

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20201105004

黄付晏, 陈钦畅, 谭皓月, 等. 内分泌干扰物对核受体二聚化影响的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 17-31

Huang F Y, Chen Q C, Tan H Y, et al. Review on the effects of endocrine disrupting chemicals on dimerization of nuclear receptors [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 17-31 (in Chinese)

内分泌干扰物对核受体二聚化影响的研究进展

黄付晏, 陈钦畅, 谭皓月, 郭婧, 于南洋*, 史薇, 于红霞

污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210023

收稿日期: 2020-11-05 录用日期: 2020-12-29

摘要: 环境内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)可模仿或拮抗天然激素与核受体结合, 干扰核受体的同源或异源二聚, 进而通过共调节因子的招募调控转录活性, 最终引起内分泌干扰效应。目前研究主要针对 EDCs 与核受体的结合过程, 忽视了其对核受体二聚化过程的影响, 而该过程的阻断可直接导致转录失活。EDCs 对于不同核受体二聚化的影响不同, 只有激动剂 EDCs 能够促进雄激素受体(androgen receptor, AR)的同源二聚化, 而雌激素受体(estrogen receptor, ER)在与具有激动或拮抗活性的 EDCs 结合后都可诱导 ER 二聚体的形成, 但二聚化类型不同。通过检索 ToxCast 和 Tox21 数据库发现多达 227 种 EDCs 可以诱导 ER 二聚化, 相比于 ER α -ER α 同源二聚体(6.09% ~ 7.38% 的活性率), EDCs 更易诱导 ER α -ER β 异源二聚体(11.25% ~ 12.22% 的活性率)和 ER β -ER β 同源二聚体(10.02% ~ 11.69% 的活性率)。EDCs 也能够差异性诱导其他核受体如维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)与维甲酸 X 受体(retinoid X receptor, RXR)形成的异源二聚体, 不同类型的二聚体对于研究 EDCs 转录活性的生理学相关性具有重要意义。基于经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)报告的参考化学品研究发现, 相比于配受体结合活性, 二聚活性与转录活性之间有着更好的相关关系。本文从 EDCs 介导的核受体二聚化转录机制、二聚化与转录活性间的关系以及二聚化研究方法三方面, 总结 EDCs 对核受体二聚化的影响, 以期为深入理解 EDCs 的分子作用机制, 推进化合物的内分泌干扰风险评估提供参考。

关键词: 内分泌干扰物; 核受体; 同源二聚体; 异源二聚体; 转录机制; 荧光共振能量转移; 双分子荧光互补

文章编号: 1673-5897(2021)4-017-15 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Review on the Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Dimerization of Nuclear Receptors

Huang Fuyan, Chen Qinchang, Tan Haoyue, Guo Jing, Yu Nanyang*, Shi Wei, Yu Hongxia

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Received 5 November 2020 accepted 29 December 2020

Abstract: Many environmental chemicals can mediate nuclear receptor (NR), causing endocrine disrupting effects on human. Endocrine disrupting chemicals (EDCs) can bind NR as a ligand by imitating or antagonizing natural hormones to form NR-ligand complex. The complex as homodimer or heterodimer in the nucleus, ultimately regulating transcription activity through the recruitment of coregulators. At present, studies on EDCs mainly focus on the process of NR-ligand binding, while few concentrate on nuclear receptor dimerization. The dimerization of NR

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1801604, 2018YFC1801503); 国家自然科学基金面上项目(21577058); 江苏省优秀青年基金资助项目(BK20170077); 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07202-001, 2017ZX07602-002)

第一作者: 黄付晏(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为计算毒理学, E-mail: hfuyan2332@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yuny@nju.edu.cn

plays a decisive role in transcription activity, and blocking the dimerization process will cause transcription inactivation. The effects of EDCs on dimerization of nuclear receptors are different. Only the agonist can promote the homodimerization of androgen receptor (AR), while estrogen receptor (ER) can induce the formation of ER dimer after binding with agonists or antagonists, but the dimerization types are different. Searching ToxCast and Tox21 databases, it is found that up to 227 EDCs can induce dimerization of estrogen receptor (ER). Compared with ER α -ER α homodimer (6.09% ~ 7.38% active rate), EDCs are more likely to induce ER α -ER β heterodimer (11.25% ~ 12.22% active rate) and ER β -ER β homodimer (10.02% ~ 11.69% active rate). EDCs can also differentially induce the formation of heterodimer between other nuclear receptors such as vitamin D receptor (VDR) and retinoid X receptor (RXR). Different dimers are of great significance for studying the physiological correlation of transcription activity of EDCs. Based on the reference chemicals reported by OECD, it is found that there is a better correlation between dimerization activity and transcription activity than NR-ligand binding. In this paper, the effects of EDCs on NR dimerization are summarized from three aspects: the transcription mechanism of NR dimerization mediated by EDCs, the relationship between NR dimerization and transcription activity, and the research methods of NR dimerization, in order to provide reference for an in-depth understanding of the molecular mechanism and the promotion of risk assessment of EDCs.

Keywords: endocrine disrupting chemicals; nuclear receptor; homodimer; heterodimer; transcription mechanism; resonance energy transfer; bimolecular fluorescence complementation

核受体(nuclear receptor, NR)超家族是由天然激素调控的转录因子(transcription factors, TFs),在细胞分化、发育、增殖以及代谢中发挥着重要作用^[1]。环境中存在大量小分子有机化合物,如双酚 A(bisphenol A, BPA)、羟基化多溴联苯醚(hydroxylated polybrominated diphenyl ethers, OH-PBDEs)、多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)、多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)和杀虫剂等,它们会通过模仿或拮抗天然激素,靶向 NR,进而产生内分泌干扰效应,导致不良健康影响^[2-4],这种化合物被称为内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)。EDCs 会导致人类产生严重的生殖发育疾病,如癌症^[5]、心血管疾病^[6]、肥胖^[7]及生殖异常^[8]等。据统计,欧盟 EDCs 相关疾病的治疗费用达到欧盟内部生产总值的 1.28%^[9],美国达到 2.33%^[10]。

有害结局路径(adverse outcome pathway, AOP)的概念被用来描述内分泌干扰效应。当 EDCs 作用于核受体后,会诱导分子启动事件(molecular initiating events, MIEs)的发生,即 EDCs 首先与核受体的配体结合口袋(ligand binding pocket, LBP)相结合,模拟或拮抗内源性激素配体与核受体结合形成核受体-化合物复合物,进而该复合物转移进入细胞核内形成同源二聚体(homodimer)或异源二聚体(heterodimer),结合到 DNA 反应原件(DNA-responsive element, DRE)上,通过招募共激活因子(coactivator,

COA)或共抑制因子(corepressor, COR)启动或抑制转录^[11-12]。MIEs 反映 EDCs 与靶标核受体间的相互作用,其进一步引起细胞层次、器官层次等一系列关键事件(key events, KEs)的变化,最终导致内分泌干扰效应。目前对于 EDCs 分子启动机制的研究主要针对 EDCs 与核受体的结合过程,忽视了其对核受体二聚化过程的影响,而该过程的阻断可直接导致转录失活^[13]。因此,本文从 EDCs 介导的核受体二聚化转录机制、核受体二聚化与转录活性间的关系以及基于活细胞的核受体二聚化研究方法 3 个方面对 EDCs 对核受体二聚化的影响进行了概述。

1 核受体转录机制 (Transcription mechanism of nuclear receptor)

1.1 人类核受体家族

人类存在 48 个核受体(表 1),基于其配体以及二聚化特征可将它们分为 3 类:(1)I 类,也被称为类固醇核受体(steroid nuclear receptor),包括雌激素受体(estrogen receptor, ER)、雄激素受体(androgen receptor, AR)等。类固醇核受体主要以同源二聚体结构调控下游的转录过程^[14-15]。其中,ER 存在 2 种亚型,ER α 和 ER β ,可分别形成 ER α 同源二聚体、ER β 同源二聚体和 ER α -ER β 异源二聚体调节转录^[16]。(2)II 类,也被称为非类固醇核受体(non-steroid nuclear receptors),包括甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor α/β , TR α/β)、维甲酸受体(retinoic acid

receptor $\alpha/\beta/\gamma$, RAR $\alpha/\beta/\gamma$)以及组成型雄烷受体(constitutive androstane receptor, CAR)、类法尼醇 X 受体(farnesoid X receptor α/β , FXR α/β)等。该类核受体主要与维甲酸 X 受体(retinoid X receptor $\alpha/\beta/\gamma$, RXR $\alpha/\beta/\gamma$)形成异源二聚体调节下游基因的转录表达,如 RAR-RXR^[17]、FXR-RXR^[18]和 CAR-RXR^[19]等。(3) III类,也被称为孤儿核受体,其内源性配体还未发现或一部分核受体不存在配体,包括小异二聚体伴侣(short heterodimeric partner, SHP)、睾丸受体(testicular orphan receptor 2/4, TR2/4)等。这类核受体多数可以以单体或同源二聚体的形式结合各自的 DRE 来调节转录的表达。特别地, NR 相关因子(nur-related factor 1, NURR1)可与 RXR 形成异源二聚体,并能被 RXR 配体结合激活,进而调节转录过程^[20-24]。

