

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221115001

吴一凡, 聂青宇, 郑静怡, 等. 孕烷 X 受体双荧光素酶报告基因方法建立及有机磷酸酯阻燃剂的受体激活效应研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(2): 33-43

Wu Y F, Nie Q Y, Zheng J Y, et al. Establishment of a dual luciferase reporter gene assay for pregnane X receptor and study of agonistic activities of organophosphate flame retardants [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(2): 33-43 (in Chinese)

孕烷 X 受体双荧光素酶报告基因方法建立及有机磷酸酯阻燃剂的受体激活效应研究

吴一凡^{1,2,3}, 聂青宇^{1,2,3}, 郑静怡^{1,2,3}, 镇华君^{1,2,3,4,*}, 修光利^{1,2,3,4,#}

1. 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237
2. 上海市环境保护化学污染物环境标准与风险管理重点实验室, 上海 200237
3. 国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室, 上海 200237
4. 上海污染控制与生态安全研究院, 上海 200092

收稿日期: 2022-11-15 录用日期: 2023-01-07

摘要: 孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)是一种调控生物体异源性/内源性物质代谢的核受体。环境污染物可介由 PXR 改变人体代谢稳态进而增加多种代谢性疾病风险,但目前尚缺乏一种灵敏、稳定的检测化学品 PXR 结合活性的体外实验方法。本研究基于重组基因技术构建了带有海肾荧光素酶基因的 pBIND-hPXR 表达质粒,将其与插入上游激活序列的荧光素酶报告基因质粒 GAL4-UAS-Luc 共转染至 HEK 293T 细胞,最终成功建立了一种可筛查化学品孕烷 X 受体激动/拮抗作用的双荧光素酶报告基因检测方法,该方法具有灵敏度高、适用范围广和重复性好的特点。进一步检测了 9 种典型有机磷酸酯(organophosphate esters, OPEs)阻燃剂的 hPXR 激活效应,结果表明芳基类 OPEs 的激活活性强于氯代和烷基类 OPEs,其中磷酸三甲苯酯(TCP)的 20% 最大效应浓度(基于阳性对照)及最大激活效应值和已知的 hPXR 强激动剂利福平相当。此外,首次发现 2-乙基己基二苯基磷酸酯(EHDPP)在略高于人体血液最高检出浓度(80 nmol·L⁻¹)的染毒组(316.2 nmol·L⁻¹)即表现出显著的 hPXR 激活效应。本方法有助于研究化学品对 PXR 受体信号通路的扰动作用,并为 OPEs 类化学品的健康风险评估提供科学依据。

关键词: 有机磷酸酯阻燃剂;孕烷 X 受体;报告基因检测;化学品健康风险

文章编号: 1673-5897(2023)2-033-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Establishment of a Dual Luciferase Reporter Gene Assay for Pregnane X Receptor and Study of Agonistic Activities of Organophosphate Flame Retardants

Wu Yifan^{1,2,3}, Nie Qingyu^{1,2,3}, Zheng Jingyi^{1,2,3}, Zhen Huajun^{1,2,3,4,*}, Xiu Guangli^{1,2,3,4,#}

1. School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
2. Shanghai Environmental Protection Key Laboratory on Environmental Standard and Risk Management of Chemical Pollutants, Shanghai 200237, China
3. State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, Shanghai

基金项目:国家自然科学基金资助项目(22276056);上海市浦江人才计划资助项目(20PJ1402700)

第一作者:吴一凡(1997—),男,硕士研究生,研究方向为环境毒理学,E-mail:13918591075@163.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: zhenhuajun@ecust.edu.cn

共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: xiugl@ecust.edu.cn

200237, China

4. Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China

Received 15 November 2022 accepted 7 January 2023

Abstract: Pregnane X receptor (PXR) is a nuclear receptor that regulates the metabolism of heterologous/endogenous substances in organisms. Environmental pollutants can alter metabolic homeostasis in humans by PXR-mediated pathways and thus increase the risks of common metabolic diseases, but there is lack of sensitive and stable *in vitro* assays to detect PXR binding activity of chemicals. In this study, the pBIND-hPXR expression plasmid containing a renilla luciferase reporter gene was constructed based on the recombinant DNA technology, and then co-transfected with a firefly luciferase reporter gene plasmid GAL4-UAS-Luc inserted with the upstream activation sequence into HEK 293T cells. The established dual luciferase reporter gene assay exhibited high sensitivity, broad applicability and good reproducibility when screening chemicals for agonistic/antagonistic activities of human pregnane X receptor (hPXR). The assay was further applied to investigate the hPXR binding activities of nine typical organophosphate esters (OPEs), and the results showed that aryl-substituted OPEs in general exerted stronger agonistic activities than those of chlorinated and alkyl-substituted OPEs. Among these OPEs, tricresyl phosphate (TCP) exhibited the strongest agonistic activity, as exemplified by the comparable values of 20% maximal effective concentration and maximum activity with those of rifampicin, a known strong hPXR agonist. For the first time, 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) was found to exhibit significant hPXR agonistic activity at a concentration of $316.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, which was only slightly higher than the reported maximum detectable concentration in human blood samples ($80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) from a Chinese population. Overall, this assay could facilitate studying the impact of chemical exposure on the PXR signaling pathway and provide a scientific basis for health risk assessment of OPEs.

Keywords: organophosphate flame retardant; pregnane X receptor; reporter gene test; chemical health risk

环境中存在着大量可干扰动物和人体内分泌系统的污染物。这些污染物主要通过作用于核受体超家族中的多种转录因子,产生包括生殖系统损伤、代谢紊乱、神经发育异常等生态和健康危害^[1]。作为核受体超家族中的重要成员,孕烷 X 受体(pregnane X receptor, PXR)在内外源物代谢及机体代谢稳态中发挥着关键作用,且主要表达在肝脏、小肠、胃、肾脏等消化、代谢器官中。PXR 蛋白由 434 个氨基酸组成,主要功能区包括 DNA 结合区(氨基酸残基 41 ~ 107)和配体结合区(氨基酸残基 141 ~ 434)。PXR 为 II 型核受体,可在细胞核内与维甲酸 X 受体(RXR)形成异二聚体^[2],其与配体结合后调控下游基因(例如细胞色素酶 P450 和谷胱甘肽转移酶^[3]等关键代谢基因)的转录激活和表达。研究表明,PXR 配体结合域可分别容纳多种结构各异的疏水性化合物,典型污染物包括药物类化合物、杀虫剂、类固醇激素和全氟化合物等都能产生 PXR 激活效应,因此 PXR 也被认为是一种可监测环境复合污染的生物传感器^[4]。最新的研究指出,有机磷酸酯(organophosphate esters, OPEs)阻燃剂磷酸三甲苯(tricresyl phos-

phate, TCP)、塑化剂邻苯二甲酸二环己酯可分别介由 PXR 通路导致人肝脏、小鼠小肠等代谢器官的功能异常,进一步揭示了具有 PXR 活性的环境污染物与非酒精性脂肪肝^[5-6]、动脉粥样硬化^[7]等多种代谢性疾病发生的潜在关联。因此,开发可检测 PXR 受体活性的实验方法对于环境污染监测及化学品健康风险评估具有重要意义。

