，et al. Analysis of T-2 toxin removal factors in a lactococcus fermentation system[J]. **Journal of Food Protection**，2017，80(9)：1471-1477.
[12] LEI R H，JIANG N，ZHANG Q，et al. Prevalence of selenium，T-2 toxin，and deoxynivalenol in Kashin-Beck disease areas in Qinghai province，northwest China[J]. **Biological Trace Element Research**，2016，171(1)：34-40.
[13] GUO P，LIU A，HUANG D，et al. Brain damage and neurological symptoms induced by T-2 toxin in rat brain[J]. **Toxicology Letters**，2018，286：96-107.
[14] LI D，HAN J，GUO X，et al. The effects of T-2 toxin on the prevalence and development of Kashin-Beck disease in China：a meta-analysis and systematic review[J]. **Toxicology Research**，2016，5(3)：731-751.
[15] DAI C，XIAO X，SUN F，et al. T-2 toxin neurotoxicity：role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction[J]. **Archives of Toxicology**，2019，93(11)：3041-3056.
[16] LIU A，XU X，HOU R，et al. DNA methylation and RASSF4 expression are involved in T-2 toxin-induced hepatotoxicity[J]. **Toxicology**，2019，425：1-11.
[17] YANG X，LIU P，CUI Y，et al. Review of the reproductive toxicity of T-2 toxin[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**，2020，68(3)：727-734.
[18] LIU Y，YANG Y，DONG R，et al. Protective effect of selenomethionine on intestinal injury induced by T-2 toxin[J]. **Research in Veterinary Science**，2020，132：439-447.
[19] KATZENELLENBOGEN B S，KATZENELLENBOGEN J A，MORDECAI D. Zearalenones：characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β-resorcylic acid lactones[J]. **Endocrinology**，1979，105(1)：33-40.
[20] GREENE G L，GILNA P，WATERFIELD M，et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA[J]. **Science**，1986，231(4742)：1150-1154.
[21] JI J，GU W，SUN C，et al. A novel recombinant cell fluorescence biosensor based on toxicity of pathway for rapid and simple evaluation of DON and ZEN[J]. **Scientific Reports**，2016，6(1)：1-10.
[22] YE Y，LIU K，GENG S，et al. A novel fluorescent recombinant cell-based biosensor for screening NLRP3 inflammasome inhibitors[J]. **Sensors and Actuators B：Chemical**，2019，301：1-9.
[23] 阳传和，罗雪云，计融，等. 小麦中 T-2 毒素酶联免疫吸附测定法(ELISA)[J]. 环境科学学报，1992，12(3)：372-376.
[24] YU F F，LIN X L，YANG L，et al. Comparison of T-2 toxin and HT-2 toxin distributed in the skeletal system with that in other tissues of rats by acute toxicity test[J]. **Biomedical and Environmental Science**，2017，30(11)：851-854.
[25] ZHANG J，LIU S L，ZHANG H，et al. Gut satiety hormones cholecystokinin and glucagon-like Peptide-$1_{7\text{-}36}$ amide mediate anorexia induction by trichothecenes T-2 toxin，HT-2 toxin，diacetoxyscirpenol and neosolaniol[J]. **Toxicology Applied Pharmacology**，2017，335(15)：49-55.
[26] LIPPOLIS V，PORRICELLI A C R，MANCINI E，et al. Fluorescence polarization immunoassay for the determination of T-2 and HT-2 toxins and their glucosides in wheat[J]. **Toxins**，2019，11(7)：1-13.
[27] WANG P，ZHANG D，BAI S，et al. Feasibility of commonly used fluorescent dyes and viral tracers in aqueous and solvent-based tissue clearing[J]. **Neuroscience Letters**，2020，737：1-6.
[28] KIM J A，CHO K，SHIN Y S，et al. A multi-channel electroporation microchip for gene transfection in mammalian cells[J]. **Biosensors and Bioelectronics**，2007，22(12)：3273-3277.
[29] OOI A，WONG A，ESAU L，et al. A guide to transient expression of membrane proteins in HEK-293 cells for functional characterization[J]. **Frontiers in Physiology**，2016，7：1-15.
[30] LING A，SUN L，GUO W，et al. Individual and combined cytotoxic effects of T-2 toxin and its four metabolites on porcine Leydig cells[J]. **Food and Chemical Toxicology**，2020，139：1-8.
[31] TARONCHER M，RODRíGUEZ-CARRASCO Y，RUIZ M J. Interactions between T-2 toxin and its metabolites in HepG2 cells and *in silico* approach[J]. **Food and Chemical Toxicology**，2021，148：1-11.