1.2 核受体二聚体

已发表的大量结构化和功能化数据证实,核受体的 DNA 结合域(DNA binding domain, DBD)和配体结合域(ligand binding domain, LBD)与二聚过程高度相关^[25]。由于 DBD 贡献的二聚化界面很小^[26],而 LBD 贡献很大的二聚化界面,能够提供更大的二聚体稳定性,因此人们普遍认为 LBD 对二聚过程存在决定性的作用^[27]。

1.2.1 典型核受体二聚体

核受体主要以同源二聚体或异源二聚体的形式调节转录。表 1 中 3 种类型的同源二聚体或与 RXR 形成的异源二聚体形式被认为是典型二聚体(typical dimers)^[28]。部分典型异源二聚体存在的一个固有特征是既可被自身配体直接激活,又可被 RXR 的配体介导激活。因此,基于此特性可将典型异源二聚体进一步分为 2 类,第 1 类可被自身配体或者 RXR 配体激活,第 2 类只能被自身配体激活而 RXR 沉默^[29-30]。特别地,对于第 1 类异源二聚体而言,如 PPAR, CAR 和 LXR,当核受体自身的内源配体和伴侣 RXR 的配体同时存在时能产生协同效应^[31]。

通过结晶实验,大部分典型核受体二聚体已有基于 LBD 的二聚体结晶结构(<https://www.rcsb.org/>)。通过对不同核受体二聚化晶体结构进行研究,我们发现不同核受体产生的二聚体构象之间存在显著差异(图 1)。

1.2.2 典型核受体二聚体的构象差异

多数典型核受体二聚体会由每个单体(monomer)的第 9 号 α 螺旋链(Helix 9)、第 10 号 α 螺旋链(Helix 10)和 11 号 α 螺旋链(Helix 11)互相接触构成

二聚化界面(图 1(a)、(b)和(c)),这种被称为经典二聚体结构^[32-34]。有趣的是,一些核受体如 AR、糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)、盐皮质激素受体(mineralocorticoid receptor, MR)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)等的二聚化方式与这种经典的二聚体完全相反(图 1(d)和(e))^[35-37],呈现出 2 个单体的 5 号 α 螺旋链(Helix 5)头对头的松散型二聚体构型。根据欧洲蛋白数据库(EMBL-EBI)的 PDBePISA 模块(<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>)提供的核受体界面信息发现,经典结构的二聚化界面能贡献更大的界面面积以及更多的相互作用。如 ER α -ER α 同源二聚体拥有高达 14.561 nm² 的二聚化界面面积, RAR-RXR 和 CAR-RXR 异源二聚体界面面积分别达到 11.963 nm² 和 12.112 nm²,而 AR-AR、GR-GR 同源二聚体界面面积分别只有 10.003 nm² 和 8.095 nm²。氢键(hydrogen bonds)和疏水相互作用(hydrophobic interactions)是形成二聚界面的 2 种主要作用力。对氢键进行分析发现,经典二聚体构型,如 ER α -ER α 同源二聚体、RAR-RXR 和 CAR-RXR 异源二聚体界面氢键数分别达到 10、19 和 12 个,而松散型二聚体 AR-AR、GR-GR 同源二聚体界面氢键只有 5 个,氢键数目越多表明界面相互作用越强。而界面溶剂化自由能(solvation free energy, ΔG)越负,表明核受体二聚体界面的疏水接触越多,通过对多种二聚体的 ΔG 分析发现,不同核受体产生的同种类型的二聚化构型之间也存在明显的差异性。例如,对于结构紧密的经典型二聚体, ER-ER 同源二聚体界面 ΔG 为 -59.9 kJ·mol⁻¹,具有很强的疏水相互作用,而 CAR-RXR 异源二聚体界面 ΔG 只有 -14.2 kJ·mol⁻¹。而对于结构松散型二聚体, GR-GR 同源二聚体界面 ΔG 达到 -46.9 kJ·mol⁻¹, AR-AR 同源二聚体界面只有 -12.1 kJ·mol⁻¹(图 1 和表 2)。

1.2.3 非典型异源二聚体

除了与 RXR 伴侣生成典型核受体异源二聚体以外,有大量研究表明,存在非典型异源二聚体(atypical heterodimer),即核受体并不与 RXR 伴侣异源结合形成二聚,如 AR-GR^[38]、GR-MR^[39]、GR-PPAR^[40]、ER-AR^[41]、ER-GR^[42]和 PPAR-ERR^[43]等。这些非典型异源二聚体不像典型异源二聚体结构被详细解析,并且可能局限于特定的细胞类型和体内生理条件,具有寿命短、瞬时性等特点,但其短暂的存在仍可能会对靶细胞或组织中基因表达产生强烈影响。因此,

表 1 人类核受体家族
Table 1 Human nuclear receptor family

分类 Classification	通用名称 Common name	通用缩写 Common abbreviation	统一命名 Unified nomenclature	配体 Ligand
类固醇核受体 Steroid nuclear receptors	雄激素受体 Androgen receptor	AR	NR3C4	雄激素 Androgens
	雌激素受体 Estrogen receptor (α, β)	ER (α, β)	NR3(A1, A2)	雌激素 Estrogens
	糖皮质激素受体 Glucocorticoid receptor	GR	NR3C1	糖皮质激素 Glucocorticoids
	盐皮质激素受体 Mineralocorticoid receptor	MR	NR3C2	盐皮质激素 Mineralocorticoids
	孕激素受体 Progesterone receptor	PR	NR3C3	孕酮 Progesterone
	维甲酸受体(RAR) Retinoic acid receptor (RAR) (α, β, γ)	RAR (α, β, γ)	NR1(B1, B2, B3)	维甲酸 Retinoic acids
	甲状腺激素受体 Thyroid hormone receptor (α, β)	TR (α, β)	NR1(A1, A2)	甲状腺激素 Thyroid hormones
	维生素 D 受体 Vitamin D receptor	VDR	NR1H	维生素 D3 Vitamin D3
	组成型雄激素受体 Constitutive androstane receptor	CAR	NR1B	外源性异源物 Xenobiotics
	肝细胞核因子 4 Hepatocyte nuclear factor-4 (α, γ)	HNF-4 (α, γ)	NR2(A1, A2)	脂肪酸 Fatty acids
非类固醇核受体 Non-steroid nuclear receptors	肝 X 受体 Liver X receptor (α, β)	LXR (α, β)	NR1(H3, H2)	氧化性胆固醇 Oxysterols
	过氧化物酶体增殖因子活化受体 Peroxisome proliferator-activated receptor (α, γ, δ)	PPAR (α, γ, δ)	NR1(C1, C2, C3)	脂肪酸 Fatty acids
	类法尼醇 X 受体 Farnesoid X receptor (α, β) ^a	FXR (α, β)	NR1(H4, H5)	胆汁酸 Bile acids
	肝核受体类似物-1 Liver receptor homolog-1	LRH-1	NR5A2	磷脂质 Phospholipids
	维甲酸 X 受体 Retinoid X receptor (α, β, γ)	RXR (α, β, γ)	NR2(B1, B2, B3)	9-顺式视黄酸 9-cis retinoic acid
	孕烷 X 核受体 Pregnane X receptor	PXR	NR1I2	内源性和外源性异源物 Endobiotics and xenobiotics
	雌激素相关受体 Estrogen related receptor (α, β, γ)	ERR (α, β, γ)	NR3(B1, B2, B3)	-
	维甲酸相关受体 RAR-related orphan receptor (α, β, γ)	ROR (α, β, γ)	NR1(F1, F2, F3)	-
	鸡卵清蛋白上游启动子转录因子 Chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (I, II, III)	COUP-TF (I, II, III)	NR2(F1, F2, F6)	-
	X 染色体上剂量敏感的性别转换综合征和先天性肾上腺发育不良的关键基因-1 Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1	DAX-1	NR0B1	-
孤儿核受体 Orphan nuclear receptors	生殖细胞核因子 Germ cell nuclear factor	GCNF	NR6A1	-
	神经生长因子诱导基因 B Nerve-growth-factor-induced gene B	NGF1-B	NR4A1	-
	神经元衍生的孤儿核受体 1 Neuron-derived orphan receptor 1	NOR-1	NR4A3	-
	核受体相关因子 1 Nur-related factor 1	NURR1	NR4A2	-
	感光细胞特异性核受体 Photoreceptor-cell-specific nuclear receptor	PNR	NR2E3	-
	Reverse-ERB (α, β)	REV-ERB (α, β)	NR1(D1, D2)	-
	类固醇生成因子-1 Steroidogenic factor-1	SF-1	NR5A1	-
	小异二聚体伴侣受体 Short heterodimeric partner	SHP	NR0B2	-
	睾丸核受体 Testicular orphan receptor (2, 4)	TR (2, 4)	NR2(C1, C2)	-
	Taiuss 样蛋白 Tailless homolog orphan receptor	TLX	NR2E1	-

注: FXR β 在人体中为假基因^[24]。
Note: FXR β exists as a pseudogene in humans^[24].