在现有化学物质毒性评估方法体系中,报告基因实验可反映环境内分泌干扰物(EDCs)与核受体作用介导的内源性基因表达变化情况,被美国环境保护局、美国国家卫生研究所等推荐为内分泌干扰效应的标准筛选方法之一^[4]。目前,国内外学者已建立若干 PXR 受体报告基因检测方法,并对环境污染物 PXR 激活效应开展了研究。例如,Kojima 等^[8]通过构建基于 COS-7 细胞的 PXR 体外细胞报告基因系统,对 200 种农药的 PXR 结合活性进行筛查,并发现有机磷农药代谢物比起母体化合物具有更强的受体激活效应。Delfosse 等^[9-10]基于可稳定表达 GAL4-PXR-LBD 的 HeLa 细胞系,发现了顺式氯丹、反式九氯等有机氯农药可与内源性 17β -雌二醇醇协

同激活 hPXR 并诱导下游基因的表达。Creusot 等^[4]构建了 HG5LN-hPXR 的体外报告基因系统,发现环境水体样品和沉积物的提取物普遍具有较强的 PXR 激活效应,并且目前已知的 PXR 激动剂仅能解释不到 1% 的生物学活性。上述已有方法建立在基于萤火虫荧光素酶或 β -半乳糖苷酶表达的单报告基因实验体系上,需要共转染分别带有受体(或带有受体配体结合域的融合蛋白)和受体反应元件的 2 种质粒,检测结果也受到细胞转染效率低、受试物毒性等因素的影响^[4,11]。而通过共转染含内参基因的表达质粒,可对不同样品孔的细胞数量及转染效率进行校正,并有效降低检测结果的系统误差。但是现有的 PXR 受体双报告基因实验需同时转染 3 种质粒,对细胞转染的实验操作及质粒的稳定表达带来风险^[12-14]。另外,现有方法仅关注 PXR 受体激活活性的检测,而缺乏可同时适用不同结合活性特征(激活、拮抗及协同作用等)的检测手段。因此,有必要进一步开发高灵敏的、稳定的和适用范围广的 PXR 双荧光素酶报告基因检测方法。

基于此,本文利用重组基因技术,构建了一种新型的人孕烷 X 受体(human pregnane X receptor, hPXR)双荧光素酶报告基因检测方法,并测试了 9 种典型的 OPEs 阻燃剂的 hPXR 受体结合活性。本研究将为环境污染物的 hPXR 受体干扰效应筛查及化学品的健康风险评估提供研究手段和科学依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 细胞与质粒

人胚肾细胞 HEK 293T 源自中国科学院上海生命科学研究院资源中心。*E. coli* DH5 α 感受态细胞购于上海生工生物工程技术有限公司(以下简称上海生工)。双荧光素酶报告基因载体质粒,包括海肾荧光素酶报告基因 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi 和萤火虫荧光素酶报告基因 pGL4.35[luc2P/9 \times GAL4UAS/Hygro] (以下简称 GAL4-UAS-Luc),均购于美国 Promega 公司。

1.2 试剂与仪器

青霉素-链霉素溶液、氨苄西林、DMEM 高糖培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、PBS 缓冲液均购于上海泰坦科技股份有限公司(以下简称上海泰坦),胰蛋白酶-EDTA 溶液购于美国 Sigma-Aldrich 公司,PEI 40K 转染试剂购于上海懋康生物科技有限公司,无内毒素质粒提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司,二甲基亚砷(DMSO)、双荧

光素酶报告基因检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。人 PXR 受体激动剂利福平(>98%)和 SR-12813(98%)分别购于上海泰坦和上海陶术生物科技有限公司,PXR 受体拮抗剂酮康唑(>98%)购于上海源叶生物科技有限公司。本研究用于 PXR 受体结合活性测试的其他标准品包括:顺式氯丹(>98%, Dr. Ehrenstorfer)、17 β -雌二醇(99.5%, Target-Mol)、9 种 OPEs 包括磷酸三丁酯(TBP)、磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP)、磷酸三(1-氯-2-丙基)酯(TCIPP)、磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCIPP)、磷酸三(2-乙基己基)酯(TEHP)、磷酸三(2-丁氧基乙基)酯(TBOEP)、磷酸三苯酯(TPHP)、磷酸三甲苯酯(TCP)纯度均>99%,均购于 Dr. Ehrenstorfer;2-乙基己基二苯基磷酸酯(EHDPP),纯度>98%,购于上海源叶。所有待测物均配制成 100 mmol \cdot L⁻¹ 的 DMSO 储备溶液,储存于 -20 $^{\circ}$ C,待暴露时稀释使用。本研究用到的主要仪器包括超微量分光光度计和多功能酶标仪,分别购自美国 Thermo Scientific 公司(型号: NanoDrop 2000C)和美国 BioTek 公司(型号: Synergy H4)。

1.3 报告基因质粒构建

人孕烷 X 受体配体结合结构域(hPXR-LBD, Genbank 编号 NM_003889.4, 对应氨基酸序列范围 108-434)基因由上海生工合成。构建报告基因质粒时,首先在 hPXR-LBD 的 5' 和 3' 端分别加入限制性内切酶 SgfI 和 PmeI 的识别位点,然后在经 SgfI/PmeI 酶消化处理的 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi 模板质粒上插入目的基因,最终构建可表达由 GAL4 蛋白 DNA 结合结构域(GAL4-DBD)和 hPXR-LBD 组成的融合蛋白 pBIND-hPXR 重组质粒。该质粒的启动子下游含有可同时表达海肾荧光素酶(hRluc)的基因片段。将 pBIND-hPXR 和 GAL4-UAS-Luc 分别转化至 *E. coli* DH5 α 感受态细胞进行质粒扩增,使用去内毒素质粒 DNA 抽提试剂盒提取质粒,通过超微量分光光度计测定质粒的纯度和浓度。利用限制性内切酶(SgfI/PmeI)对扩增的重组质粒 pBIND-hPXR 进行消化处理,后经琼脂糖凝胶电泳验证片段长度。同时,对 pBIND-hPXR 进行 DNA 序列分析(上海生工),验证质粒构建是否成功。

1.4 双荧光素酶报告基因实验

使用高糖 DMEM 培养基和 10% FBS,将稳定传代>3 次的 293T 细胞以 2×10^4 个 \cdot 孔⁻¹ 的密度接种于 96 孔板中。培养 24 h 后,待细胞达到 60% ~ 80% 的汇合度时,使用 PEI 40K 将 pBIND-hPXR 和