非典型核受体异源二聚体的生理相关性识别对配体调节核受体作用的现有知识提出了挑战^[28]。

1.3 核受体二聚体转录机制

3 类核受体经过二聚后会产生 3 类转录机制, 具体如下:

I 类: 类固醇核受体通常以单体形式或与伴侣蛋白(chaperones/cochaperones)形成复合体稳定存在于细胞质中, 但在配体结合后, 分子伴侣解离, 核受体-配体复合物转移到细胞核中^[44](以 GR 为例, 图 2 (a))。值得注意的是, 一些核受体(如 AR、GR 和 MR)

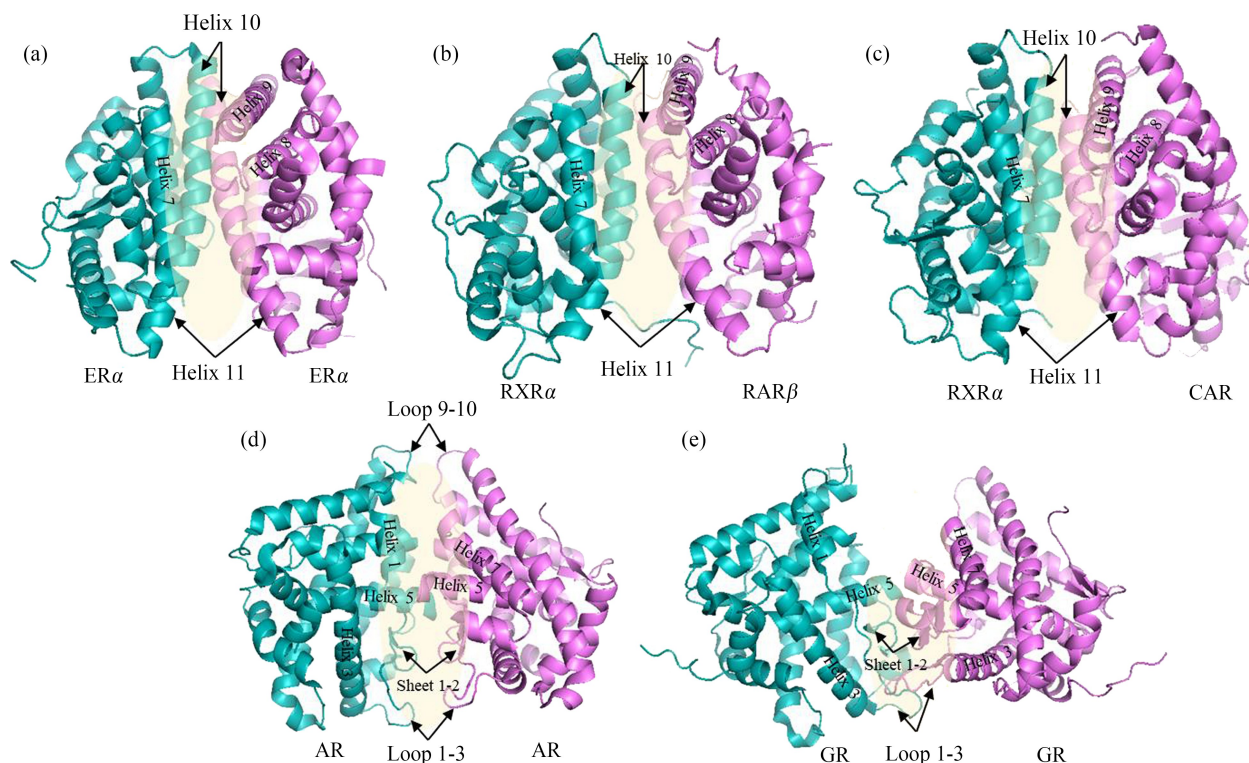


图 1 部分核受体二聚体结构

注: (a)ER α -ER α 同源二聚体, PDB ID: 1GWR; (b)RXR α -RAR β 异源二聚体, PDB ID: 1XDK; (c)CAR-RXR α 异源二聚体, PDB ID: 1XV9; (d)AR-AR 同源二聚体, PDB ID: 5JJM; (e)GR-GR 同源二聚体, PDB ID: 1M2Z; 阴影部分为二聚化界面, 参与二聚化界面的 α 螺旋由箭头标出, 其中(a)、(b)、(c)二聚体中 10 号和 11 号 α 螺旋链在图中位于一条螺旋上, C 末端为 11 号 α 螺旋链, N 末端为 10 号 α 螺旋链。

Fig. 1 Some dimer structures of nuclear receptors

Note: (a) ER α -ER α homodimer, PDB ID: 1GWR; (b) RXR α -RAR β heterodimer, PDB ID: 1XDK; (c) CAR-RXR α heterodimer, PDB ID: 1XV9; (d) AR-AR homodimer, PDB ID: 5JJM; (e) GR-GR homodimer, PDB ID: 1M2Z; the shaded part is the dimerization interface, and the α helices participating in the dimerization interface are marked by arrows; the Helix 10 and Helix 11 in (a), (b) and (c) are located in one helix in the figure, with the Helix 10 at the N-terminal and the Helix 11 at the C-terminal.

表 2 部分核受体二聚化界面参数

Table 2 Interface parameters of dimerization of partial nuclear receptors

PDB ID	二聚体形式 Dimer format	二聚界面面积/nm ² Dimer interface area/nm ²	溶剂化自由能 (Δ)/(kJ·mol ⁻¹) Solvation free energy (Δ)/(kJ·mol ⁻¹)	氢键个数 Number of H-bonds	二聚界面氨基酸个数 Number of dimer interface residues
1M2Z	GR-GR	8.095	-46.9	5	47
5JJM	AR-AR	10.003	-12.1	5	66
1GWR	ER α -ER α	14.561	-59.9	10	78
1XDK	RXR α -RAR β	11.963	-28.9	19	71
1XV9	CAR-RXR α	12.112	-14.2	12	79

必须在配体结合后才能与分子伴侣解离以转移到细胞核中,而一些核受体(如 ER、PR)可在无配体结合情况下转移到细胞核中^[45-46]。进入细胞核后,这类核受体会形成同源二聚体,与其 DRE 结合,该反应元件为反向完全或不完全回文结构,后通过招募共激活因子或共抑制因子以促进或抑制转录^[47]。

Ⅱ类:非类固醇核受体,这种核受体通常和 RXR 形成异源二聚体,不管是否存在激活配体,均

存在于细胞核中。无配体结合时与共抑制因子形成复合物,激活配体结合后,共抑制因子解离,与共激活因子结合^[48]。这种与 RXR 形成的异源二聚体结合的 DRE 为直接重复结构^[49](以 RAR 为例,图 2(b))。

Ⅲ类:孤儿核受体,这种核受体无激活配体时存在于细胞核中,其作用机制与第Ⅱ类核受体一致,区别就是该类核受体可自身形成同源二聚体与直接重复结构的 DRE 结合^[50](以 VDR 为例,图 2(c))。

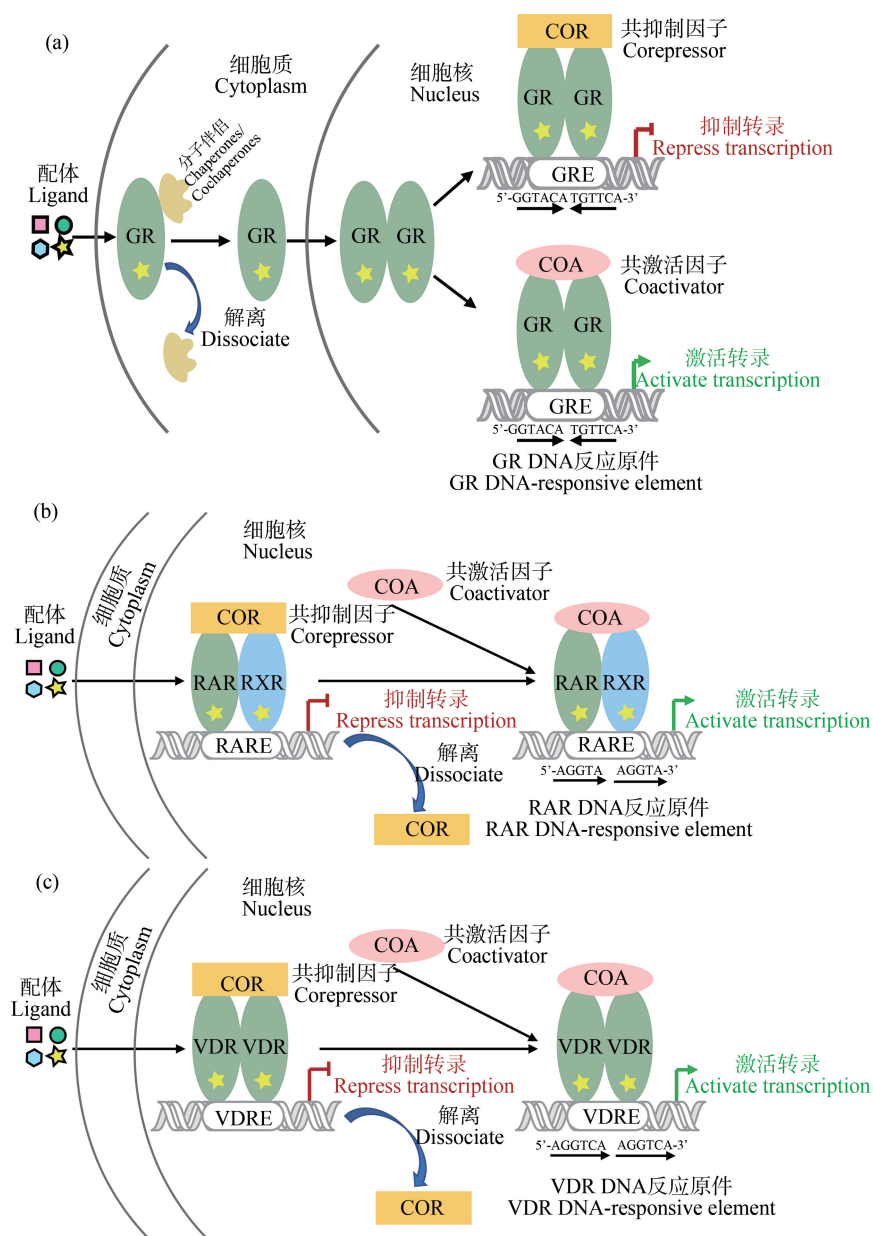


图2 核受体转录机制

注:(a)GR-GR 同源二聚体转录机制;(b)RAR-RXR 异源二聚体转录机制;(c)VDR-VDR 同源二聚体转录机制。

Fig. 2 Transcription mechanism of nuclear receptor

Note: (a) Transcription mechanism of GR-GR homodimer; (b) Transcription mechanism of RAR-RXR heterodimer; (c) Transcription mechanism of VDR-VDR homodimer.

2 内分泌干扰物对核受体二聚的影响 (Effect of endocrine disruptors on dimerization of nuclear receptors)

已经有大量研究表明,EDCs与核受体的竞争结合过程和共因子招募过程对核受体最终的转录活动存在关键性作用^[51-52]。但现有研究大都仅通过上述2个过程解释内分泌干扰活性存在假阴性或假阳性的结果^[53](<https://actor.epa.gov/edsp21/>),而有研究表明在考虑核受体的二聚过程后能够降低这种误差^[54]。因此,研究内分泌干扰物对于核受体二聚化作用的影响对于完善核受体介导的内分泌干扰事件的分子机制以及准确评估内分泌干扰物的效应具有重要意义。

2.1 内分泌干扰物可引起核受体不同形式的二聚化

通过检索ToxCast和Tox21数据库中体外实验的结果,发现针对ER做了比较完善的研究,包括化学物质对ER竞争结合(NVS_NR_hER)和ER二聚化的测定,其中对ER二聚化的测定包括ER α -ER α 同源二聚体(OT_ER_ERaERa_0480、OT_ER_ERaERa_1440)、ER α -ER β 异源二聚体(OT_ER_ERaERb_0480、OT_ER_ERaERb_1440)以及ER β -ER β 同源二聚体(OT_ER_ERbERb_0480、OT_ER_ERbERb_1440)。数据库中有多达227种EDCs物能够影响ER二聚化(表3)。

不管在激动剂配体还是拮抗剂配体存在的条件下,ER都可进行二聚化^[27]。然而,配体所诱导ER二聚化的类型是不同的,相比于ER α -ER α 同源二聚体(6.09%~7.38%的活性率),EDCs更易诱导ER α -

ER β 异源二聚体(11.25%~12.22%的活性率)和ER β -ER β 同源二聚体(10.02%~11.69%的活性率)(表3)。而有研究表明ER α 和ER β 在调节雌激素作用中起相反作用,ER α -ER α 同源二聚体促进激素依赖的乳腺癌细胞增殖,ER β -ER β 同源二聚体对其起抑制作用,而ER α -ER β 异源二聚体在生物体中的作用尚不清楚^[55-56]。Powell和Xu^[56]发现植物雌激素染料木黄酮(genistein)、甘草黄素(liquiritigenin)可选择性诱导ER α 同源二聚体、ER β 同源二聚体和ER α -ER β 异源二聚体的产生,Coriano等^[55]研究了12种黄酮化合物对于ER二聚体的差异性诱导。

一些研究也表明EDCs能够诱导其他核受体不同类型的二聚体形式。Depoix等^[57]研究发现维生素D能够促进VDR与RXR的异源二聚。Putchan等^[58]研究发现了甲状腺激素(3,5,3'-triiodothyronine, T3)和维甲酸(9-cis retinoic acid)在诱导TR-RXR异源二聚体间的负协同作用。Collingwood等^[59]证明甲状腺激素能够促进TR β 和RXR的异源二聚。研究EDCs对不同类型二聚体的诱导对于研究内分泌干扰物转录活性的生理学相关性具有重要意义。

2.2 二聚体与转录激活的关系

分析OECD报告(Series on Testing and Assessment No. 309; <http://www.oecd.org/officialdocuments>)中具有体外(*in vitro*)和体内(*in vivo*)雌激素活性的14种参考化学品,其体外和体内活性数据来自美国环境保护局(US Environmental Protection Agency, US EPA)开展的EDCs筛选项目(Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP)中第一阶段测试(Tier 1)的

表3 针对雌激素受体的Toxcast和Tox21体外竞争结合和二聚化测试结果

Table 3 *In vitro* ligand binding and dimerization test results of ToxCast and Tox21 for estrogen receptor

终点 Endpoint	实验代码 Assay ID	测试 Tested	非活性 Inactive	活性 Active	活性率/% Active rate/%
配体结合 Ligand binding	NVS_NR_hER	2 911	2 669	242	8.31
	OT_ER_ERaERa_0480	1 857	1 720	137	7.38
二聚化 Dimerization	OT_ER_ERaERa_1440	1 857	1 744	113	6.09
	OT_ER_ERaERb_0480	1 857	1 630	227	12.22
	OT_ER_ERaERb_1440	1 857	1 648	209	11.25
	OT_ER_ERbERb_0480	1 857	1 640	217	11.69
	OT_ER_ERbERb_1440	1 857	1 671	186	10.02

注:NVS_NR_hER测定竞争结合活性,OT_ER_ERaERa_0480和OT_ER_ERaERa_1440测定ER α -ER α 同源二聚体活性,OT_ER_ERaERb_0480和OT_ER_ERaERb_1440测定ER α -ER β 异源二聚体活性,OT_ER_ERbERb_0480和OT_ER_ERbERb_1440测定ER β -ER β 同源二聚体活性。

Note: NVS_NR_hER for competitive binding activity, OT_ER_ERaERa_0480 and OT_ER_ERaERa_1440 for ER α -ER α homodimer activity, OT_ER_ERaERb_0480 and OT_ER_ERaERb_1440 for ER α -ER β heterodimer activity, OT_ER_ERbERb_0480 and OT_ER_ERbERb_1440 for ER β -ER β homodimer activity.

体外试验和体内子宫营养试验。将参考化学品的活性数据和 Toxcast 和 Tox21 数据库中数据对比研究发现,对于雌二醇、雌酮、己烯雌酚、5 α -二氢睾酮、双酚 A、双酚 B、壬基酚、甲氧氯和滴滴涕等 14 种参考化学品,具有 100% 的二聚活性,但只有 85.7% 具有竞争结合活性(表 4)。4-壬基酚、2,4'-滴滴涕这 2 种物质,其同时具有体外和体内雌激素活性,但不具有竞争结合活性,由此来看通过竞争结合活性预测化学物质活性存在假阴性,结合二聚活性能够更好地

预测 ER 雌激素活性。Delfosse 等^[60]在研究双酚 A (bisphenol A, BPA)、双酚 C(bisphenol C, BPC)和双酚 AF(bisphenol AF, BPAF)的雌激素效应的过程中发现,ER α 同源二聚体晶体中两边单体内 BPA 的结合模式与天然雌激素雌二醇(estradiol, E2)类似,BPC 的结合模式与抗雌激素他莫昔芬(tamoxifen, OHT)类似,有趣的是 BPAF 在 2 个单体中的结合模式相反,一个类似 E2,另一个类似 OHT,这种差异可能表明不同的配体对于核受体二聚化的变构调节,从

表 4 参考化学品的体外、体内雌激素活性及其二聚活性

Table 4 Dimerization activity of reference chemicals and its estrogen activity *in vitro* and *in vivo*