GAL4-UAS-Luc 质粒转染至 293T 细胞内。转染完毕后,继续孵育 24 h,将培养液更换为含有 DMSO 或不同浓度受试物质(9 种 OPEs 等)的新鲜培养基(DMSO 最终浓度皆为 0.1%),继续孵育 24 h。每个化学物质的不同浓度梯度均设置 3 个生物学平行组。暴露完毕后,根据双荧光素酶报告基因检测试剂盒的操作说明,对每孔样品的萤火虫荧光素酶(Luc)和海肾荧光素酶(hRluc)信号进行测定,计算每孔样品 Luc 与 hRluc 信号的比值。对于单次 96 孔板实验,将样品孔的 Luc/hRluc 信号值相对于阴性对照(DMSO)孔的信号值进行矫正,结果用于表征化学品诱导激活 hPXR 受体活性的强弱。采用 Prism 软件(美国 Graphpad 公司,版本号 8.0.2)对每种受试物质的 hPXR 受体激活/拮抗活性的剂量-效应曲线进行拟合,选取 Hill 方程作为拟合模型^[5]。此外,各个化学品的 $\log K_{ow}$ 值均源自 EPA 的 EPI 软件的计算结果。

由于不同批次实验中,2 种荧光素酶(Luc 和 hRluc)信号的绝对值受到细胞量、转染效率、温度和暴露时长等多种实验条件的影响,因此本研究的所有 96 孔板实验均设置了 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利福平阳性对照孔($n=3$),并将其信号值设为 100%。为了比较不同批次实验中不同化学物质的 hPXR 受体激活效应能力,计算每个物质不同浓度下相对于阳性物质的活性值(以百分比表示)。通过剂量-效应曲线计算各个物质达到阳性对照激活效应值的 20% 的对应浓度(20% relative effective concentration, REC_{20}),依据不同物质 REC_{20} 值的大小比较其对 hPXR 激活能力。

此外,对双荧光素酶报告基因实验的重复性进行验证。对比了 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利福平在同一 96 孔板内不同样品孔间、不同批次实验间和不同传代次数的 293T 细胞进行的实验间(5 代及 20 代)的 hPXR 受体激活效应。采用方差分析检验不同物质、不同暴露浓度与阴性对照(DMSO 组)的 hPXR 受体激活效应差异的显著性,本研究的统计学显著性水平设定为 $P<0.05$ 。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 报告基因质粒的验证

本研究构建的 pBIND-hPXR 报告基因质粒图谱如图 1(a)所示,pBIND-hPXR 的理论 DNA 碱基数为 7 692 bp。由 hPXR-LBD 连接 GAL4-DBD 构成的融合蛋白序列位于 T7 启动子的下游。该蛋白与 GAL4-UAS-Luc 质粒的 UAS 区结合,进而诱导 Luc

荧光素酶的转录和表达。pBIND-hPXR 质粒转录过程可同时表达 hRLuc,因此 hRLuc 荧光素酶可作为内参对报告基因实验的 Luc 信号值进行矫正,以克服细胞量、细胞状态等其他因子对融合蛋白调控 Luc 转录表达的影响^[11]。

使用限制性内切酶 SgfI/PmeI 消化重组质粒,然后进行琼脂糖凝胶电泳试验。如图 1(b)所示,泳道 L1 和 L2 分别对应为重组质粒及其经 SgfI/PmeI 消化所得产物的条带。其中,L1 包含了一条代表重组质粒 DNA 超螺旋结构的强信号条带。L2 中上方强条带及下方弱条带分别代表未接入目的基因的载体质粒及 hPXR-LBD 的 DNA 线性化片段,其条带位置与理论计算得到的 DNA 碱基(对)数(分别为 6 701 和 991)一致。进一步对重组质粒 pBIND-hPXR 进行测序鉴定,结果显示与理论构建的序列匹配度为 100%。

2.2 双荧光素酶报告基因方法的建立

2.2.1 方法的测试条件确立

报告基因实验的最终检测信号受质粒转染条件的影响,本实验严格按照转染试剂 PEI 40K 的说明步骤进行。为了获取最佳转染质粒用量,在转染试剂厂商推荐的最佳质粒总用量($1.0 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)范围内,对比研究了增加 pBIND-hPXR 或 GAL4-UAS-Luc 的转染量后,293T 细胞产生的 hPXR 激活效应信号强度。由图 2(a)可知,在所测试的质粒浓度组成条件中,当 pBIND-hPXR 和 GAL4-UAS-Luc 的浓度比为 1:4 时,293T 细胞呈现出最高的 hPXR 诱导活性,因此报告基因实验中 2 种质粒的浓度分别设定为 $0.2 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

细胞的存活率直接影响基于其体外培养的生物活性检测的最终结果。双荧光素酶方法中的 hRluc 荧光信号值除了用于矫正细胞量、转染效率、暴露条件等因素对 Luc 信号的干扰外,还可用于指示受试物质浓度是否对细胞产生毒性作用^[16]。本研究分别测试 2 种已知强 hPXR 激动剂 SR12813 和利福平在不同浓度范围内($0.001 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.001 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Luc 和 hRluc 信号强度的变化趋势,结果如图 2(b)所示。当 SR12813 浓度达到 $3.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,利福平浓度达到 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,293T 细胞的 hRluc 信号分别较阴性对照(DMSO)组降低 49.7% 和 32.6%。在类似的报告基因实验方法体系中,hRluc 信号值相对阴性对照信号值降低 20% 以上说明存在细胞毒性^[11,16],因此 SR12813($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及利

福平($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)具有明显的细胞毒性作用。这也与文献报道的 SR12813 和利福平对 LS174T 细胞^[17]($5.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及 HepG2 细胞($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[18]