CASRN	化合物名称 Chemical name	体外活性 <i>In vitro</i> activity	体内活性 <i>In vivo</i> activity	NVS	OT_ER	OT_ER	OT_ER	OT_ER	OT_ER	OT_ER
				_NR _hER	_ERaERa _0480	_ERaERa _1440	_ERaERb _0480	_ERaERb _1440	_ERbERb _0480	_ERbERb _1440
57-91-0	17 α -雌二醇 17alpha-estradiol	中 Moderate	活性 Active	10.02	7.65	7.58	7.69	7.64	8.06	8.04
57-63-6	炔雌醇 17alpha-ethinylestradiol	强 Strong	活性 Active	10.18	7.77	7.38	7.95	7.68	7.64	7.58
50-28-2	17 β -雌二醇 17beta-estradiol	强 Strong	活性 Active	10.52	7.60	7.62	7.79	7.71	8.06	8.11
140-66-9	4-叔辛基苯酚 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol	中 Moderate	活性 Active	5.47	5.49	5.33	5.65	5.55	6.14	5.89
599-64-4	4-枯酚 4-cumylphenol	弱 Weak	活性 Active	6.07	5.03	5.02	5.62	5.10	5.59	5.65
104-40-5	4-壬基酚 4-nonylphenol	极弱 Very weak	活性 Active	0.00	4.64	4.87	4.86	4.71	4.99	4.92
521-18-6	5 α -二氢睾酮 5alpha-dihydrotestosterone	弱 Weak	活性 Active	7.06	4.68	4.71	5.10	4.88	5.27	5.16
80-05-7	双酚 A Bisphenol A	弱 Weak	活性 Active	6.64	5.24	5.36	6.49	6.32	6.42	6.46
77-40-7	双酚 B Bisphenol B	弱 Weak	活性 Active	6.57	5.74	5.85	6.60	6.63	6.99	6.84
56-53-1	己烯雌酚 Diethylstilbestrol	强 Strong	活性 Active	10.12	7.93	7.51	7.65	7.66	8.28	8.09
53-16-7	雌酮 Estrone	中 Moderate	活性 Active	8.81	6.68	6.79	7.07	7.13	7.35	7.32
446-72-0	金雀异黄素 Genistein	弱 Weak	活性 Active	7.90	5.51	5.59	6.10	6.33	7.09	7.01
72-43-5	甲氧氯 Methoxychlor	极弱 Very weak	活性 Active	5.22	4.95	5.40	5.02	5.40	5.28	5.46
789-02-6	2,4'-滴滴涕 <i>o,p'</i> -DDT	弱 Weak	活性 Active	0.00	5.35	5.26	5.80	5.61	5.68	5.70

注:参考化学品体外和体内活性数据来自美国环境保护局开展的 EDCs 筛选项目中第一阶段测试的体外试验和体内子宫营养试验;竞争结合和二聚化数据来自 Toxcast 和 Tox21 数据库(数值为半数效应浓度的对数值, $\log(\text{EC}_{50}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}))$)。

Note: *In vitro* and *in vivo* activity results of reference chemicals from *in vitro* assay and *in vivo* uterotrophic assay performed under the EDCs Screening Program Tier 1 conducted by the US Environmental Protection Agency; competitive binding and dimerization data were from the Toxcast and Tox21 databases (The value is the logarithmic value of the median effect concentration, $\log(\text{EC}_{50}/(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}))$).

而为药物设计提供了新的视角。同源二聚体的2个单体之间存在调节串扰,配体与一个单体的结合会调节二聚体中另一个单体的构象^[61]。Judson等^[62]使用包含ER配体结合、二聚化、转录激活和细胞增殖测定等在内的16个体外测试开发模型以预测1811种化学物质的雌激素活性,发现基于至少4~7个体外实验的亚组的预测准确性和16个测试建立的模型相当,这些亚组模型的主要区别在于采用的二聚化测定结果不同。

Nadal等^[35]测试了配体对于诱导AR二聚化的影响,发现激动物质能够诱导AR二聚化,拮抗物质则不能。Depoix等^[57]研究发现RAR激动剂能够显著增加RAR-RXR的异源二聚,而RAR拮抗剂能够抑制RAR-RXR的异源二聚。核受体二聚化与其转录活性的显著相关性表明在预测EDCs诱导核受体转录活性时必须考虑其对核受体二聚化的影响。

除了配受体结合、共因子招募这2个过程,考虑核受体二聚化过程对于研究内分泌干扰效应的产生至关重要。然而目前有关EDCs对核受体二聚化的影响,只对ER进行了相对比较完善的研究,包括EDCs对于2种亚型(ER α 和ER β)各自的同源二聚体以及其一起形成的异源二聚体的影响。但EDCs对于其他核受体同源或者异源二聚体形成的影响研究相对较少,且主要集中研究各自的内源性配体化合物或者相关药物,今后可加强研究EDCs对除ER以外的其他核受体的二聚化影响。

3 核受体二聚化的研究方法 (Research methods of nuclear receptor dimerization)

检测同源或异源二聚体间蛋白-蛋白相互作用对于揭示核受体调控机制至关重要。目前,研究蛋白-蛋白相互作用的实验种类繁多,如基于蛋白结构解析的核磁共振(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)实验和X射线衍射(X-ray)实验,该类方法条件严格且价格昂贵^[63];基于蛋白的免疫共沉淀技术(co-immunoprecipitation, co-IP)和蛋白质微阵列技术(protein microarrays),操作过程繁杂,无法检测到瞬时作用,且无法在活细胞中测定^[64];另一种经典的测试技术是酵母二杂交或三杂交(Y2H/Y3H)试验,由于其简单易用,该体内技术被广泛用于大规模检测蛋白-蛋白相互作用,然而Y2H/Y3H常因酵母细胞中异种基因的表达而产生假阳性或假阴性结果^[65]。为了克服以上缺陷,开发了一系列体内检测

技术用于检测活细胞中的蛋白-蛋白相互作用,如荧光共振能量转移技术(fluorescence resonance energy transfer, FRET)、生物发光共振能量转移技术(bioluminescence resonance energy transfer, BRET)和生物分子荧光互补技术(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)等,这些技术克服了非活体状态分析蛋白间相互作用的局限性^[66],研究活细胞内核受体二聚化的形成对包括信号传导和转录调节在内的多种细胞过程具有重要意义^[56]。然而,由于体外细胞筛选大量的干扰物费时费力,计算机辅助的核受体二聚化研究应运而生。

3.1 荧光共振能量转移(FRET)

FRET技术的供体分子(donor)和受体分子(receptor)均为荧光蛋白(fluorescent protein, FP,如YFP),其分别偶联2个目标蛋白,当供体和受体分子间距离 <10 nm时,处于激发态的供体荧光团通过偶极子间的相互作用将能量以非辐射的方式转移给邻近的受体分子,即产生能量转移^[67](图3(a))。

Feige等^[68]利用FRET研究发现PPAR在没有配体的情况下很容易与RXR形成异源二聚体。Tamrazi等^[27]以位点特异性方式用单个荧光团对ER进行化学标记,基于FRET测量ER α -LBD二聚体的热力学和动力学稳定性,并将该方法用于评估ER配体的激动剂和拮抗剂活性。Schaufele等^[69]利用FRET研究了分别用CFP和YFP标记的AR二聚体的形成,发现AR的二聚化只发生在小分子配体结合后,并主要在细胞核内。Nadal等^[35]利用FRET测试了配体对于诱导AR二聚化的影响,发现激动物质能够诱导AR二聚化,拮抗物质则不能。Yoshimura等^[70]将磷酸化突变体RXR α (YFP-T82D/S260D-RXR α)与CFP-RAR β 共转染于HEK293T细胞,在细胞核中检测到的FRET信号非常低,而未磷酸化的RXR α (YFP-T82A/S260A-RXR α)与CFP-RAR β 转染后的FRET效率与野生型RXR α 相当,表明磷酸化的RXR α 丧失了与RXR β 异源二聚化的能力。

FRET具有高灵敏性和特异性,能够提供NR相互作用的位置信息,并且能够和显微镜、色谱技术等多种仪器和技术结合使用^[71]。但是FRET需要一对FP分别作为供体蛋白和受体蛋白,目前可用于FRET的供-受体对存在光漂白的缺陷,即供体的发射光谱和受体吸收光谱有明显的重叠^[72-73]。

3.2 生物发光共振能量转移(BRET)

与FRET不同,BRET利用生物发光酶如海肾

萤光素酶(*renilla reniformis luciferase*, Rluc)作为供体分子,荧光蛋白作为受体分子,当两者之间距离 <10 nm时,供体分子在底物如腔肠素(coelenterazine)的催化下发光并将能量转移给受体^[73](图3(b))。