产生毒性的浓度水平接近。因此,本方法可有效排除因受试物质的毒性作用造成细胞存活率降低,进而干扰荧光信号产生的影响。

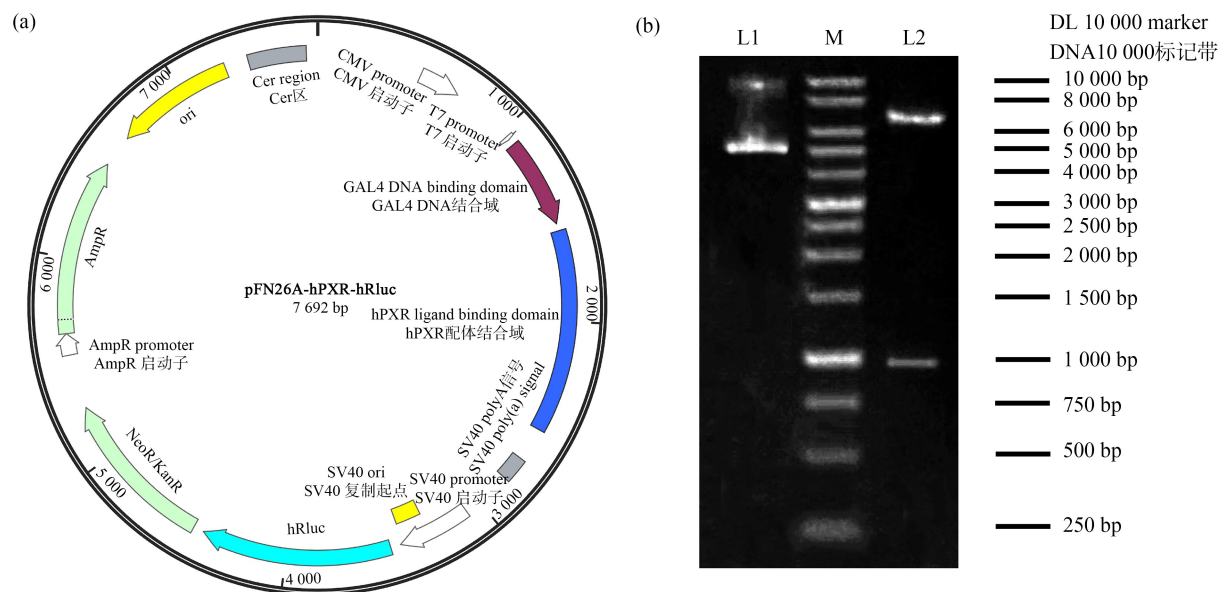


图 1 构建的 pBIND-hPXR 质粒图谱及其结构验证

注:(a) pBIND-hPXR 质粒结构图;(b) 重组质粒及其经 SgfI/PmeI 消化所得产物的电泳结果图;M 和 DL 为 10 000 bp 的 DNA 标记带, L1 为重组质粒 pBIND-hPXR 的电泳结果,L2 为重组质粒消化产物的电泳结果。

Fig. 1 Map of the constructed plasmid pBIND-hPXR and its structural validation

Note: (a) The plasmid structure of pBIND-hPXR; (b) Electrophoresis results of the recombinant plasmid and its product digested by SgfI/PmeI; M and DL represents 10 000 bp DNA marker, L1 represents the electrophoretic result of the recombinant plasmid pBIND-hPXR, and L2 represents the electrophoretic result of the digested recombinant plasmid.

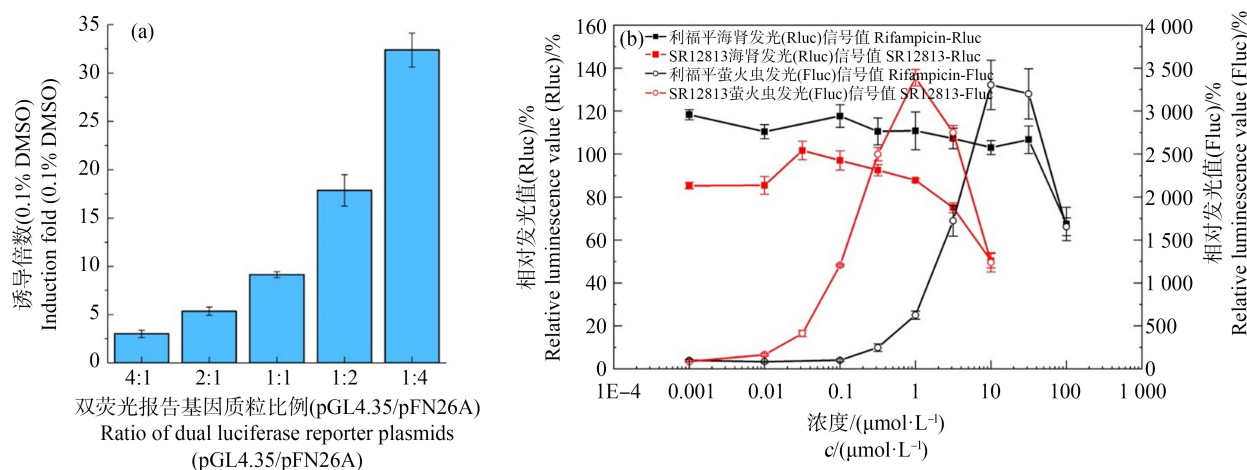


图 2 报告基因实验条件的优化

注:(a) 不同质粒浓度条件下的 hPXR 受体活性诱导倍数;(b) 不同浓度的利福平和 SR12813 诱导的海肾和萤火虫相对信号值;DMSO 表示二甲基亚砜。

Fig. 2 Optimization of the reporter gene assay conditions

Note: (a) Fold induction of hPXR agonistic activity at different plasmid concentrations; (b) Relative signal values of renilla and firefly luciferase induced by different concentrations of rifampicin and SR12813; DMSO stands for dimethyl sulfoxide.

2.2.2 方法有效性验证

选取已知的强 hPXR 受体激动剂利福平和 SR12813, 分别在其非细胞毒性浓度范围内(利福平: $0.001 \sim 31.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SR12813: $0.001 \sim 3.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)验证本方法的有效性。由图 3(a)可知, 利福平与 SR12813 均呈现典型的 S 型剂量-效应关系, 其 EC_{50} 值分别为 $3.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此前, Svecova 等^[19]构建了基于 GAL4-PXR-LBD 和 VP16-SRC-1-receptor-interacting 质粒转染 CV-1 细胞的 hPXR 激活实验, 测得利福平的 EC_{50} 值为 $5.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Xue 等^[20]建立了基于 CV-1 细胞转染全长 hPXR 和 CYP3A4-LUC 质粒的报告基因方法, 测得利福平的 EC_{50} 值为 $1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; Creusot 等^[21]的研究结果显示, 人宫颈癌细胞系 HG5LN 转染全长 hPXR 和 CYP3A4-LUC 质粒后, SR12813 的 EC_{50} 值为 $0.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 而 Toporova 等^[22]研究指出, HG5LN 细胞转染含 GAL4-PXR-LBD 融合蛋白的质粒后, SR12813 的 EC_{50} 值为 $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。综上, 本实验建立的 hPXR 结合活性检测方法的灵敏度与此前报道的报告基因方法基本一致。

选取已知的 hPXR 拮抗剂酮康唑来验证方法用于检测 hPXR 拮抗作用的适用性。将 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利

福平和不同浓度的酮康唑($0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共暴露于转染后的 293T 细胞。经过 24 h, 细胞的荧光素酶信号值与酮康唑浓度呈现标准的拮抗剂量-效应关系(图 3(b)), IC_{50} 值为 $3.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此前, Das 等^[23]采用基于 HepG2 细胞转染全长 hPXR 和 CYP3A4-LUC 质粒的报告基因检测方法, 测得酮康唑对利福平($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的拮抗作用 IC_{50} 值为 $18.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 略高于本方法的研究结果。这可能与 2 项研究中添加的激动剂初始浓度不同有关^[24]。另外, 本方法和 Das 等^[23]所使用的细胞种类、培养液组分、转染的质粒和浓度等实验条件也可能对方法的灵敏度差异造成影响。此外, 与 Das 等^[23]的单荧光报告基因方法相比, 本方法构建的内含海肾荧光素酶基因的 hPXR 表达质粒, 可对不同样品孔的细胞数量及转染效率进行校正, 减少细胞转染效率低、受试物毒性等因素对检测结果的影响, 降低检测结果的系统误差。