Mulero 等^[74]利用 BRET 技术检测 PPAR-RXR 异源二聚体的形成。Powell 和 Xu^[56]利用 BRET 技术证明植物雌激素可选择性诱导 ER α 同源二聚体、ER β 同源二聚体和 ER α -ER β 异源二聚体的产生,由于不同二聚体的功能差异显著,使得该方法可用于 ER 二聚体选择性的雌激素类物质筛选。Grossmann 等^[75]利用 BRET 研究 MR 同源二聚过程,发现二聚化发生在热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)解离以及核转移之后。Giner 等^[76]优化了 BRET 方法,可直接测定核受体二聚体对 COA 的募集,通过比较了维甲酸类物质(rexinoids)诱导的 RXR-RXR 同源二聚体、Nur77-RXR 异源二聚体和 Nurrl-RXR 异源二聚体对 COA 的募集发现不同的同源和异源二聚体显示出对 COA 的差异性募集活性。Cotnoir-White 等^[77]在 BRET 的基础

上开发了一种在活细胞中检测三元复合物的方法,即生物发光共振能量转移与荧光增强的联合转移(bioluminescence resonance energy transfer with fluorescence enhancement by combined transfer, BRETfect),并用该方检测 E2、OHT 等配体诱导的 ER α -ER α 同源二聚体与 ER α -ER β 异源二聚体对 COA 的募集。

BRET 不需要激发源,利用化学供体底物,背景荧光值可忽略不计,避免了 FRET 可能产生的光漂白问题,减少假阴性结果^[56]。但 BRET 需要特定设备,且荧光素及底物价格昂贵,无法对比较弱的核受体间蛋白相互作用进行检测^[73,78]。

3.3 双分子荧光互补(BiFC)

BiFC 是最通用的蛋白质互补分析(protein-fragment complementation assays, PCA)技术,其原理是将 FP 切开形成不发荧光的 2 个片段(N 末端和 C 末端),这 2 个片段分别与目标蛋白融合,如果目标蛋白相互作用,则 2 个互补片段彼此靠得足够近可恢复它们的荧光活性^[78](图 3(c))。

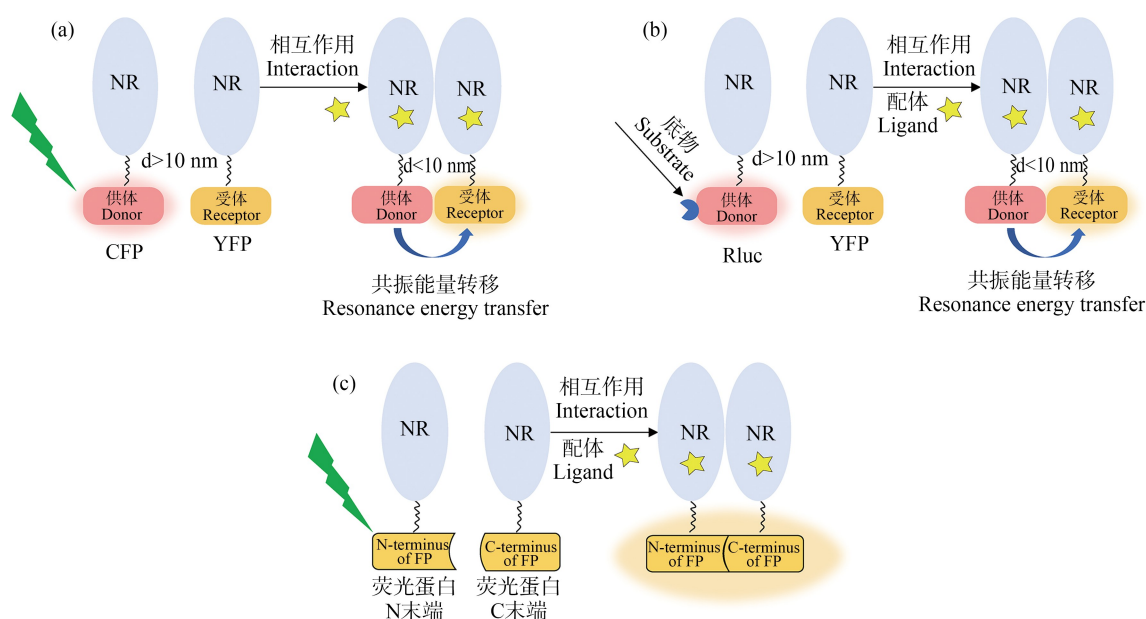


图3 FRET (a)、BRET (b)和 BiFC (c)原理图

注: FRET 中当荧光供体蛋白和荧光受体蛋白间距离 <10 nm 时,供体将能量转移给受体; BRET 利用生物发光酶作为供体分子,荧光蛋白作为受体分子,当两者之间距离 <10 nm 时,供体将能量转移给受体; BiFC 将荧光蛋白切开形成不发荧光的 2 个片段(N 末端和 C 末端),并分别与目标蛋白融合,如果目标蛋白相互作用,则会恢复荧光活性。

Fig. 3 Schematic diagram of FRET (a), BRET (b) and BiFC (c)

Note: FRET indicates that when the distance between the fluorescent donor protein and the fluorescent receptor protein is less than 10 nm, the donor transfers energy to the receptor; BRET uses bioluminescent enzymes as donor and fluorescent protein as receptor; when the distance between them is less than 10 nm, the donor transfers energy to the receptor; BiFC cleaves the fluorescent protein into two fragments (N-terminal and C-terminal) that do not fluoresce, which are fused with the target protein respectively; if the target protein interacts, the fluorescence activity will be restored.

利用 BiFC 将全长的 ER α 分别融合到 YFP 突变体(citrine-YFP)的 N 末端和 C 末端并共转染于 COS-7 细胞,发现 ER α 激动剂 E2、BPA、染料木黄酮和对羟基苯甲酸丁酯(butylparabene),拮抗剂氟维司群(ICI)以及选择性雌激素受体调节剂 4-羟基他莫昔芬(4-OHT)都能剂量依赖性地增加 ER α -ER α 同源二聚体荧光信号;有趣的是,ICI 和 4-OHT 诱导的荧光信号高于 E2,这可能是由于配体诱导的二聚体或构象差异所致^[79]。雄激素受体剪接变异体(AR splice variants, AR-Vs)的表达上升被认为是产生以 AR 为靶点的药物抗药性的重要机制,Xu 等^[80]使用 BiFC 研究了 2 个主要的 AR-Vs,发现它们不仅彼此间发生同源和异源二聚化,而且还与全长雄激素受体异源二聚化,阐明了 AR-V 介导基因调控的机制,并为合理的药物设计提供了重要的途径。Bedi^[81]将 LXR α 贡献二聚化界面的关键氨基酸进行突变,使用 BiFC 表征 LXR α 突变体与 RXR α 和 PPAR α 在活细胞中形成异源二聚体的能力,证明二聚化界面关键氨基酸突变能够削弱二聚化效应。

BiFC 方法简单直观,既可以检测蛋白之间的相互作用,也可以定位相互作用蛋白质的位点,避免了用外源试剂处理细胞可能产生的问题^[82]。但其目标蛋白容易受到 FP 片段的影响,当 2 个目标蛋白包含在单一复合物中但彼此没有相互作用时易产生假阳性结果^[83]。

3.4 计算机模拟

随着计算机技术的发展,分子动力学模拟(molecular dynamics, MD)越来越多地被用来研究生物大分子作用^[84]。但大多数 MD 模拟针对核受体单体进行研究,主要涉及配受体结合过程和共因子招募过程^[51, 85],仅有少部分针对核受体二聚化过程进行模拟研究。

Zhuang 等^[86]利用经典的分子动力学模拟(MD)和随机加速分子动力学(random acceleration molecular dynamics, RAMD)模拟分别研究甲状腺激素 T3 与 TR α -LBD、TR β -LBD 和 TR α /LBD-RXR/LBD 异源二聚体的解离效应,发现相比于 TR 单体,TR 异源二聚体显著影响 T3 的解离,这为研究其他 TR 配体提供了重要信息。Sonoda 等^[87]利用部分增强采样分子动力学模拟(locally enhanced sampling molecular dynamics simulations)分别研究 E2 和雌激素受体调节剂雷洛昔芬(raloxifene, RAL)与 ER α -LBD 单体和 ER α /LBD-ER α /LBD 同源二聚体间的解离机

制,发现相比于 ER 单体,其二聚化强烈抑制 E2 并改变 RAL 的解离路径。模拟研究中配体的解离路径的差异表明二聚化对于配体调节具有重要作用。Chakraborty 等^[88]利用分子动力学模拟证明 ER α -ER α 同源二聚体比 ER α -ER β 异源二聚体更稳定。此外,Fratesi 等^[89]利用加速分子动力学(accelerated molecular dynamics, aMD)模拟研究发现内分泌干扰物配体可以通过二聚体间的相互作用控制 H12 的位置,这对于核受体的激活至关重要。计算机模拟方法因其快速且省时省力等优点,已成为辅助内分泌干扰物质干扰核受体研究的重要手段之一。

4 总结与展望(Conclusions and prospect)