Xue 等^[20]的研究表明, 由于 hPXR-LBD 具有较大的且结构特殊的配体结合结构域, 因此可能同时容纳多种小分子配体, 这一点与其他典型的内分泌干扰核受体如雌激素受体(ER)、肝 X 受体(LXR)等的 LBD 区显著不同。Delfosse 等^[10]的研究进一步指

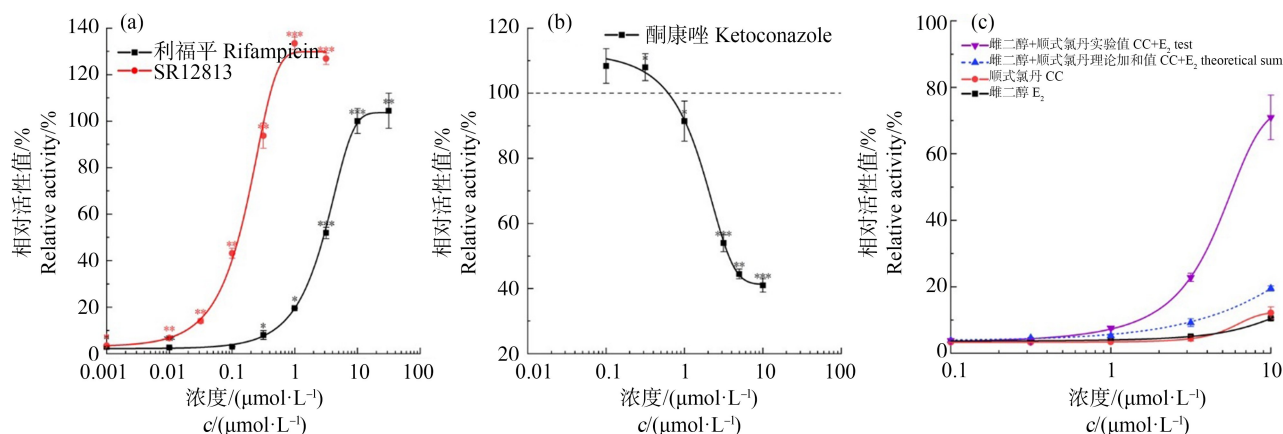


图3 报告基因实验方法的有效性验证

注:(a) 利福平和 SR12813 的 hPXR 激活剂量-效应曲线($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平的反应设为 100% 的相对活性值); (b) 酮康唑的 hPXR 拮抗剂量-效应曲线($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平的反应设为 100% 的相对活性值); (c) 雌二醇与顺式氯丹共暴露的 hPXR 剂量-效应曲线, 蓝色虚线代表使用 Bliss 独立模型得到的 2 种物质激活效应的理论加和曲线($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平的反应设为 100% 的相对活性值); * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$, *** 表示 $P < 0.001$ 。

Fig. 3 Validation of the reporter gene assay

Note: (a) hPXR agonistic activity dose-response curves for rifampicin and SR12813 (in relative to the activity of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rifampicin); (b) hPXR antagonistic activity dose-response curve for ketoconazole (in relative to the activity of $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rifampicin); (c) hPXR dose-response curves for co-exposure of estradiol and *cis*-chlordane (in relative to the activity of $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rifampicin), the blue dashed line represented the theoretical additive activation curves calculated using the Bliss independent model; * represents $P < 0.05$, ** represents $P < 0.01$, *** represents $P < 0.001$.

出,一些有机氯农药例如顺式氯丹(*cis*-chlordane, CC)、硫丹(endosulfan, END)和七氯环氧化物(heptachlor endoepoxide, HEP)等可与内源性 17β -雌二醇(17β -estradiol, E_2)分子协同激活 hPXR 受体并调控 CYP3A4 基因的表达。本研究也测试了 $0.1 \sim 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内的 CC 和 E_2 共暴露产生的 hPXR 受体活性作用。由图 3(c)可知,293T 细胞同时暴露于 CC 和 E_2 时受到显著的 hPXR 协同激活作用,例如当 CC 和 E_2 的浓度达到 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,2 种物质诱导的相对激活活性值为 Bliss 独立加和模型计算所得理论值的 6.2 倍。因此,本方法也适用于检测多种不同小分子配体对 hPXR 的协同激活作用。此外,相较于 Delfosse 等^[10]所用的 5 倍重复序列($5\times\text{GAL4}$)的酵母 GAL4/UAS 系统,本方法使用的 $9\times\text{GAL4}$ 系统灵敏度更高,由图 3(a)可知,本研究中 SR12813 在 $10 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表现出显著的 hPXR 激活效应,而 Delfosse 等^[10]所用方法下的最低效应浓度为 $30 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,略高于本研究。

2.2.3 方法重复性分析

以 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利福平分别测试本方法的重复性。其中,同一块 96 孔板中的 3 个复孔的信号值变异系数分别为 9.57% 和 8.95%。此外,比较了 3 次不同实验相同浓度利福平的 hPXR 激活信号, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平信号值的板间变异系数分别为 13.97% 和 10.31%。因此,

本方法的实验系统误差较小,测试结果稳定。此外,对比了不同传代次数的 293T 细胞(5 代及 20 代)经利福平暴露后的信号响应灵敏度,结果显示利用 5 代及 20 代的细胞测试所得的利福平 REC_{20} 分别为 $(1.19\pm 0.12) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(1.31\pm 0.22) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,二者无显著差异($P>0.05$),说明基于不同批次 293T 细胞的测试结果具有较好的可重复性。另外,与 Kojima 等^[13]同时转染 3 种质粒(包括内参质粒)的双荧光报告基因方法相比,本方法基于酵母 GAL4/UAS 系统构建含有海肾荧光素酶内参基因的双质粒系统,在操作便捷性及质粒转染的稳定性上更具优势。

2.3 有机磷酸酯阻燃剂的 hPXR 受体活性检测

本研究测试了 9 种典型的 OPEs 阻燃剂,包括 3 种烷基(TBP、TEHP 和 TBOEP)、3 种卤代(TCEP、TCIPP 和 TDCIPP)、3 种芳基 OPEs (TPHP、EHDPP 和 TCP)的 hPXR 受体结合活性。为了排除受试物的细胞毒性对其活性测试结果的影响,根据 hRluc 信号值相对阴性对照(DMSO)信号值的衰减程度确定不同受试物的有效测试(衰减 $<20\%$)浓度范围^[16]。由图 4 可知,在测试浓度范围内,除 TCEP 外的其他 8 种 OPEs 均产生不同程度的 hPXR 受体激动效应。其中,3 种芳基 OPEs 均在较低测试浓度($\leq 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)产生显著的 hPXR 激活活性,且最大激活效应值达到或接近 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平产生的效应值。进一步对比 9 种 OPEs 的 hPXR 激活能力,根据剂