天然激素调控的核受体作为转录调控因子,几乎参与了人体所有组织和器官的功能调节。作为环境化合物的重要干扰靶点,当 EDCs 作用于核受体后,会导致人体内分泌系统紊乱,最终产生不良结局。EDCs 主要通过模仿或拮抗天然激素,与核受体结合并影响核受体的二聚化过程,核受体通过同源或异源二聚后形成多聚体,进一步结合到 DNA 反应原件,通过共调节因子的招募过程最终调控转录活性。在以往研究中,人们主要着眼于受体-配体竞争结合、共调节因子招募以及核受体-DNA 结合过程,但却无法完美解释许多内分泌干扰过程。近几年,越来越多的研究发现,核受体二聚化过程也对 EDCs 的内分泌干扰活性存在决定性的作用。因此,本文就 EDCs 介导的核受体二聚化转录机制、核受体二聚化与转录活性间的关系以及基于活细胞的核受体二聚化研究方法进行了概述,以期为进一步理解内分泌干扰物质的分子机制,推进化合物内分泌干扰风险评估提供参考。

核受体二聚化过程对于研究化合物的内分泌干扰效应至关重要,已有进展主要针对 EDCs 对 ER 二聚化的影响,而关于 EDCs 与其他核受体二聚化过程的研究较少,探究 EDCs 对核受体二聚化的影响道阻且长。核受体二聚化机制复杂,环境领域研究核受体二聚化的过程极其依赖于生命科学技术的发展,但目前生命科学领域对二聚化特别是异源二聚化的作用机制和生物学功能尚不明确。解析核受体二聚化机制涉及很多生命科学相关实验,这对环境领域的研究人员而言困难重重,今后在探究 EDCs 对核受体二聚化影响机制的过程中需加强与生命科学的合作。

然而面对数以万计的未知内分泌干扰活性的环

境污染物,生化实验已经无法对其内分泌干扰活性逐一检测,且利用生化实验进行二聚化测定费时费力费财。随着计算机技术的发展,分子动力学模拟、分子对接等相关技术越来越多地被应用于生物大分子作用的研究中。已有很多计算机辅助的相关技术被用于研究配受体结合和共因子招募过程,但有关内分泌干扰物对核受体二聚化影响的计算机模拟研究相对较少。今后可更多的将计算机技术应用于核受体二聚化过程的研究,并结合配受体结合和共因子招募过程,开发基于分子启动事件的核受体内分泌干扰筛查模型,为绿色化学的开发夯实基础。

通讯作者简介:于南洋(1988—),男,博士,助理研究员,主要研究方向为环境分析化学。

参考文献(References):

- [1] Gronemeyer H, Gustafsson J A, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3(11): 950-964
- [2] Gore A C, Chappell V A, Fenton S E, et al. EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals [J]. *Endocrine Reviews*, 2015, 36(6): E1-E150
- [3] Gore A C, Chappell V A, Fenton S E, et al. Executive summary to EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals [J]. *Endocrine Reviews*, 2015, 36(6): 593-602
- [4] Chen L G, Zhang W P, Hua J H, et al. Dysregulation of intestinal health by environmental pollutants: Involvement of the estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(4): 2323-2330
- [5] Soto A M, Sonnenschein C. Environmental causes of cancer: Endocrine disruptors as carcinogens [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2010, 6(7): 363-370
- [6] Melzer D, Osborne N J, Henley W E, et al. Urinary bisphenol A concentration and risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women [J]. *Circulation*, 2012, 125(12): 1482-1490
- [7] Legler J, Fletcher T, Govarts E, et al. Obesity, diabetes, and associated costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2015, 100(4): 1278-1288
- [8] Mustieles V, Pérez-Lobato R, Olea N, et al. Bisphenol A: Human exposure and neurobehavior [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 49: 174-184
- [9] Trasande L, Zoeller R T, Hass U, et al. Burden of disease and costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union: An updated analysis [J]. *Andrology*, 2016, 4(4): 565-572
- [10] Attina T M, Hauser R, Sathyanarayana S, et al. Exposure to endocrine-disrupting chemicals in the USA: A population-based disease burden and cost analysis [J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2016, 4(12): 996-1003
- [11] Chen Q C, Tan H Y, Yu H X, et al. Activation of steroid hormone receptors: Shed light on the in silico evaluation of endocrine disrupting chemicals [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 631-632: 27-39
- [12] Leduc A M, Trent J O, Wittliff J L, et al. Helix-stabilized cyclic peptides as selective inhibitors of steroid receptor-coactivator interactions [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(20): 11273-11278
- [13] Chakraborty S, Cole S, Rader N, et al. In silico design of peptidic inhibitors targeting estrogen receptor alpha dimer interface [J]. *Molecular Diversity*, 2012, 16(3): 441-451
- [14] Helsen C, Kerkhofs S, Clinckemalie L, et al. Structural basis for nuclear hormone receptor DNA binding [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2012, 348(2): 411-417
- [15] Louw A. GR dimerization and the impact of GR dimerization on GR protein stability and half-life [J]. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 1693
- [16] Iwabuchi E, Miki Y, Ono K, et al. *In situ* detection of estrogen receptor dimers in breast carcinoma cells in archival materials using proximity ligation assay (PLA) [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2017, 165(Pt B): 159-169
- [17] Chandra V, Wu D L, Li S, et al. The quaternary architecture of RAR β -RXR α heterodimer facilitates domain-domain signal transmission [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 868
- [18] Zheng W L, Lu Y, Tian S Y, et al. Structural insights into the heterodimeric complex of the nuclear receptors FXR and RXR [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(32): 12535-12541
- [19] Wang Y M, Ong S S, Chai S C, et al. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism [J]. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, 8(7): 803-817
- [20] Ahmadian M, Suh J M, Hah N, et al. PPAR γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future [J]. *Nature Medicine*, 2013, 19(5): 557-566

- [21] Evans R M, Mangelsdorf D J. Nuclear receptors, RXR, and the big Bang [J]. *Cell*, 2014, 157(1): 255-266
- [22] Manolagas S C, O'Brien C A, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2013, 9(12): 699-712
- [23] Zhou W, Slingerland J M. Links between oestrogen receptor activation and proteolysis: Relevance to hormone-regulated cancer therapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2014, 14(1): 26-38
- [24] Otte K, Kranz H, Kober I, et al. Identification of farnesoid X receptor beta as a novel mammalian nuclear receptor sensing lanosterol [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23(3): 864-872
- [25] Huang W, Peng Y, Kiselar J, et al. Multidomain architecture of estrogen receptor reveals interfacial cross-talk between its DNA-binding and ligand-binding domains [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1): 3520
- [26] Schwabe J W, Chapman L, Finch J T, et al. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: How receptors discriminate between their response elements [J]. *Cell*, 1993, 75(3): 567-578
- [27] Tamrazi A, Carlson K E, Daniels J R, et al. Estrogen receptor dimerization: Ligand binding regulates dimer affinity and dimer dissociation rate [J]. *Molecular Endocrinology*, 2002, 16(12): 2706-2719
- [28] De Bosscher K, Desmet S J, Clarisse D, et al. Nuclear receptor crosstalk-defining the mechanisms for therapeutic innovation [J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2020, 16(7): 363-377
- [29] Forman B M, Umesono K, Chen J, et al. Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors [J]. *Cell*, 1995, 81(4): 541-550
- [30] Kurokawa R, Yu V C, Näär A, et al. Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers [J]. *Genes & Development*, 1993, 7(7B): 1423-1435
- [31] Leblanc B P, Stunnenberg H G. 9-*cis* retinoic acid signaling: Changing partners causes some excitement [J]. *Genes & Development*, 1995, 9(15): 1811-1816
- [32] Gampe R T, Montana V G, Lambert M H, et al. Asymmetry in the PPAR γ /RXR α crystal structure reveals the molecular basis of heterodimerization among nuclear receptors [J]. *Molecular Cell*, 2000, 5(3): 545-555
- [33] Eiler S, Gangloff M, Duclaud S, et al. Overexpression, purification, and crystal structure of native ER alpha LBD [J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 22(2): 165-173
- [34] Takacs M, Petoukhov M V, Atkinson R A, et al. The asymmetric binding of PGC-1 α to the ERR α and ERR γ nuclear receptor homodimers involves a similar recognition mechanism [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67810
- [35] Nadal M, Prekovic S, Gallastegui N, et al. Structure of the homodimeric androgen receptor ligand-binding domain [J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 14388
- [36] Williams S P, Sigler P B. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor [J]. *Nature*, 1998, 393(6683): 392-396
- [37] Bledsoe R K, Madauss K P, Holt J A, et al. A ligand-mediated hydrogen bond network required for the activation of the mineralocorticoid receptor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(35): 31283-31293
- [38] Claessens F, Joniau S, Helsen C. Comparing the rules of engagement of androgen and glucocorticoid receptors [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2017, 74(12): 2217-2228
- [39] Savory J G, Préfontaine G G, Lamprecht C, et al. Glucocorticoid receptor homodimers and glucocorticoid-mineralocorticoid receptor heterodimers form in the cytoplasm through alternative dimerization interfaces [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(3): 781-793
- [40] Deckers J, Bougarne N, Mylka V, et al. Co-activation of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ in murine skin prevents worsening of atopic March [J]. *The Journal of Investigative Dermatology*, 2018, 138(6): 1360-1370
- [41] Panet-Raymond V, Gottlieb B, Beitel L K, et al. Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2000, 167(1-2): 139-150
- [42] Miranda T B, Voss T C, Sung M H, et al. Reprogramming the chromatin landscape: Interplay of the estrogen and glucocorticoid receptors at the genomic level [J]. *Cancer Research*, 2013, 73(16): 5130-5139
- [43] Fan W W, Evans R. PPARs and ERRs: Molecular mediators of mitochondrial metabolism [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 33: 49-54
- [44] Pratt W B, Galigniana M D, Morishima Y, et al. Role of molecular chaperones in steroid receptor action [J]. *Essays in Biochemistry*, 2004, 40: 41-58
- [45] Dull A, Goncharova E, Hager G, et al. Development of an image analysis screen for estrogen receptor alpha (ER α) ligands through measurement of nuclear translocation dynamics [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2010, 122(5): 341-351