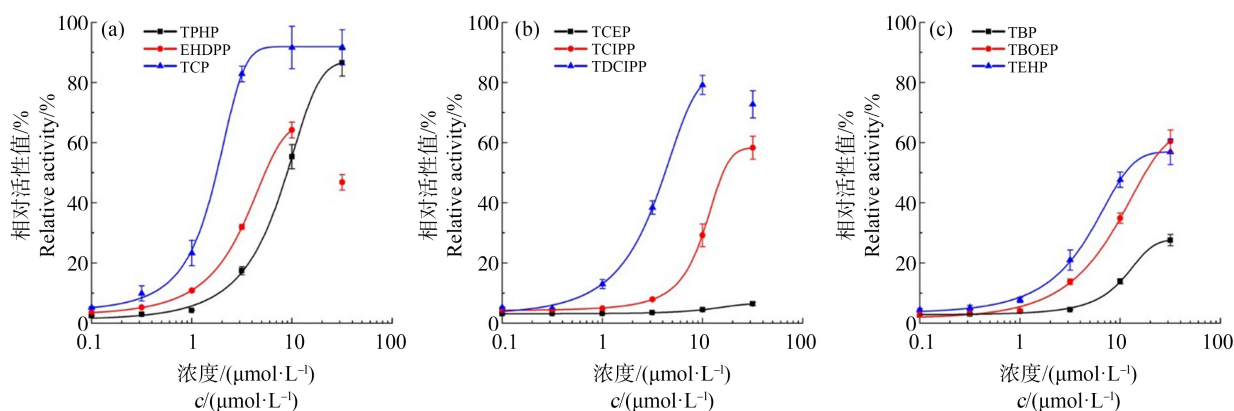


图 4 9 种典型有机磷阻燃剂(OPEs)的 hPXR 激活效应

注:(a) 3 种芳基 OPEs 的 hPXR 活性剂量-效应曲线;(b) 3 种卤代 OPEs 的 hPXR 活性剂量-效应曲线;

(c) 3 种烷基 OPEs 的 hPXR 活性剂量-效应曲线;其中 EHDPP 和 TDCIPP 在 $31.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

相对活性值较其 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的活性值均显著下降($P<0.05$),因此剂量效应曲线拟合时不包含该浓度点数据。

Fig. 4 Dose-response curves for hPXR agonistic activities of nine typical organic phosphate esters (OPEs)

Note: (a) Three aryl OPEs, (b) Three halogenated OPEs and (c) three alkyl OPEs; the relative activity values of EHDPP and TDCIPP

at $31.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ were significantly lower ($P<0.05$) than their corresponding activity values at $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, so the data at this concentration point were excluded from the dose-effect curve fitting.

量-效应曲线分别计算不同物质的 REC_{20} 值。如表 1 所示,按 REC_{20} 由低到高排序依次为 TCP、EHDPP、TDCIPP、TEHP、TPhP、TBOEP、TCIPP、TBP,其中,TCP(REC_{20} 为 $(0.92 \pm 0.11) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)表现出比利福平(REC_{20} 为 $(1.19 \pm 0.12) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)更强的受体激活活性($P < 0.05$)。

此前,Kojima 等^[13]采用报告基因方法对 11 种常见 OPEs(包含本研究测试的 8 种物质 TCP、TDCIPP、TEHP、TPhP、TBOEP、TCIPP、TBP 和 TECP)的 hPXR 激活效应进行了检测,发现 TECP 不能产生 hPXR 激活效应,而其他 7 种 OPEs 均表现出不同程

度的 hPXR 受体激活活性,与本方法研究结果一致。此外,本研究 and Kojima 等^[13]测得的 7 种物质的 REC_{20} 值呈显著线性正相关关系($r = 0.92, P < 0.05$),该结果也验证了本方法的可靠性。进一步对比发现,Kojima 等^[13]报道的 TCIPP、TBP 的 REC_{20} 值低于本研究方法的对应数值,而 TEHP 的 REC_{20} 值要高于本研究结果。由于 Kojima 等^[13]和本方法分别采用猿猴肾细胞系 COS-7 和人胚肾细胞系 HEK 293T 进行转染,因此不同 OPEs 穿透 2 种细胞膜进入胞内与靶标蛋白结合的能力可能存在差异。另外,2 种方法分别基于全长 hPXR/CYP3A4 基因上游

表 1 有机磷酸酯等物质的正辛醇-水分配系数及其诱导 hPXR 产生 20% 最大效应的浓度值 (REC_{20})
Table 1 Octanol-water partition coefficients and 20% relative effective concentration (REC_{20}) values of the organophosphates

化合物 Compound	$\log K_{ow}$	$REC_{20}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	
		本研究 This study	Kojima 等 ^[13] Kojima et al ^[13]
利福平(Rif) Rifampicin (Rif)	4.24	1.19 ± 0.12	0.31 ± 0.05
磷酸三甲酯(TMP) Trimethyl phosphate (TMP)	-0.60	-	N.E. ^a
磷酸三乙酯(TEP) Triethyl phosphate (TEP)	0.87	-	N.E.
磷酸三丙酯(TPrP) Tripropyl phosphate (TPrP)	2.35	-	N.E.
磷酸三丁酯(TBP) Tri-n-butyl phosphate (TBP)	3.82	15.26 ± 1.17	9.40 ± 0.50
磷酸三丁氧基乙酯(TBOEP) Tributoxyethyl phosphate (TBOEP)	3.00	4.96 ± 0.72	3.10 ± 0.30
磷酸三(2-乙基己基)酯(TEHP) Tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP)	9.49	2.99 ± 0.09	4.70 ± 0.20
磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP) Tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP)	1.63	N.E.	N.E.
磷酸三(1-氯-2-丙基)酯(TCIPP) Tris(1-chloro-2-propyl) phosphate (TCIPP)	2.89	10.02 ± 0.39	4.90 ± 0.20
磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCIPP) Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP)	3.65	1.60 ± 0.53	1.40 ± 0.50
磷酸三苯酯(TPHP) Triphenyl phosphate (TPHP)	4.70	4.57 ± 0.30	2.80 ± 0.50
2-乙基己基二苯基磷酸酯(EHDPP) Ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP)	6.30	1.88 ± 0.33	-
磷酸三甲苯酯(TCP) Tricresyl phosphate (TCP)	6.34	0.92 ± 0.10	1.20 ± 0.40

注:^a 无影响(N.E.), $REC_{20} > 31.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Note: ^a No effect (N.E.), $REC_{20} > 31.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

的 hPXR 应答元件和酵母 GAL4/UAS 系统,2 种转录调控系统分别要求不同的共激活子,这也可能造成 2 种实验体系中不同物质的 REC_{20} 值存在差异。

除了受转染细胞及转录调控系统的影响,物质结构及理化性质也是决定其能否诱导 hPXR 产生活性的关键因素。Li 等^[25]评估了全氟烷基羧酸类物质(perfluoroalkyl carboxylic acids, PFCAs)对过氧化物酶体增殖剂激活受体 γ (PPAR γ)的激活作用,发现 PFCAs 的疏水性直接影响胞内的污染物质浓度进而影响报告基因实验的荧光信号值。与核受体家族其他成员相比,PXR 具有更大的疏水配体结合域以及多种类型的配体结合位点,因此能结合多种结构各异的疏水性物质^[26-27]。本研究进一步将 8 种可激活 hPXR 的 OPEs 的 REC_{20} 和其辛醇水分配系数($\log K_{ow}$)进行回归分析,结果如图 5 所示,二者呈现显著的线性负相关关系($r=-0.47, P<0.05$)。此外,结合本研究 and Kojima 等^[13]的研究结果分析可知,一些 $\log K_{ow}$ 值较低的 OPEs 类物质,例如 TMP(-0.65)、TEP(0.8)、TPrP(2.35)和 TCEP(1.63)都不能产生 hPXR 激活活性。上述结果表明疏水性是决定 OPEs 类物质诱导激活 PXR 受体的关键因素之一。除了疏水性外,物质的极性官能团或者特殊结构也影响其与受体蛋白的相互作用^[25]。例如,Zhang 等^[28]研究了不同链长的 PFCAs 与 PPAR γ 的亲合力,发现当总碳数从 4 增加到 11,物质与 PPAR γ 的亲合力逐渐增加,但随着碳原子数继续增加,PF-CAs 与 PPAR γ 蛋白的亲合力逐渐降低。虽然 hPXR 配体被认为缺乏结构特异性,但是本研究中的芳基化合物比卤代和烷基取代的 OPEs 具有更强的 hPXR 激活作用,这可能与 hPXR-LBD 特有的强疏水性芳香牢笼与外源性配体芳环结构的 π - π 电子云堆叠相关^[10]。

本研究首次发现一种典型的芳基类 OPEs,即 EHDPP 具有较强的 hPXR 激活效应,其 REC_{20} 值和利福平相近。作为一种广泛使用的芳基阻燃剂类物质,EHDPP 在灰尘、食品、空气和饮用水等多种环境介质中大量检出^[29-31]。此前的研究指出,EHDPP 能与 ER、AR、LXR α/β 、PPAR γ 和 IGF1R^[32]等多种核受体或转录因子作用,诱导包括青鳉鱼雌雄同体^[33]、胎盘发育受损^[34]、巨噬细胞泡沫化^[35]和肝脏脂肪变性^[6]等多种毒理健康效应。本研究则表明,EHDPP 在较低浓度水平($316 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)即可产生显著的 hPXR 激活效应,而该浓度仅略高于我国华东某地人

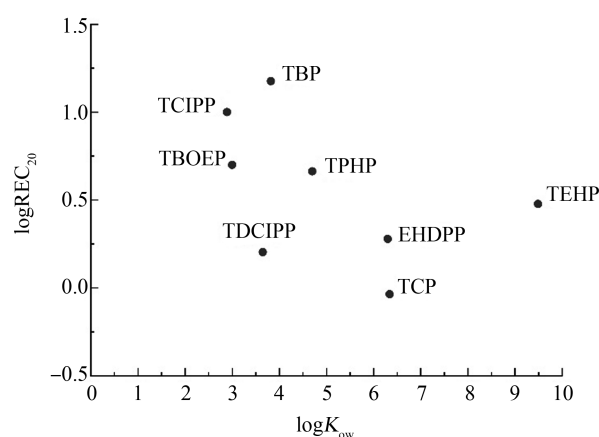


图5 OPEs 的正辛醇-水分配系数与 $\log REC_{20}$ 的相关性

Fig. 5 Correlation of octanol-water partition coefficients of OPEs with $\log REC_{20}$

群血液中所检出的 EHDPP 最高浓度($80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[6]。此外,以 EHDPP 为代表的芳基类 OPEs 普遍具有较强的 hPXR 激活效应,因此可能会对异生物质(如药物)的体内代谢^[37]以及胆固醇的肠道吸收和转运过程^[38]等产生影响。因此,有必要进一步研究 EHDPP 及其他芳基类 OPEs 通过 PXR 受体通路产生的毒理效应和健康风险。

最后,PXR 作为一种典型的 II 型核受体,需与维甲酸 X 受体(RXR)在细胞核内形成异二聚体进而调控 PXR 通路基因的表达。由于 PXR-RXR 复合物是一种许可型异二聚体,因此除与 PXR 配体相互作用外,其也能被 RXR 配体激活。例如,典型的 RXR 配体三丁基锡(TBT)可单独激活 PXR-RXR 复合物,而 TBT 在 PXR 配体共存时可与其产生明显的协同激活效应^[10]。本研究所建立的方法仅关注受试物质与 hPXR 单体的结合活性,因此在评价化学品的 hPXR 通路干扰效应时,仍需结合其他实验手段综合评判受试物质与 PXR-RXR 二聚体的相互作用及影响。

综上,本研究通过构建内含海肾荧光素酶基因的受体重组表达质粒(pBIND-hPXR),与荧光素酶报告基因质粒(GAL4-UAS-Luc)共转染至 HEK 293T 细胞,最终成功建立了一种可筛查化学品 hPXR 激动/拮抗作用的双荧光素酶报告基因检测方法。经过对质粒转染条件的优化和检测浓度范围的验证,该方法具有灵敏度高、适用范围广和重复性好等特点。应用该方法检测 9 种 OPEs 的 hPXR 激活效应,其中芳基类 OPEs 表现出比氯代和烷基类 OPEs 更

强的 hPXR 激活活性,并且 TCP 和 EHDPP 的最低效应浓度及最大激活效应值和已知 hPXR 强激动剂利福平相当。本文建立的双荧光素酶报告基因方法为研究化学品对 hPXR 信号通路的扰动作用提供了重要工具,也可为开发新污染物对其他核受体的激动/拮抗作用提供参考。

通信作者简介:镇华君(1985—),男,博士,副教授,主要研究方向为污染物的毒理和健康效应。

通信作者简介:修光利(1972—),男,博士,教授,主要研究方向为大气环境化学、大气污染控制以及环境风险评估与规划管理。

参考文献(References):