- [46] Kil S H, Kalinec F. Expression and dexamethasone-induced nuclear translocation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in Guinea pig cochlear cells [J]. *Hearing Research*, 2013, 299: 63-78
- [47] Nott S L, Huang Y F, Li X D, et al. Genomic responses from the estrogen-responsive element-dependent signaling pathway mediated by estrogen receptor alpha are required to elicit cellular alterations [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(22): 15277-15288
- [48] Tata J R. Signalling through nuclear receptors [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(9): 702-710
- [49] Mangelsdorf D J, Thummel C, Beato M, et al. The nuclear receptor superfamily: The second decade [J]. *Cell*, 1995, 83(6): 835-839
- [50] Gronemeyer H, Moras D. Nuclear receptors. How to finger DNA [J]. *Nature*, 1995, 375(6528): 190-191
- [51] Chen Q C, Wang X X, Tan H Y, et al. Molecular initiating events of bisphenols on androgen receptor-mediated pathways provide guidelines for *in silico* screening and design of substitute compounds [J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2019, 6(4): 205-210
- [52] Chen Q C, Wang X X, Shi W, et al. Identification of thyroid hormone disruptors among HO-PBDEs: *In vitro* investigations and coregulator involved simulations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(22): 12429-12438
- [53] Bhhatara B, Wilson D M, Price P S, et al. Evaluation of OASIS QSAR models using ToxCast™ *in vitro* estrogen and androgen receptor binding data and application in an integrated endocrine screening approach [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2016, 124(9): 1453-1461
- [54] Paul-Friedman K, Martin M, Crofton K M, et al. Limited chemical structural diversity found to modulate thyroid hormone receptor in the Tox21 chemical library [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2019, 127(9): 97009
- [55] Coriano C G, Liu F B, Sievers C K, et al. A computational-based approach to identify estrogen receptor α/β heterodimer selective ligands [J]. *Molecular Pharmacology*, 2018, 93(3): 197-207
- [56] Powell E, Xu W. Intermolecular interactions identify ligand-selective activity of estrogen receptor alpha/beta dimers [J]. *PNAS*, 2008, 105(48): 19012-19017
- [57] Depoix C, Delmotte M H, Formstecher P, et al. Control of retinoic acid receptor heterodimerization by ligand-induced structural transitions. A novel mechanism of action for retinoid antagonists [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 9452-9459
- [58] Putcha B D, Wright E, Brunzelle J S, et al. Structural basis for negative cooperativity within agonist-bound TR: RXR heterodimers [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(16): 6084-6087
- [59] Collingwood T N, Butler A, Tone Y, et al. Thyroid hormone-mediated enhancement of heterodimer formation between thyroid hormone receptor beta and retinoid X receptor [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(20): 13060-13065
- [60] Delfosse V, Grimaldi M, Pons J L, et al. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes [J]. *PNAS*, 2012, 109(37): 14930-14935
- [61] Osz J, Brélivet Y, Peluso-Iltis C, et al. Structural basis for a molecular allosteric control mechanism of cofactor binding to nuclear receptors [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(10): E588-E594
- [62] Judson R S, Houck K A, Watt E D, et al. On selecting a minimal set of *in vitro* assays to reliably determine estrogen agonist activity [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 2017, 91: 39-49
- [63] Gounarides J S, Chen A D, Shapiro M J. Nuclear magnetic resonance chromatography: Applications of pulse field gradient diffusion NMR to mixture analysis and ligand-receptor interactions [J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999, 725(1): 79-90
- [64] Benedetti R, Conte M, Carafa V, et al. Analysis of chromatin-nuclear receptor interactions by laser-chromatin immunoprecipitation [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1204: 25-34
- [65] Li S M, Armstrong C M, Bertin N, et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans* [J]. *Science*, 2004, 303(5657): 540-543
- [66] Cui Y N, Zhang X, Yu M, et al. Techniques for detecting protein-protein interactions in living cells: Principles, limitations, and recent progress [J]. *Science China Life Sciences*, 2019, 62(5): 619-632
- [67] Medintz I L, Mattoussi H. Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology [J]. *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP*, 2009, 11(1): 17-45
- [68] Feige J N, Gelman L, Tudor C, et al. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(18): 17880-17890

- [69] Schaufele F, Carbonell X, Guerbador M, et al. The structural basis of androgen receptor activation: Intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(28): 9802-9807
- [70] Yoshimura K, Muto Y, Shimizu M, et al. Phosphorylated retinoid X receptor alpha loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor beta [J]. Cancer Science, 2007, 98(12): 1868-1874
- [71] Shrestha D, Jenei A, Nagy P, et al. Understanding FRET as a research tool for cellular studies [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(4): 6718-6756
- [72] Hayes S, Malacrida B, Kiely M, et al. Studying protein-protein interactions: Progress, pitfalls and solutions [J]. Biochemical Society Transactions, 2016, 44(4): 994-1004
- [73] Pflieger K D, Eidne K A. Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET) [J]. Nature Methods, 2006, 3(3): 165-174
- [74] Mulero M, Perroy J, Federici C, et al. Analysis of RXR/THR and RXR/PPARG2 heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer (BRET) [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e84569
- [75] Grossmann C, Ruhs S, Langenbruch L, et al. Nuclear shuttling precedes dimerization in mineralocorticoid receptor signaling [J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(6): 742-751
- [76] Giner X C, Cotnoir-White D, Mader S, et al. Selective ligand activity at Nur/retinoid X receptor complexes revealed by dimer-specific bioluminescence resonance energy transfer-based sensors [J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2015, 29(10): 4256-4267
- [77] Cotnoir-White D, El Ezzy M, Boulay P L, et al. Monitoring ligand-dependent assembly of receptor ternary complexes in live cells by BRETfect [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(11): E2653-E2662
- [78] Dragulescu-Andrasi A, Chan C T, De A, et al. Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(29): 12060-12065
- [79] European Society of Endocrinology. Measurement of estrogen receptor alpha homodimerization caused by xenoestrogens using bimolecular fluorescence complementation [R]. Florence, Italy: European Society of Endocrinology, 2012
- [80] Xu D, Zhan Y, Qi Y F, et al. Androgen receptor splice variants dimerize to transactivate target genes [J]. Cancer Research, 2015, 75(17): 3663-3671
- [81] Bedi S. Identification of novel ligands and structural requirements for heterodimerization of the liver X receptor alpha [D]. Dayton: Wright State University, 2017: 206
- [82] Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence [J]. Nature, 2007, 448(7152): 497-500
- [83] Kodama Y, Hu C D. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC): A 5-year update and future perspectives [J]. BioTechniques, 2012, 53(5): 285-298
- [84] Karplus M, McCammon J A. Molecular dynamics simulations of biomolecules [J]. Nature Structural Biology, 2002, 9(9): 646-652
- [85] Li Y, Perera L, Coons L A, et al. Differential *in vitro* biological action, coregulator interactions, and molecular dynamic analysis of bisphenol A (BPA), BPAF, and BPS ligand-ER α complexes [J]. Environmental Health Perspectives, 2018, 126(1): 017012
- [86] Zhuang S L, Bao L L, Linhananta A, et al. Molecular modeling revealed that ligand dissociation from thyroid hormone receptors is affected by receptor heterodimerization [J]. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2013, 44: 155-160
- [87] Sonoda M T, Martinez L, Webb P, et al. Ligand dissociation from estrogen receptor is mediated by receptor dimerization: Evidence from molecular dynamics simulations [J]. Molecular Endocrinology, 2008, 22(7): 1565-1578
- [88] Chakraborty S, Willett H, Biswas P K. Insight into estrogen receptor beta-beta and alpha-beta homo- and heterodimerization: A combined molecular dynamics and sequence analysis study [J]. Biophysical Chemistry, 2012, 170: 42-50
- [89] Fratev F. Activation helix orientation of the estrogen receptor is mediated by receptor dimerization: Evidence from molecular dynamics simulations [J]. Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP, 2015, 17(20): 13403-13420