- [1] Gronemeyer H, Gustafsson J Å, Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3(11): 950-964
- [2] Tata J R. Signalling through nuclear receptors [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2002, 3(9): 702-710
- [3] Kliewer S A. The nuclear pregnane X receptor regulates xenobiotic detoxification [J]. *The Journal of Nutrition*, 2003, 133(7): 2444S-2447S
- [4] Creusot N, Kinani S, Balaguer P, et al. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: Screening of chemicals and application to water samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 569-583
- [5] Xiang D D, Wang Q W. PXR-mediated organophorous flame retardant tricesyl phosphate effects on lipid homeostasis [J]. *Chemosphere*, 2021, 284: 131250
- [6] Negi C K, Bajard L, Kohoutek J, et al. An adverse outcome pathway based *in vitro* characterization of novel flame retardants-induced hepatic steatosis [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 289: 117855
- [7] Liu J W, Hernandez R, Li X C, et al. Pregnane X receptor mediates atherosclerosis induced by dicyclohexyl phthalate in LDL receptor-deficient mice [J]. *Cells*, 2022, 11(7): 1125
- [8] Kojima H, Sata F, Takeuchi S, et al. Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using *in vitro* reporter gene assays [J]. *Toxicology*, 2011, 280(3): 77-87
- [9] Delfosse V, Dendele B, Huet T, et al. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds [J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8089
- [10] Delfosse V, Huet T, Harrus D, et al. Mechanistic insights into the synergistic activation of the RXR-PXR heterodimer by endocrine disruptor mixtures [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(1): e2020551118
- [11] Paguio A, Stecha P, Wood K V, et al. Improved dual-luciferase reporter assays for nuclear receptors [J]. *Current Chemical Genomics*, 2010, 4: 43-49
- [12] Sui Y P, Ai N, Park S H, et al. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2012, 120(3): 399-405
- [13] Kojima H, Takeuchi S, Itoh T, et al. *In vitro* endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors [J]. *Toxicology*, 2013, 314(1): 76-83
- [14] 冯帆, 张帆, 司文, 等. 孕烷 X 受体应答元件萤光素酶报告基因的构建及活性检测[J]. *解放军医学院学报*, 2015, 36(2): 166-170
Feng F, Zhang F, Si W, et al. Construction of pregnane X receptor response elements (ER6 and DR3) luciferase reporter and its transcription activity [J]. *Academic Journal of Chinese PLA Medical School*, 2015, 36(2): 166-170 (in Chinese)
- [15] Finlay D B, Duffull S B, Glass M. 100 years of modelling ligand-receptor binding and response: A focus on GPCRs [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2020, 177(7): 1472-1484
- [16] Nilles J, Weiss J, Haefeli W E, et al. How to avoid misinterpretation of dual reporter gene assay data affected by cell damage [J]. *Archives of Toxicology*, 2022, 96(9): 2501-2510
- [17] Creusot N, Gassiot M, Alaterre E, et al. The anti-cancer drug dabrafenib is a potent activator of the human pregnane X receptor [J]. *Cells*, 2020, 9(7): 1641
- [18] Nasser V M, Mahmoud R J. Differential toxicity of rifampicin on HepG2 and Hep2 cells using MTT test and electron microscope [J]. *Pharmacologyonline*, 2007, 3: 405-413
- [19] Svecova L, Vrzal R, Burysek L, et al. Azole antimycotics differentially affect rifampicin-induced pregnane X receptor-mediated *CYP3A4* gene expression [J]. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 2008, 36(2): 339-348
- [20] Xue Y, Moore L B, Orans J, et al. Crystal structure of the pregnane X receptor-estradiol complex provides insights into endobiotic recognition [J]. *Molecular Endocrinology*, 2007, 21(5): 1028-1038

- [21] Creusot N, Garoche C, Grimaldi M, et al. A comparative study of human and zebrafish pregnane X receptor activities of pesticides and steroids using *in vitro* reporter gene assays [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2021, 12: 665521
- [22] Toporova L, Grimaldi M, Boulahtouf A, et al. Assessing the selectivity of FXR, LXRs, CAR, and ROR γ pharmaceutical ligands with reporter cell lines [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1122
- [23] Das B C, Madhukumar A V, Anguiano J, et al. Synthesis of novel ketoconazole derivatives as inhibitors of the human pregnane X receptor (PXR; NR1I2; also termed SXR, PAR) [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18(14): 3974-3977
- [24] Neale P A, Leusch F D L. Considerations when assessing antagonism *in vitro*: Why standardizing the agonist concentration matters [J]. *Chemosphere*, 2015, 135: 20-23
- [25] Li C H, Shi Y L, Li M J, et al. Receptor-bound perfluoroalkyl carboxylic acids dictate their activity on human and mouse peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54 (15): 9529-9536
- [26] Watkins R E, Wisely G B, Moore L B, et al. The human nuclear xenobiotic receptor PXR: Structural determinants of directed promiscuity [J]. *Science*, 2001, 292 (5525): 2329-2333
- [27] Kliewer S A, Goodwin B, Willson T M. The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism [J]. *Endocrine Reviews*, 2002, 23(5): 687-702
- [28] Zhang L Y, Ren X M, Wan B, et al. Structure-dependent binding and activation of perfluorinated compounds on human peroxisome proliferator-activated receptor γ [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 279 (3): 275-283
- [29] Wong F, Suzuki G, Michinaka C, et al. Dioxin-like activities, halogenated flame retardants, organophosphate esters and chlorinated paraffins in dust from Australia, the United Kingdom, Canada, Sweden and China [J]. *Chemosphere*, 2017, 168: 1248-1256
- [30] Tang B, Christia C, Malarvannan G, et al. Legacy and emerging organophosphorus flame retardants and plasticizers in indoor microenvironments from Guangzhou, South China [J]. *Environment International*, 2020, 143: 105972
- [31] Poma G, Glynn A, Malarvannan G, et al. Dietary intake of phosphorus flame retardants (PFRs) using Swedish food market basket estimations [J]. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 2017, 100: 1-7
- [32] Xu C K, Ma H J, Gao F M, et al. Screening of organophosphate flame retardants with placentation-disrupting effects in human trophoblast organoid model and characterization of adverse pregnancy outcomes in mice [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2022, 130(5): 57002
- [33] Li Y, Kang Q Y, Chen R C, et al. 2-ethylhexyl diphenyl phosphate and its hydroxylated metabolites are anti-androgenic and cause adverse reproductive outcomes in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(14): 8919-8925
- [34] Hu W X, Gao F M, Zhang H, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and disruption of progesterone synthesis of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate in human placental choriocarcinoma cells: Comparison with triphenyl phosphate [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(7): 4061-4068
- [35] Hu W X, Jia Y T, Kang Q Y, et al. Screening of house dust from Chinese homes for chemicals with liver X receptors binding activities and characterization of atherosclerotic activity using an *in vitro* macrophage cell line and ApoE $^{-/-}$ mice [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2019, 127(11): 117003
- [36] Ya M L, Yu N Y, Zhang Y Y, et al. Biomonitoring of organophosphate triesters and diesters in human blood in Jiangsu Province, Eastern China: Occurrences, associations, and suspect screening of novel metabolites [J]. *Environment International*, 2019, 131: 105056
- [37] Gao J, Xie W. Targeting xenobiotic receptors PXR and CAR for metabolic diseases [J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, 33(10): 552-558
- [38] Sui Y P, Helsley R N, Park S H, et al. Intestinal pregnane X receptor links xenobiotic exposure and hypercholesterolemia [J]. *Molecular Endocrinology*, 2015, 29(5): 765-776